



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Programa de Doctorado en Biociencias y Ciencias
Agroalimentarias

TESIS DOCTORAL

MODALIDAD DE COMPENDIO DE ARTÍCULOS

**INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES Y
PRODUCTIVOS SOBRE LAS COMUNIDADES
MICROBIANAS DE LAS GANADERÍAS DE OVINO
LECHERO**

*INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL AND PRODUCTIVE FACTORS ON
THE MICROBIAL COMMUNITIES ON DAIRY SHEEP FARMS*

Directores:

Ana Isabel Garzón Sígler

Ramón Arias Sánchez

Autor de la Tesis:

Álvaro Rafael Quintana Berlanga

Mayo 2021

TITULO: *Influencia de factores ambientales y productivos sobre las comunidades microbianas de las ganaderías de ovino lechero*

AUTOR: *Álvaro Rafael Quintana Berlanga*

© Edita: UCOPress. 2021
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Facultad de Veterinaria

Departamento de Producción Animal

TESIS DOCTORAL

MODALIDAD DE COMPENDIO DE ARTÍCULOS

INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES Y PRODUCTIVOS SOBRE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS DE LAS GANADERÍAS DE OVINO LECHERO

***INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL AND PRODUCTIVE FACTORS ON
THE MICROBIAL COMMUNITIES ON DAIRY SHEEP FARMS***

Memoria de Tesis Doctoral presentada por **Álvaro Rafael Quintana Berlanga** para optar al grado de Doctor en Biociencias y Ciencias Agroalimentarias por la Universidad de Córdoba con la mención de *Doctorado Internacional* y la mención de *Doctorado Industrial*.

Córdoba, mayo 2021



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Facultad de Veterinaria

Departamento de Producción Animal

ANA ISABEL GARZÓN SÍGLER, profesora titular del Departamento de Producción Animal de la Universidad de Córdoba

CERTIFICA

Que **Álvaro Rafael Quintana Berlanga**, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis Doctoral titulada "**Influencia de factores ambientales y productivos sobre las comunidades microbianas de las ganaderías de ovino lechero**".

Revisado el presente trabajo estimo que reúne los requisitos exigidos por la Normativa vigente para optar al grado de Doctor y que puede ser presentado al Tribunal que ha de evaluarlo, por ello autorizo la defensa de esta Tesis Doctoral en la Universidad de Córdoba.

Córdoba, 20 de mayo de 2021

Fdo.: Ana Isabel Garzón Síglér

**INSTITUTO REGIONAL DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO
AGROALIMENTARIO Y FORESTAL DE CASTILLA-LA
MANCHA (IRIAF)**

Centro Regional de Selección y Reproducción Animal (CERSYRA)

RAMÓN ARIAS SÁNCHEZ, Técnico Superior de Investigación en el Centro Regional de Selección y Reproducción Animal adscrito al Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Forestal de Castilla-La Mancha (CERSYRA-IRIAF)


CERTIFICA

Que **Álvaro Rafael Quintana Berlanga**, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis Doctoral titulada **“Influencia de factores ambientales y productivos sobre las comunidades microbianas de las ganaderías de ovino lechero”**.

Revisado el presente trabajo estimo que reúne los requisitos exigidos por la Normativa vigente para optar al grado de Doctor y que puede ser presentado al Tribunal que ha de evaluarlo, por ello autorizo la defensa de esta Tesis Doctoral en la Universidad de Córdoba.

Córdoba, 20 de mayo de 2021

RAMON
ARIAS
SANCHEZ



Firmado digitalmente
por RAMON ARIAS
SANCHEZ
Fecha: 2021.05.20
12:47:20 +02'00'

Fdo.: Ramón Arias Sánchez



TÍTULO DE LA TESIS: INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES Y PRODUCTIVOS SOBRE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS DE LAS GANADERÍAS DE OVINO LECHERO

DOCTORANDO: Álvaro Rafael Quintana Berlanga

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

Durante su periodo de formación en la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Córdoba, el doctorando ha cubierto diferentes etapas que la capacitan para la obtención del Título de Doctor.

El doctorando se incorporó al Centro Regional de Selección y Reproducción Animal (CERSYRA) del Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Forestal de Castilla-La Mancha (IRIAF) con una beca de investigación FPI-INIA, dirigida a la formación del personal investigador en agroalimentación en los centros de investigación INIA-CCAA, asociada al Proyecto INIA “Evaluación de la calidad higiénico-sanitaria y tecnológica de la leche de raza Manchega como instrumento para la mejora de la viabilidad socio-económica y ambiental de los sistemas productivos de ovino lechero”, donde ha realizado la mayor parte del estudio de Tesis. La Tesis ha dado lugar a diferentes trabajos de investigación, de transferencia y de divulgación, además de propuestas de buenas prácticas para la mejora del sector. Asimismo, durante su etapa predoctoral ha realizado diversas actividades formativas en materia de microbiología, producción animal, tecnología quesera, etc., siendo de destacar sus estancias nacionales en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Ambientales y Bioquímica de la Universidad de Castilla-La Mancha, y su estancia internacional en el Department of Agronomy, Food Natural Resources, Animals and Environmental, en la Università Degli Studi Di Padova (Italia).

El trabajo muestra un carácter dinámico e innovador, que incluye la caracterización de la calidad microbiológica del ambiente de las ganaderías de oveja Manchega (aire de nave de las ovejas de ordeño y aire de la sala de ordeño) y otras fuentes de contaminación como la alimentación y la superficie de los pezones de las ovejas de ordeño. Ante las escasas

investigaciones realizadas anteriormente en ovino lechero, esta Tesis Doctoral aporta conocimiento sobre las comunidades microbianas y su equilibrio en relación con los factores ambientales y de manejo de las ganaderías de raza Manchega, con una especial atención a los riesgos asociados a la contaminación de la leche de tanque y a la caracterización de microorganismos de interés tecnológico, como las bacterias ácido-lácticas y las levaduras.

A tenor de lo expuesto, el doctorando ha adquirido las habilidades y competencias necesarias para abordar uno de los principales problemas que en la actualidad tiene el sector ovino lechero, la mejora de la calidad microbiológica de la leche, desde la perspectiva investigadora y de resolución de problemas sectoriales de manera solvente. Por otra parte, la presente Tesis Doctoral ha dado lugar a los siguientes indicios de calidad:

ARTICULOS INDEXADOS

- **Quintana, Á.R.**; Seseña, S.; Garzón, A.; Arias, R. Factors Affecting Levels of Airborne Bacteria in Dairy Farms: A Review. *Animals* **2020**, 10, 526. AGRICULTURE, DAIRY & ANIMAL SCIENCE, IP: 2.323, Q1.
- **Quintana, Á.R.**; Perea, J.M.; García-Béjar, B.; Jiménez, L.; Garzón, A.; Arias, R. Dominant Yeast Community in Raw Sheep's Milk and Potential Transfers of Yeast Species in Relation to Farming Practices. *Animals* **2020**, 10, 906. AGRICULTURE, DAIRY & ANIMAL SCIENCE, IP: 2.323, Q1.
- **Quintana, Á.R.**; Perea, J.M.; Palop, M.L.; Garzón, A.; Arias, R. Influence of Environmental and Productive Factors on the Biodiversity of Lactic Acid Bacteria Population from Sheep Milk. *Animals* **2020**, 10, 2180. AGRICULTURE, DAIRY & ANIMAL SCIENCE, IP: 2.323, Q1.

REVISTAS TÉCNICAS DEL SECTOR NACIONALES (ACTIVIDAD DE TRANSFERENCIA)

- **Álvaro Quintana**, Lorena Jiménez, María Dolores Pérez-Guzmán, Ana Isabel Garzón, Susana Seseña, María de los Llanos Palop, Ramón Arias. 2019. Relación entre microorganismos ambientales de la ganadería y de la leche de tanque de ovino manchego. Revista *Consortio Manchego* nº 56 (2019).

- Lorena Jiménez, Jesús Romero, Ana Garzón, Antón García, **Álvaro Quintana**, M^a Dolores Pérez-Guzmán, Ramón Arias. 2019. Relación entre la microbiología diferencial de la leche de tanque y las características de las ganaderías de ovino lechero”. Revista *Tierras* n° 26 (2019).

COMUNICACIONES EN CONGRESOS NACIONALES

- **Quintana, A.R.**; Jiménez, L.; Pérez-Guzmán, M.D.; Garzón, A.I.; Seseña, S.; Palop, ML.; Arias, R. 2019. Relación entre Microorganismos Ambientales de la Ganadería y de la Leche de Tanque”. XVIII Jornadas sobre Producción Animal AIDA-ITEA. Zaragoza, 7-8 de mayo de 2019. *Con este trabajo, el investigador obtuvo el Premio Jóvenes Investigadores a la mejor comunicación presentada.*
- Jiménez, L.; **Quintana, A.R.**; Garzón, A.; Oliete, B.; Pérez-Guzmán, M.D.; Arias, R. 2018. Relación entre la microbiología de la leche de tanque y los factores de producción de las ganaderías de ovino lechero. XLIII Congreso Nacional y XIX Congreso Internacional de la SEOC: 277-283. Zaragoza, septiembre de 2018.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 20 de mayo de 2021

Firma de los directores

**RAMON
ARIAS
SANCHEZ**
Firmado digitalmente por
RAMON ARIAS
SANCHEZ
Fecha: 2021.05.20
12:47:51 +02'00'

Fdo.: Ramón Arias Sánchez

Fdo.: Ana Isabel Garzón Síglar



**Centro Regional de Selección y
Reproducción Animal**

CERSYRA

Instituto Regional de Investigación y
Desarrollo Agroalimentario y Forestal
de Castilla-La Mancha

IRIAF

La presente Tesis Doctoral está enmarcada en el Proyecto de Investigación Fundamental, orientada a los recursos y tecnologías agrícolas en coordinación con las Comunidades Autónomas, del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), con referencia **RTA2011-00057-C02-01**, titulado *Estudio de la calidad higiénico-sanitaria y tecnológica de la leche de raza Manchega y su influencia en la calidad del queso Manchego*. La Tesis ha sido financiada con la ayuda para contratos predoctorales para la formación de personal investigador en agroalimentación en centros INIA-CCAA (FPI-INIA) con referencia **CPD 2015-0269**, en el Centro Regional de Selección y Reproducción Animal (CERSYRA) adscrito al Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Forestal de Castilla-La Mancha (IRIAF).

AGRADECIMIENTOS

Wenn ihr's nicht fühlt, ihr werdet's nicht erjagen.

(Si no lo sientes, nunca lo lograrás.)

JOHANN WOLFGANG GOËTHE

Fausto

Si pienso cómo llegué aquí, la primera palabra que me viene a la mente es *gracias*. De hecho, la palabra *gracias* se ha convertido en mi vocablo favorito del castellano, aunque, debido a las limitaciones de la lengua escrita, no sea capaz de abarcar todo el reconocimiento que siento por aquellas estrellas que han estado en la órbita de mi Tesis Doctoral. Este proyecto no habría podido salir adelante sin las personas que cito bajo estas líneas, a las que debo mi más sincera gratitud y agradecimiento de forma que traspasa la escritura, y para las que la palabra *gracias* se queda muy corta. Esta Tesis es para toda esa gente que me ha hecho sentir que podía lograrlo.

Como no puede ser de otra manera, mis primeras palabras de agradecimiento se las dedico a mis directores de Tesis. A la Dra. Ana Isabel Garzón Sígler, por tu visión, tiempo, dedicación y tu ayuda infinita durante la realización y publicación de los resultados. Y al Dr. Ramón Arias Sánchez por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo de investigación, por haberme dejado invadirte parte del despacho, por la amistad y los consejos que me brindaste desde un primer momento, por tu dedicación y apoyo incondicional durante el trabajo y, sobre todo, por haber creído en mí. Agradecer además al Dr. José Manuel Perea Muñoz, que ha sido una parte esencial en esta Tesis y al que considero un gran amigo y una de las mejores personas que conozco.

A la *alma mater*, la Universidad de Córdoba, por seguir formándome y estimular mi aprendizaje. No puedo estar más orgulloso de pertenecer a esta entidad académica.

Al INIA y al IRIAF por hacer posible, con su financiación de contratos predoctorales para la formación de personal investigador, la realización de esta Tesis Doctoral.

No puedo olvidarme de los ganaderos de AGRAMA (con especial mención a los de La Nava) que han contribuido enormemente a la realización de este trabajo abriéndome las puertas de su casa y facilitándome todo tipo de necesidades para el proyecto. Mil gracias a todos y cada uno de ellos.

A todos los compañeros del CERSYRA que han estado presentes durante el transcurso de la Tesis. Nunca podré olvidar esos desayunos en los que, en vez de desconectar del trabajo, parecía que estabas en un debate electoral (a día de hoy, se echa mucho de menos, en especial a ti, Felipe). Además, quisiera expresar mi gratitud al director del centro, Rafa, por todo tu apoyo y toda la ayuda que me has facilitado para la realización de la Tesis Doctoral. Y quisiera agradecer a todos los trabajadores y alumnos en prácticas que han pasado durante estos 5 años por el Laboratorio de Lactología y han dedicado tiempo y apoyo en este proyecto; en especial, a Sheila y M^a José, por haber sido más que compañeras en este viaje el cual, sin vosotras, nunca habría podido despegar.

También me gustaría expresar mi agradecimiento a los integrantes del Departamento de Química Analítica y Tecnología de los Alimentos de Ciudad Real por vuestra inestimable ayuda en el estudio de las levaduras, así como al Departamento de Química Analítica y Tecnología de los Alimentos de Toledo por acogerme en diversas estancias realizadas y, sobre todo, por todos los conocimientos que me habéis aportado para poder aplicar las técnicas moleculares al estudio. En particular, a la Dra. Susana Seseña y a la Dra. M^a de los Llanos Palop, gracias por todo.

A totes aquelles persones que fan possible el *WORKSHOP MRAMA* a la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona. En especial a Marta Capellas i Josep Yuste, moltes gràcies per haver-me acollit de convidat any rere any a aquesta cita que convertiu en una cosa tan especial, i a la que espero seguir assistint per molts anys.

A tutte le persone che hanno reso possibile il mio Erasmus all'Università degli Studi di Padova in Italia: al Dr. Alessio Cecchinato per prendermi sotto la sua ala protettiva e a tutti i membri del dipartimento DAFNAE (Department of Agronomy, Food Natural resources, Animals and Environment) per farmi sentire parte del loro gruppo; nei 3 mesi passati a Padova ho avuto la fortuna di conoscere un gruppo di amici che mi hanno fatto sentire come a casa e che mi porterò sempre nel cuore. Grazie infinite alla piccola famiglia Erasmus 2018/2019, e in particolar modo a Marco, per essere stato al mio fianco durante tutto il periodo patavino.

A la gente de Valdepeñas que ha ido apareciendo durante estos años. En especial, al equipo de *Heavybox* de CrossFit y al equipo de fútbol 7, por acogerme como uno más. Y a la semi-valdepeñera Lorena, por toda tu ayuda, tu comprensión en esta tediosa tarea (que conoces de primera mano) y, sobre todo, por las cervecitas de desahogo.

A mis amigos. A todos y cada uno de ellos que han formado parte de esta parte de mi historia que se fraguó años atrás. A Carlos, a Juanma, a Llamas, y a todos aquellos que me levantaban y de los que recibía apoyo incluso cuando hacer una Tesis Doctoral era inviable económicamente. A Sofía porque, a pesar de todo, aún hoy sólo tiene palabras de apoyo para este proyecto. A Belén, por regalarme vida, explorar mundo juntos y por darle a la palabra *apoyo* un valor inimaginable; y quien, junto a Javielo, Roteto, y Porri, formaban mi *equipo festivalero*, los cuales, sin saberlo, me salvaron la vida. A mis *granaínas* (y malagueña) favoritas, las cuales aprecio aún cuando tienen la extraña y a la par que curiosa habilidad de poder resumir 5 años de Tesis con la frase "nos da igual qué investigues, vas a ser el *Dr. Quesos*". A mi *equipo sonorámico*, amigos que te hacen contar los días que quedan para verlos. A todos aquellos que me han hecho sentir que la amistad no entiende de distancias, y menos en pandemia (por riguroso orden alfabético): Alex, Charly, Chechu, Cristina, Dani, Estrada, Fernández, Fran, Helena, Isa, Lourdes, Luci, Manolo, Paco, Pepe, Recio, Teo, Vero, Victoria y Zambrana. A Juanlu y a Javi, porque desde que nos conocimos en mi primer año de Universidad, a pesar de los kilómetros, siempre habéis estado ahí formando una parte indispensable de mi vida. Y, en especial, a mi *media pera* Rafa, quien ha sabido ser mi motor sin el cual no habría tenido fuerzas ni ganas para avanzar en el día a día. Cualquier palabra que os escriba para expresar mi agradecimiento se queda corta. Sólo queda decir: MUCHAS GRACIAS.

A M^a Isabel, por haber sido la felicidad encajada en una sola persona. Apareciste en mi vida en la etapa final de la Tesis, y como un haz de luz, te hiciste imprescindible para acabarla, sabiendo brindarme un apoyo incondicional. Además, has sido un copiloto de viajes y aventuras que ha sabido darme la vida cuando más lo necesitaba. Quizás nunca te lo he reconocido lo suficiente. Por todo y por mucho más, te estaré eternamente agradecido.

Por último, y no por ello menos importante, a toda mi familia. En especial, a mis padres Rafa y Rafi, y a mi hermana Ana, quienes siendo mi fuente de inspiración y camino a seguir, siempre me apoyasteis y creísteis en mí. A Daga, quien sin decir nada me lo demuestra constantemente. Y al nuevo dinosaurio de la familia, Manuel, que ha puesto a la familia patas arriba. Todo lo que soy, es gracias a vosotros.

Esta Tesis Doctoral es también de todos y cada uno de ellos. Por eso, una vez más, gracias.

A mi familia (de sangre y de lealtad)

ÍNDICE

RESUMEN	ii
ABSTRACT	vii
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1. Situación del sector lechero y objetivos de la Tesis Doctoral.	13
1.2. Microorganismos ambientales de interés en las ganaderías de ovino lechero.	16
1.3. Factores que afectan a microorganismos ambientales en ganaderías lecheras.....	25
1.3.1. El ambiente de la ganadería lechera.	25
1.3.2. Efecto de la temperatura sobre la calidad del aire.....	27
1.3.3. Efecto de la humedad sobre la calidad del aire.	28
1.3.4. Efecto de las condiciones de los alojamientos ganaderos sobre la calidad del aire.....	29
1.3.5. Efecto de la ventilación sobre la calidad microbiológica del aire de la ganadería.	31
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	37
2.1. Localización del experimento.	37
2.2. Diseño experimental.	38
2.3. Toma de muestras.	39
2.4. Análisis microbiológico diferencial.	40
2.5. Caracterización de los microorganismos de interés tecnológico: bacterias ácido-lácticas (BAL) y levaduras (Lev).	44
2.5.1. Análisis mediante RAPD-PCR e identificación de aislados de bacterias ácido-lácticas (BAL) y levaduras (Lev).	44
2.5.2. Estudio de biodiversidad de las bacterias ácido-lácticas (BAL) y de las levaduras (Lev).	48
2.6. Análisis estadísticos.	48
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
3.1. Descripción de las características microbiológicas en las ganaderías.	57
3.1.1. Recuento de Mesófilos Totales (RMT).....	59
3.1.2. Bacterias ácido-lácticas (BAL).	60
3.1.3. Levaduras (Lev).	61
3.1.4. Mohos (Mo).	62
3.1.5. Estafilococos (St).....	62
3.1.6. Bacterias formadoras de esporas aerobias (EA).	63
3.1.7. Esporas ácido-butíricas (BAB).	64
3.2. Influencia de las prácticas ganaderas sobre los distintos grupos microbianos.	65
3.2.1. Recuento de Mesófilos Totales (RMT).....	69
3.2.2. Bacterias ácido-lácticas (BAL).	73
3.2.3. Levaduras (Lev).	76
3.2.4. Mohos (Mo).	79

3.2.5.	Estafilococos (St).....	82
3.2.6.	Bacterias formadoras de esporas aerobias (EA).....	85
3.2.7.	Esporas ácido-butíricas (BAB).....	87
3.3.	Biodiversidad de las bacterias ácido-lácticas (BAL) en ganaderías de ovino manchego.....	88
3.3.1.	Genotipado e identificación de aislados de BAL.....	88
3.3.2.	Estudio de biodiversidad de las BAL.....	92
3.3.3.	Factores relacionados con la concentración de BAL en leche de tanque.....	96
3.4.	Biodiversidad de levaduras en ganaderías de ovino manchego.....	99
3.4.1.	Genotipado e identificación de aislados de levaduras.....	99
3.4.2.	Estudio de biodiversidad de levaduras.....	102
3.4.3.	Factores relacionados con la concentración de levaduras en leche.....	105
3.5.	Discusión final.....	110
4.	CONCLUSIONES.....	121
5.	CONCLUSIONS.....	123
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127
7.	ANEXOS.....	151

RELACIÓN DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Superficie territorial amparada por la DOP Queso Manchego (detalle en naranja oscuro) incluida en la región de La Mancha, dentro de la Comunidad Autónoma de Castilla-La Mancha (en gris oscuro) de España (Fundación de Consejo Regulador de la Denominación de Origen Queso Manchego, 2021).	37
Tabla 1. Condiciones para el recuento de los diferentes grupos microbianos.	42
Tabla 2. Concentración de los componentes de la mezcla de reacción de RAPD-PCR.	45
Tabla 3. Programas de amplificación usados en las reacciones RAPD-PCR dependiendo del microorganismo analizado.....	46
Tabla 4. Distribución de frecuencias (%) y la descripción estadística de las variables cuantitativas obtenidas mediante las respuestas de los ganaderos en la encuesta realizada.	52
Tabla 5. Estadísticos descriptivos de los microorganismos en las distintas matrices estudiadas de las ganaderías de raza Manchega.	57
Tabla 6. Asociaciones bivariadas (tau-B de Kendall) entre la concentración de los diferentes microorganismos en las diferentes matrices evaluadas.	66
Tabla 7. Dimensiones extraídas mediante componentes principales categóricas y saturaciones con las variables originales.	67
Tabla 8. Factores asociados con las dimensiones extraídas mediante modelos mixtos.	68
Figura 2. Medias de mínimos cuadrados de las dimensiones extraídas con la concentración de mesófilos totales (a: RMT-D1, b: RMT-D2) respecto a los factores incluidos en el modelo mixto con el mejor ajuste. Los colores indican diferencias significativas dentro de cada factor (Student–Newman–Keuls, SNK $p < 0,05$).	70
Figura 3. Medias de mínimos cuadrados de las dimensiones extraídas con la concentración de BAL (a: BAL-D1, b: BAL-D2) respecto a los factores incluidos en el modelo mixto con el mejor ajuste. Los colores indican diferencias significativas dentro de cada factor (Student–Newman–Keuls, SNK $p < 0,05$).	74
Figura 4. Medias de mínimos cuadrados de las dimensiones extraídas con la concentración de levaduras (a: Lev-D1, b: Lev-D2) respecto a los factores incluidos en el modelo mixto con el mejor ajuste. Los colores indican diferencias significativas dentro de cada factor (Student–Newman–Keuls, SNK $p < 0,05$).	77
Figura 5. Medias de mínimos cuadrados de las dimensiones extraídas con la concentración de mohos (a: Mo-D1, b: Mo-D2) respecto a los factores incluidos en el modelo mixto con el mejor ajuste. Los colores indican diferencias significativas dentro de cada factor (Student–Newman–Keuls, SNK $p < 0,05$).	80
Figura 6. Medias de mínimos cuadrados de las dimensiones extraídas con la concentración de estafilococos (a: St-D1, b: St-D2) respecto a los factores incluidos en el modelo mixto con el mejor ajuste. Los colores indican diferencias significativas dentro de cada factor (Student–Newman–Keuls, SNK $p < 0,05$).	83
Figura 7. Medias de mínimos cuadrados de la dimensión extraída con la concentración de microorganismos productores de esporas aerobias (EA-D1) respecto a los factores incluidos en el modelo mixto con el mejor ajuste. Los colores indican diferencias significativas dentro de cada factor (Student–Newman–Keuls, SNK $p < 0,05$).	86
Figura 8. Medias de mínimos cuadrados de la dimensión extraída con la concentración de esporas butíricas (BAB-D1) respecto a los factores incluidos en el modelo mixto con el mejor ajuste. Los colores indican diferencias significativas dentro de cada factor (Student–Newman–Keuls, SNK $p < 0,05$).	87
Figura 9. Porcentajes de cada especie presente para cada una de las matrices analizadas.	91

Tabla 9. Índice de Simpson de biodiversidad de especies en cada ganadería y en cada una de las matrices: el valor va de 0 a 1, donde 1 representa diversidad infinita y 0 representa sin diversidad.	93
Figura 10. Diversidad genética de cada una de las especies identificadas en las muestras analizadas.....	94
Tabla 10. Distribución de frecuencias de los factores categóricos considerados, y la asociación bivariada (ANOVA o <i>t</i> -Student) entre estos factores y la concentración de BAL en leche (\log_{10} UFC/ml).....	97
Tabla 11. Medias de mínimos cuadrados de los recuentos de BAL en la leche de tanque (\log_{10} UFC/ml) de las granjas de ovejas lecheras de raza Manchega para los factores incluidos en el modelo mixto de mejor ajuste.	98
Tabla 12. Presencia (+) o ausencia (-) de las diferentes cepas de levaduras identificadas en las matrices.	100
Figura 11. Índice Simpson (D) de biodiversidad para las especies de levaduras de cada ganadería. El valor oscila entre 0 y 1, siendo 1 diversidad infinita y 0 nula diversidad.	102
Figura 12. Índice Simpson (D) de biodiversidad para las especies de levaduras presentes en cada matriz.....	103
Figura 13. Diversidad genética de cada especie de levadura aislada en los ambientes de ganaderías de ovino Manchego.	104
Tabla 13. Distribución de frecuencias de los factores categóricos considerados.....	106
Figura 14. Asociación bivariada (ANOVA o prueba <i>t</i> de Student) entre la concentración de levaduras en la leche (\log_{10} UFC/ml) y los factores considerados. Lev-A1: presencia de levaduras en el aire de la sala de ordeño; Lev-A2: presencia de levaduras en el aire de la nave de las ovejas de ordeño; Lev-Ali: presencia de levaduras en el alimento; Lev-P: presencia de levaduras en la superficie de los pezones; Estación: estación del año; HigSO: higiene de la sala de ordeño; HigNO: higiene de la nave de las ovejas de ordeño; OriSO: orientación de la sala de ordeño; OriNO: orientación de la nave de ordeño; VentNO: ventilación de la nave de las ovejas de ordeño; LimpSO: frecuencia de limpieza de la sala de ordeño; Filtro: frecuencia de cambio del filtro de ordeño; Línea: Tipo de línea de ordeño; Contacto suelo: contacto frecuente de las pezoneras con el suelo; Ácido: frecuencia del uso de ácido en la limpieza de la máquina de ordeño; Ensilado: uso de ensilado en la alimentación de las ovejas de ordeño; Grano: dispensación de alimento durante el ordeño.	107
Tabla 14. Factores asociados con la concentración de levaduras en la leche de tanque (\log_{10} UFC/ml) de granjas de ovino lechero de raza Manchega utilizando un modelo mixto.	108
Figura 15. Medias de mínimos cuadrados de la concentración de levaduras en la leche de tanque (\log_{10} UFC/ml) de las ganaderías de oveja Manchega para los factores incluidos en el modelo mixto con mejor ajuste. Las medias con diferentes colores dentro de los factores varían (Student–Newman–Keuls, SNK $p < 0,05$).	109

LISTA DE ABREVIATURAS

AGRAMA: Asociación Nacional de Criadores de Ganado Ovino Selecto de raza Manchega.

AIC: criterio de información de Akaike.

Ali: muestra de alimento de las ovejas de ordeño.

ANOVA: análisis de la varianza.

A1: muestra de aire de la sala de ordeño.

A2: muestra de aire de la nave de las ovejas de ordeño.

BAB: bacterias del género *Clostridium* fermentadoras del lactato.

BAL: bacterias ácido-lácticas.

BBB: *Bryant-Burkey Broth* con resazurina y lactato.

CATPCA: análisis de componentes principales categóricos.

CERSYRA-IRIAF: Centro Regional de Selección y Reproducción Animal-Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Forestal de Castilla-La Mancha.

CLA: ácido linoleico conjugado.

CV: coeficiente de variación.

DOP: Denominación de Origen Protegida.

EA: bacterias formadoras de esporas aerobias.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

ESROM: Esquema de Selección de la Raza Ovina Manchega.

FAOSTAT: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.

FEGA: Fondo Español de Garantía Agraria.

FIV: factor de inflación de la varianza.

GABA: ácido gamma-aminobutírico.

GLM: modelo lineal generalizado.

HigNO: higiene de la nave de las ovejas de ordeño.

HigSO: higiene de la sala de ordeño.

HigT: higiene del tanque de ordeño.

HumNO: humedad en la nave de las ovejas de ordeño.

HumSO: humedad en la sala de ordeño.

IMI: infecciones intramamarias.

ISO: *International Organization of Standardization.*

L: muestra de leche de tanque.

LecheríaSO: existe comunicación directa lechería-sala de ordeño.

Lev: levaduras.

LimpSO: frecuencia de limpieza de la sala de ordeño.

MALDI-TOF: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight.*

MAPA: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Mo: mohos.

MRS: *Man, Rogosa y Sharpe.*

NMP: número más probable.

OriNO: orientación de la nave de ordeño.

OriSO: orientación de la sala de ordeño.

P: muestra de la superficie de los pezones de ovejas de ordeño.

RAPD-PCR: *Randomly Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction.*

RCS: recuento de células somáticas.

RevisiónT: periodicidad de revisión del tanque de ordeño.

RMT: recuento de microorganismos mesófilos aerobios totales.

SCN: estafilococos coagulasa negativos.

SCP: estafilococos coagulasa positivo.

spp.: especies.

St: *Staphylococcus* / estafilococos.

TAE: Disolución tampón formada por Tris, acetato y EDTA.

TempNO: temperatura en la nave de las ovejas de ordeño.

TempSO: temperatura en la sala de ordeño.

TipoT: tipo de tanque de ordeño.

UFC: unidades formadoras de colonias.

UPGMA: *Unweighted Pair Group Method using Average linkage.*

VentNO: ventilación de la nave de las ovejas de ordeño.

YPD: *Yeast Extract Peptone Dextrose.*

RESUMEN

RESUMEN

El sector de ovino de raza Manchega tiene entre sus principales objetivos la mejora de la calidad de la leche. Sus ganaderías están experimentando en las últimas décadas una profunda especialización a la aptitud lechera de la raza con importantes cambios de su sistema productivo y un mayor tamaño censal. Los sistemas de control de la calidad de la leche utilizan en la actualidad, como indicador higiénico, el recuento de microorganismos mesófilos totales (RMT), parámetro poco específico para determinar la presencia y el origen de los diferentes grupos de la flora microbiana de la leche de tanque. Estudios previos han tratado la calidad de la leche de oveja Manchega y su relación con determinadas características de las ganaderías, aportando conocimiento sobre estos grupos microbianos, aunque aún no habían tratado aspectos tan fundamentales como la calidad microbiológica del ambiente de las ganaderías. En esta línea, se plantea la presente Tesis Doctoral, con los objetivos de evaluar la microbiología ambiental de las ganaderías y su relación con la leche de tanque, identificar los factores ambientales y productivos que afectan a la calidad de la leche de las ganaderías de oveja Manchega, y caracterizar ciertos microorganismos de interés tecnológico, como las bacterias ácido-lácticas y las levaduras, presentes en el ambiente y en la leche de tanque.

Tras una revisión de los estudios científicos previos que ha permitido determinar los principales factores que afectan a la contaminación ambiental en las ganaderías lecheras, se seleccionaron doce ganaderías de oveja Manchega, que fueron visitadas para recabar información sobre sus características productivas y de manejo. Posteriormente se recogieron muestras en la ganaderías del aire del alojamiento de las ovejas de ordeño y de la sala de ordeño, de la alimentación de las ovejas de ordeño, de la superficie de los pezones y de la leche de tanque, para la determinación en medios selectivos de una serie de grupos microbianos de importancia higiénico-sanitaria y tecnológica: gérmenes



mesófilos, bacterias ácido-lácticas, levaduras, mohos, estafilococos, bacterias formadoras de esporas aerobias y esporas ácido-butíricas. Los microorganismos de interés tecnológico, bacterias ácido-lácticas y levaduras, han sido caracterizados a partir de los aislados en sus medios selectivos. Los análisis estadísticos han estado enfocados hacia el estudio de la relación entre los diferentes grupos microbianos con los factores asociados al ambiente y al sistema productivo de las ganaderías de oveja Manchega, con el objetivo final de determinar los riesgos asociados a estos factores y a la calidad de la leche de tanque de oveja Manchega.

Los resultados obtenidos aportan información sobre el diferente grado de contaminación microbiana en las diferentes matrices estudiadas y su repercusión en la leche de tanque. Este hecho pone de manifiesto que existe una interacción entre la flora microbiana de las distintas matrices, siendo de destacar la que se ha observado entre el aire de la nave y el de la sala de ordeño, o entre las distintas matrices y la superficie de las ubres, como vía directa de transmisión microbiana a través de las pezoneras a la leche de tanque. Es importante destacar el hecho de que la alimentación es la matriz con mayor recuento de los diferentes grupos microbianos. La contaminación de la superficie de pezones se relaciona con diversos factores y microorganismos, siendo de especial relevancia su relación con factores como la temperatura o la ventilación, así como con las condiciones de manejo e higiénicas de la nave y de la sala de ordeño o la utilización de ensilado en la alimentación animal. Se han determinado también las relaciones entre la flora microbiana de la ganadería con los factores ambientales y de manejo. Así, se ha observado la influencia de la temperatura, humedad o ventilación sobre diversos grupos como las bacterias ácido-lácticas, levaduras, mohos y estafilococos, y son interesantes otros factores de influencia sobre estos microorganismos, como la estación del año y el



uso de ensilado sobre las levaduras o la higiene de la nave de ordeño y el nivel de producción lechera sobre el nivel de estafilococos.

Los factores relacionados con la variación de los grupos microbianos que afectan principalmente a la leche de tanque son especialmente importantes, como el aumento de temperatura de la sala de ordeño sobre el recuento de mesófilos totales y de estafilococos, o como la elevada ventilación de la nave de ordeño sobre los estafilococos. Los factores ligados al manejo del ordeño (tipo de línea de la sala de ordeño, dispensación de alimento durante el ordeño, la utilización diaria del ácido en la limpieza de la sala de ordeño, el contacto de las pezoneras con el suelo, la mayor periodicidad del cambio de filtro, o una inadecuada higiene de la sala de ordeño) o de la alimentación, como el uso de ensilado, son relevantes en la variación de los diversos grupos de gérmenes en la leche de tanque.

Los resultados de la caracterización del grupo de bacterias ácido-lácticas, por su interés tecnológico, han mostrado la existencia de una amplia diversidad de géneros y especies en las distintas matrices, que pueden ser una fuente de contaminación de BAL para la leche de tanque. Existe una mayor diversidad de bacterias lácticas en leche de tanque y alimento de las ovejas de ordeño que en otras matrices como el aire de la nave y aire de la sala de ordeño, siendo esta última la matriz menos contaminada. Las especies mayoritarias como *Lb. pentosus/plantarum/paraplantarum* y *Lb. curvatus* son las que presentaron una menor variabilidad genética debido a la presencia de un genotipo predominante que parece presentar una mayor capacidad de dispersión y persistencia. También las levaduras han sido caracterizadas en todas las matrices estudiadas, aunque su presencia en el aire de nave de las ovejas de ordeño y de la sala de ordeño es muy bajo, lo que contrasta con su elevada presencia en el alimento de las ovejas de ordeño. En este estudio la especie predominante ha sido *C. parapsilopsis*, especialmente en alimento y



superficie de pezones, lo que indica su interés como fuente de contaminación de la leche de tanque.

A partir de estos resultados, se puede concluir que la presencia de los distintos grupos microbianos en el ambiente de la ganadería y los factores ambientales y de manejo de la propia ganadería condicionan la calidad de la leche de tanque de oveja. Los sistemas de control de calidad de la leche deberían estimar estos aspectos, instaurando programas de buenas prácticas en cada ganadería en base a los riesgos estudiados y sistemas de vigilancia analítica de los grupos microbianos en las principales fuentes de contaminación de la leche, incluidas las ambientales. La continuidad de los estudios en esta línea de investigación, en particular respecto a las bacterias lácticas y levaduras caracterizadas, contribuirán al mejor conocimiento de sus propiedades diferenciales en la elaboración de quesos y otros productos lácteos.



ABSTRACT

The Manchega breed sheep sector has among its main objectives the improvement of milk quality. Over the last few decades, its herds are experiencing an in-depth specialisation towards the dairy aptitude of the breed with important changes in its production system and a larger census size. Milk quality control systems currently use the count of total mesophilic microorganisms (TMC) as a hygienic indicator, which is not a very specific parameter for determining the presence and origin of the different groups of microbial flora of bulk tank milk. Previous studies have dealt with the quality of Manchega sheep's milk and its relationship with certain characteristics of the herds, providing knowledge about these microbial groups, although they had not yet dealt with such fundamental aspects as the microbiological quality of the environment of the herds. In this vein, this Doctoral Thesis is proposed, with the objectives of evaluating the environmental microbiology of livestock farms and its relationship with bulk tank milk, identifying the environmental and productive factors that affect the quality of milk from Manchega sheep farms, and characterising certain microorganisms of technological interest, such as lactic acid bacteria and yeasts present in the environment and in bulk tank milk.

After a review of previous scientific studies, which made it possible to determine the main factors that affect environmental contamination on dairy farms, twelve Manchega sheep farms were selected and were visited to gather information on their production and management characteristics. Subsequently, samples were collected from the air of the livestock housing and the milking parlour, from the animal feed, from the teat surface and from the bulk tank milk, for identification on selective media of a series of microbial groups of health and sanitary and technological importance: mesophilic germs, lactic acid bacteria, yeasts, moulds, staphylococci, aerobic spore-forming bacteria and butyric acid



Abstract

spores. The microorganisms of technological interest, lactic acid bacteria and yeasts, have been characterised from those isolated in their selective media. Statistical analyses have been focused on the study of the relationship between the different microbial groups with the factors associated with the environment and the productive system of Manchega sheep herds, with the final objective of determining the risks associated with these factors and the quality of the bulk tank milk from Manchega sheep.

The results obtained provide information on the different degree of microbial contamination in the different matrices studied and its impact on bulk tank milk. This shows that there is an interaction between the microbial flora of the different matrices, most noteworthy that which was observed between the air of the livestock housing and that of the milking parlour, or between the different matrices and the teat surface, as a direct route of microbial transmission through the teat cups to the bulk tank milk. It is important to highlight the fact that the feed is the matrix with the highest count of the different microbial groups. The contamination of the teat surface is related to various factors and microorganisms, its relationship with factors such as temperature or ventilation being of special relevance, as well as with the handling and hygienic conditions of the livestock house and the milking parlour or the use of silage in animal feed. The relationships between the microbial flora of livestock with environmental and management factors have also been determined. Thus, the influence of temperature, humidity or ventilation on various groups such as lactic acid bacteria, yeasts, moulds and staphylococci has been observed. Other factors of influence on these microorganisms are also interesting, such as the season of the year and the use of silage on the yeast or the hygiene of the milking house and the level of milk production above the level of staphylococci.



Abstract

The factors related to the variation of the microbial groups that mainly affect bulk tank milk are especially important, such as the effect of an increase in temperature of the milking parlour on the total mesophilic and staphylococcal count, or the effect of high ventilation in the milking parlour on staphylococci. Factors linked to milking management (type of line in the milking parlour, dispensing of feed during milking, daily use of acid in the cleaning of the milking parlour, contact of the teat cups with the ground, the highest frequency of filter change, or inadequate hygiene in the milking parlour) or feed, such as the use of silage, are relevant in the variation of the various groups of germs in the bulk tank milk.

The results of the characterisation of the group of lactic acid bacteria, due to their technological interest, have shown the existence of a wide diversity of genera and species in the different matrices, which can be a source of LAB contamination for bulk tank milk. There is a greater diversity of lactic acid bacteria in bulk tank milk and feed from milking sheep than in other matrices such as the air of the livestock housing and the air of the milking parlour, with the latter being the least contaminated matrix. The predominant species, such as *Lb. pentosus/plantarum/paraplantarum* and *Lb. curvatus*, are those that presented less genetic variability due to the presence of a predominant genotype that seems to present a greater dispersal and persistence capacity. Yeasts have also been characterised in all the matrices studied, although their presence in the air of the livestock housing and the milking parlour is very low, which contrasts with their high presence in the livestock feed. In this study, the predominant species was *C. parapsilopsis*, especially in the feed and on the teat surfaces, which indicates its interest as a source of contamination of bulk tank milk.

From these results, it can be concluded that the presence of the different microbial groups in the livestock environment, and the environmental and management factors of



Abstract

the livestock itself, determine the quality of the bulk tank milk from sheep. Milk quality control systems should estimate these aspects, establishing good practice programmes in each herd based on the risks studied and analytical surveillance systems for microbial groups in the main sources of milk contamination, including environmental ones. The continuity of the studies in this line of research, in particular with regard to the lactic acid bacteria and yeasts characterised, will contribute to a better understanding of their differential properties in the production of cheeses and other dairy products.



INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Situación del sector lechero y objetivos de la Tesis Doctoral.

El sector lechero en España es particularmente importante tanto desde el punto de vista agroalimentario como social, contribuyendo al sustento y desarrollo de la población rural. En dicho sector, el 87,7% del total de leche producida proviene del ganado vacuno, el 6,3% del ovino y el 5,9% del caprino (FEGA, 2019). A pesar de que la leche de oveja representa un bajo porcentaje en nuestro país, la contribución de España a la producción europea es relevante, siendo el tercer productor de leche de oveja en Europa (FAOSTAT, 2019), con alrededor de 400.000 toneladas al año (18% de la producción total).

La raza ovina Manchega es la raza autóctona de ovino lechero con mayor censo en España, distribuida en la región natural de La Mancha. El sector ovino manchego se ha definido tradicionalmente como un sistema mixto cereal-ovino, generalmente con explotaciones familiares semi-extensivas, que están evolucionando hacia una mayor intensificación, con un considerable aumento de ovejas por ganadería, cada vez más especializadas en la producción de leche (Rivas y cols., 2015). Los datos más recientes indican un censo en 2018 de 547.737 ovejas de raza Manchega distribuidas en 665 ganaderías (ESROM, 2018). En la actualidad, el objetivo principal de la raza es la producción de leche, destinada prácticamente en su totalidad a la fabricación de queso (Morantes y cols., 2017; Rivas y cols., 2019), en particular, de la figura de queso con calidad diferenciada más importante de España, el "Queso Manchego" con Denominación de Origen Protegida, que presenta un significativo perfil exportador. Esta especialización en producción lechera, con una tendencia a la intensificación de los sistemas de producción, ha condicionado enormemente diferentes aspectos del manejo de las



ganaderías (reproducción, alimentación, etc.), así como sus condiciones higiénico-sanitarias.

En este contexto, obtener leche de calidad se ha convertido en uno de los principales objetivos del sector ovino manchego, con el fin de proteger la seguridad alimentaria y proporcionar a la industria una materia prima con las mejores características para su procesamiento (Jiménez y cols., 2018). En la actualidad, la calidad higiénica de la leche de tanque se determina de forma rutinaria en los sistemas de control de calidad, mediante el recuento de microorganismos mesófilos totales (RMT), tal como establece el Reglamento (CE) nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo. Sin embargo, existen diferentes estudios que evidencian que este es un parámetro poco específico para determinar la presencia y el origen de los diferentes grupos microbianos de interés higiénico-sanitario y tecnológico en la leche de tanque (Gonzalo y cols., 2002; Jiménez y cols., 2018). Una de las fuentes de contaminación de la ganadería es el ambiente, que presenta una carga microbiana muy diversa, habiéndose comprobado que dichas comunidades microbianas tienen una relación directa con los microorganismos presentes en la leche de tanque (Montel y cols., 2003; Gonzalo y cols., 2019).

Además, la importancia de diferentes factores ambientales y de diseño relacionados con la ganadería (como la orientación, la ventilación, la temperatura, la humedad, etc.), que afectan a la calidad del aire, deben de ser tenidos en cuenta para estimar la microbiología existente en el ambiente como una herramienta para la mejora de la calidad de la leche y de sus productos. Sin embargo, tanto las fuentes de contaminación como los factores de origen ambiental que pueden afectar a los diferentes grupos microbianos de la leche no han sido investigados en profundidad (Vacheyrou y cols., 2011).



Objetivos de la Tesis Doctoral

En este contexto, este estudio se plantea dentro del marco descrito de especialización lechera y de cambios en el sistema de producción del ovino manchego, debido a las escasas investigaciones relacionadas con la contaminación microbiana de los ambientes de la ganadería, con el objetivo general de estudiar las comunidades microbianas de las ganaderías de ovino lechero y la influencia de los factores ambientales y productivos asociados. Para su consecución se han planteado diversos objetivos que se detallan a continuación:

- ❖ Evaluación de la microbiología ambiental de las ganaderías y su relación con la calidad microbiológica de la leche de tanque.
- ❖ Identificación de los factores ambientales y productivos que afectan a la calidad de la leche de las ganaderías de oveja Manchega.
- ❖ Estudio de la diversidad genética de microorganismos de interés tecnológico (bacterias ácido-lácticas y levaduras) presentes en el ambiente y en la leche de tanque.

Estos objetivos se han abordado mediante el estudio de la presencia de distintos microorganismos (gérmenes totales, bacterias lácticas, levaduras y mohos, estafilococos y microorganismos esporulados) en el ambiente de los alojamientos de las ovejas de ordeño y de la sala de ordeño, en la alimentación de las ovejas de ordeño, en la superficie de los pezones y en la leche de tanque, y su relación con distintos factores asociados al ambiente y al sistema productivo de las ganaderías de oveja Manchega, con el objetivo final de determinar los riesgos asociados a estos factores y optimizar las actuaciones encaminadas a mejorar la calidad de la leche de tanque de la raza Manchega.



1.2. Microorganismos ambientales de interés en las ganaderías de ovino lechero.

La leche presenta una microbiota muy variada que puede provenir de diferentes fuentes y tener multitud de efectos, tanto positivos como negativos, sobre la calidad higiénico-sanitaria y tecnológica de la leche y sus productos derivados. Por ello, es importante la estimación de los diferentes grupos microbianos y las diferentes rutas de contaminación de la leche, en el marco de la seguridad de los productos alimenticios (Quigley y cols., 2013).

Los microorganismos aerobios mesófilos constituyen un grupo compuesto por diversas bacterias, levaduras y hongos filamentosos cuyo crecimiento óptimo se sitúa en un rango de temperaturas entre 25 y 40°C. Son gérmenes que forman colonias contables en el medio de cultivo, en condiciones de aerobiosis, y a una temperatura y tiempo determinado; la norma de referencia para microbiología de los alimentos para consumo humano y animal (Norma ISO 4833:2003) especifica una incubación a 30°C durante 72 horas, no existiendo normas de referencia para la calidad del aire. En la actualidad, los sistemas de control de la calidad de la leche realizan recuentos de colonias de gérmenes a 30°C como criterio de calidad higiénica de la leche, en cumplimiento del Reglamento (CE) nº 853/2004; para leche de pequeños rumiantes, esta legislación establece un máximo de 500.000 UFC/ml en el caso de leche cruda destinada a la fabricación de productos lácteos, mediante un proceso que no implique ningún tratamiento térmico, y de 1.500.000 UFC/ml para la leche que va a ser sometida a tratamiento térmico. Sin embargo, diversos autores como Jayarao y cols. (2004) consideran que este indicador es poco específico para evaluar la calidad higiénica de la leche, y plantean la necesidad de determinar otros grupos microbianos específicos de interés higiénico-sanitario y tecnológico, y su relación con las diferentes prácticas productivas de las ganaderías. En



general, los recuentos de mesófilos totales son más elevados en ovino lechero que en vacuno; De Garnica y cols. (2013) indican que una de las causas sería la ausencia del lavado de pezones previo al ordeño e instalaciones higiénicamente más deficientes que las del ganado vacuno. Diversos estudios realizados en leche de tanque en España han tenido resultados similares respecto a los mesófilos totales, con recuentos medios de 5,36 \log_{10} UFC/ml (CV=13,59%) en leche de tanque de Castilla y León (De Garnica y cols. (2011) y de 5,38 \log_{10} UFC/ml (CV=13,56%) en leche de oveja Manchega (Jiménez, 2019).

Desde el punto de vista de la tecnología quesera hay que destacar las bacterias ácido-lácticas (BAL) y las levaduras. Las BAL son un grupo de microorganismos representados por varios géneros (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacteria*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Pediococcus*, entre otros) con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común; son cocos o bacilos gram positivos, ácido-tolerantes, que producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos (Carr y cols., 2002). Las BAL tienen una gran importancia tecnológica por su rápida actividad acidificadora, siendo diversas especies muy utilizadas como cultivos iniciadores en la producción de queso y otros productos derivados. Asimismo, este ambiente ácido provoca que otros microorganismos indeseables no sobrevivan (Johnson y Steele, 2013), teniendo incluso propiedades bioconservadoras frente al desarrollo de patógenos en el proceso de maduración del queso (Kongo, 2013); en este sentido, se ha descrito que pueden ejercer cierta actividad antimicrobiana inhibiendo el crecimiento de bacterias como los estafilococos (Montel y cols., 2014; Caraffa y cols., 2016), lo cual les confiere un gran interés para la seguridad alimentaria. Desde el punto de vista tecnológico, las BAL contribuyen a las propiedades organolépticas de la leche y de los productos lácteos; su acción enzimática induce a la rotura de las caseínas provocando el



desarrollo de las características propias de los quesos curados y semicurados, al formar pequeños péptidos y aminoácidos libres que se transforman posteriormente en alcoholes, aldehídos, ácidos y ésteres (Poveda y cols., 2004; Smit y cols., 2005). Asimismo, se han descrito sus beneficios desde el punto de vista nutritivo (Ramírez-Ramírez y cols., 2011) y se ha podido observar que varias cepas de BAL son potencialmente productoras de ácido linoleico conjugado (CLA), ácido gamma-aminobutírico (GABA) y otros compuestos bioactivos (Ogawa y cols., 2005; Renes y cols., 2017). Sin embargo, no todas las BAL tienen propiedades tecnológicas beneficiosas o saludables, ya que algunas cepas pueden provocar efectos negativos, como por ejemplo la producción de aminas biógenas (Zuljan y cols., 2016). Las BAL son un grupo de microorganismos de especial interés para este estudio, ya que se encuentra en grandes cantidades en el ambiente y en el aparato digestivo; además, algunos estudios en vacuno han encontrado el mismo tipo de bacterias BAL en la superficie del pezón y en la leche cruda, revelándose como posible fuente de este tipo de bacterias en la leche de tanque (Vacheyrou y cols., 2011). Diversos estudios realizados en oveja indican un amplio rango de recuentos de BAL en leche de tanque, desde 4,20 a 7,08 log₁₀ UFC/ml (Gaya y cols., 1999; Pérez-Elortondo y cols., 1999; Delavenne y cols., 2012; Centi y cols., 2017; Jiménez y cols., 2018).

Al contrario que en el caso de las bacterias, el papel de la población de hongos como las levaduras no se ha estudiado con tanta profundidad en el sector lácteo. Las levaduras están siempre presentes dentro de la industria quesera, tanto en las instalaciones como en cualquier tipo de queso; incluso pueden ser empleadas como cultivos iniciadores secundarios dependiendo del tipo de queso, activando el crecimiento de la microbiota láctica mediante el aumento del pH en el queso (Esteban, 2018). Además, las levaduras contribuyen al proceso de maduración de los quesos, utilizando el ácido láctico para este incremento en el pH, evitando así el crecimiento de bacterias proteolíticas (Yildiz y cols.,



2021). Del mismo modo, liberan al medio factores de crecimiento y vitaminas (ácido pantoténico, niacina, riboflavina) (Cano-García y cols., 2013), contribuyendo a una potenciación del desarrollo de la microbiota principal y colaborando en la creación del aroma propio del queso a través de la actividad proteolítica, lipolítica y de la liberación al medio de compuestos volátiles (Padilla y cols., 2014a). Por otro lado, elevadas concentraciones de levaduras conllevan un deterioro en el queso y la modificación de la apariencia propia de la superficie o del interior del queso debido a dicha actividad proteolítica y/o lipolítica, la liberación de aromas indeseables y la generación de gas; el mismo aumento de pH que permite el crecimiento de los *starters* primarios también permite el crecimiento de bacterias indeseables como es el caso de *Staphylococcus aureus* o *Listeria monocytogenes*. (Esteban, 2018). La gran mayoría de especies de levaduras aisladas en los quesos pertenecen a los géneros *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Pichia* y *Yarrowia* (Binetti y cols., 2013; Padilla y cols., 2014b; Banjara y cols., 2015; Ceugniz y cols., 2015). Las levaduras están presentes de forma natural en la leche cruda, pero en bajas concentraciones, entre 10^3 - 10^4 UFC/ml, seguramente debido a la competencia con las bacterias aerobias psicrófilas, mejor adaptadas a la supervivencia en un ambiente frío (Von Neubeck y cols., 2015). Según el estudio de Esteban (2018), el queso elaborado con leche cruda presenta los mismos recuentos bajos de levaduras que los observados en la leche, mientras que en los quesos elaborados con leche pasteurizada (donde las levaduras reducen su presencia por debajo de los límites de detección de los métodos de recuento debido a su baja termorresistencia) el origen de las levaduras parece ser las instalaciones de la quesería. Diversos estudios han demostrado que las levaduras forman parte de las instalaciones queseras (Viljoen y Greyling, 1995; Welthagen y Viljoen, 1998, 1999), por lo que la realización de un estudio



de las diferentes poblaciones de levaduras en las industrias lecheras donde se obtiene la materia prima, requiere especial atención para la elaboración de queso.

Le leche cruda es una secreción muy nutritiva que proporciona las condiciones necesarias para el crecimiento de diversas especies de hongos, que se ven influenciadas por el clima, el estado fisiológico del animal y por diversas prácticas ganaderas (Delavenne y cols., 2011; Quigley y cols., 2013). La presencia de hongos en las muestras de leche cruda de las ganaderías también podría atribuirse a pezoneras contaminadas, a carencia de higiene y de desinfección de pezones, a contaminación por operarios y a la presencia en el aire o en materiales de desinfección (Dubie y cols., 2015). Según Luigi y cols. (2013), el límite máximo recomendado de hongos en la leche de ganado vacuno es de 10^2 UFC/ml, lo que debe ser tenido en cuenta para determinar el riesgo de infección por consumo. En particular, los mohos están presentes habitualmente en el ambiente de las ganaderías, por lo que su estudio es importante puesto que pueden alterar la inocuidad de los alimentos principalmente por la presencia de las micotoxinas que producen (Ortiz-Durán y cols., 2017). Los mohos son capaces de metabolizar el ácido láctico y producir amoníaco, elevando el pH y con ello favoreciendo la aparición de bacterias tolerantes a la sal y sensible a los ácidos (Montel y cols., 2014). Las cepas más comunes encontradas en la leche y sus derivados pertenecen a los géneros *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium* y *Penicillium* (Sahelices, 2018). Aunque la mamitis ha sido asociada más a agentes bacterianos, existen mamitis de origen micótico donde participan mohos, generalmente relacionadas con el uso de antibióticos contaminados (Krukowski y Saba, 2003) y de jeringas u otros materiales en contacto con la glándula mamaria (Zaragoza y cols., 2011). Esta infección de origen micótico supone un bajo porcentaje de las mamitis reportadas, entre el 1% y el 12% del total en el ganado vacuno (Ortiz-Durán y cols., 2017). La identificación de estos microorganismos mejora el conocimiento con respecto a su



epidemiología y permite conocer los puntos críticos con respecto a la higiene en la ganadería, para tomar acciones correctivas para disminuir su presencia en la leche de tanque.

Los *Staphylococcus*, o estafilococos, son células esféricas gram positivas que crecen con rapidez sobre muchos tipos de medios y son metabólicamente activos. Algunos son miembros de la flora normal de la piel y mucosa de los seres vivos, pero hay también patógenos capaces de producir enzimas termoresistentes y toxinas extracelulares. Los estafilococos pertenecen al grupo de gérmenes que mayoritariamente causa las infecciones intramamarias (IMI), provocando importantes pérdidas económicas en los rebaños. Las IMI pueden cursar de forma clínica, teniendo generalmente en ovino lechero una incidencia baja, de menos del 5% (Bergonier y cols., 2003; Contreras y cols., 2007), y de forma subclínica, afectando a la producción de leche y a su calidad (Albenzio y cols., 2002; Leitner y cols., 2004). La especie principalmente involucrada en las formas clínicas es el *Staphylococcus aureus*, germen perteneciente al grupo de estafilococos coagulasa positivo (SCP) que pueden formar biofilms que les permiten sobrevivir en condiciones desfavorables (Costerton y cols., 1999). Además, puede provocar toxiinfecciones alimentarias por la capacidad de algunas cepas de producir enterotoxinas termoestables, así como de adquirir resistencia antibiótica (Vautor y cols., 2007); por ello, el Reglamento (CE) n° 2073/2005, limita a 10^5 UFC/g el contenido máximo de estafilococos coagulasa positivos en queso, en cuyo caso deben revisarse las condiciones higiénico-sanitarias de producción de leche en la ganadería de origen de la leche. Las mamitis subclínicas en ganado ovino lechero cobran una especial relevancia, siendo causadas generalmente por estafilococos coagulasa negativos (SCN), bacterias oportunistas de la superficie de la piel y que contaminan la glándula mamaria a través del canal del pezón. Es un grupo con un buen número de especies, aunque el microorganismo con mayor prevalencia es



Staphylococcus epidermidis (de la Cruz y cols., 1994; Gonzalo y cols., 2002). En leche de tanque, en general, existe una predominancia de los estafilococos coagulasa negativos sobre los positivos, explicándolo algunos autores por la habilidad de los SCN para desarrollarse en los actuales sistemas de producción más intensivos (Marogna y cols., 2010), o por la aplicación de medidas eficaces contra los patógenos principales como es *S. aureus* (Makovec y Ruegg, 2003; Sampimon y cols., 2004); en esta línea, Jiménez (2019), en leche de tanque de oveja Manchega, indica valores medios de SCP=2,50 log₁₀ UFC/ml (CV=55,01) y de SCN=4,32 log₁₀ UFC/ml (CV=12,72). Se han descrito diversos factores asociados con la contaminación de estafilococos en las ganaderías, como las prácticas higiénicas incorrectas de manejo, el agua, el equipo de ordeño y también, el medioambiente (Jørgensen y cols., 2005). Gonzalo y cols. (2005) indican la importancia de optimizar los protocolos de uso, limpieza y desinfección de la máquina de ordeño y las rutinas de ordeño para mejorar la salud de la ubre, ya que pueden persistir durante largos periodos en diversas localizaciones, como los equipos de ordeño, por su capacidad de producir biofilms (Pilipčincová y cols., 2010). En raza Manchega, Gómez y cols. (1997) evidenciaron una menor incidencia de mamitis en ganaderías con correctas medidas higiénicas y uso sistemático de tratamientos farmacológicos de secado. Jiménez (2019), en leche de tanque de raza Manchega, observó mayores recuentos de estafilococos en ganaderías con mayor número de puestos de ordeño, higiene deficiente, utilización de subproductos en la alimentación, falta de revisión de la maquinaria de ordeño, y no aplicación de desinfección de pezones post-ordeño.

Las bacterias formadoras de esporas aerobias también forman parte de la microflora de la leche, estando representadas en gran medida por gérmenes del género *Bacillus*. Diversos estudios sobre su incidencia y factores de riesgo continúan realizándose en leche y productos lácteos de vaca (Kable y cols., 2016; Marangoz y cols., 2018), sin que en



ovino lechero hayan tenido especial relevancia. Estos microorganismos gram positivos, son capaces de producir endosporas termoresistentes que provocan alteraciones de la leche durante su conservación. Aunque son escasos los estudios en queso, Iurlina y cols. (2006) describen la presencia de *Bacillus* en quesos de vaca, que provocan alteraciones lipolíticas y proteolíticas durante la maduración; de igual forma, Cosentino y cols. (1997), estudian la incidencia de *Bacillus* spp. en quesos tipo Ricotta. Otros estudios en vacuno lechero han indicado el origen de contaminación de la leche. Respecto a la alimentación, se ha descrito que el uso de ensilado (de Giffel y cols., 2002) o de bagazo de cerveza (Torp y cols., 2001) aumenta el riesgo de contaminación de esporas en leche. Asimismo, el aire del establo es una posible fuente de contaminación, aunque hay estudios como los de de Giffel y cols. (1995) y Christiansson y cols. (1997) que indican que el número de esporas de *B. cereus* en el aire es demasiado pequeño para que sea relevante en la contaminación de la leche. Sin embargo, sí se ha encontrado un gran número de esporas aerobias en las heces y camas de las explotaciones de vacuno (McKinnon y Pettipher, 1983; Magnusson y cols., 2007), así como en el equipo de ordeño, debido a deficiencias en el método de limpieza de la máquina (Scheldeman y cols., 2005; Magnusson y cols., 2007). Respecto a los niveles de contaminación, se han descrito niveles bajos en leche de vaca, <10 esporas/ml (Michel y cols., 2001). Sin embargo, los estudios en vacuno indican niveles de contaminación importantes en las camas de hasta 87.000 esporas/g, en el agua de enjuague de la máquina de ordeño (322 esporas/L) o en alimentos contaminados que ocasionan niveles en heces superiores a 100.000 esporas/g (Magnusson y cols., 2007). Este mismo estudio ha indicado bajos niveles de esporas de *Bacillus cereus* en el aire en los alojamientos o en la zona de ordeño, entre 145-330 esporas/g.

El ambiente de las ganaderías es una fuente de contaminación de microorganismos esporulados en la leche de tanque. De entre ellos, por ser la causa de la “hinchazón tardía”,



dando lugar a un grave problema tecnológico en la industria quesera, cabe citar las bacterias del género *Clostridium*. Éstos, son bacilos gram positivos, anaerobios obligados o aerotolerantes, con capacidad de formar endosporas termorresistentes (Vissers y cols., 2006), resistentes a agentes químicos (Moir, 2006; Plomp y cols., 2007). Se encuentran ampliamente distribuidas en el medio ambiente y en numerosos hábitats, principalmente suelo, plantas, ensilados (Colombari y cols., 2005; Julien y cols., 2008). Las esporas son capaces de sobrevivir en la leche y cuando las condiciones son favorables, se desarrollan produciendo ácido butírico y grietas y cavernas en los quesos (Thomas y cols., 2012). Garde y cols. (2011) y Arias y cols. (2013), en leche de tanque de raza Manchega, indican que la especie más aislada es *C. sporogenes*, aunque también observan la presencia de otras especies como *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum* y *C. beijerinckii*. Los recuentos medios de esporas butíricas en leche de tanque de ganaderías de oveja Manchega se sitúan en el rango entre 3,29-3,41 log₁₀ esporas/L (Arias y cols., 2013; Jiménez y cols., 2018), aunque han sido citados recuentos superiores en leche de oveja, entre 4,16 y 4,13 log₁₀ esporas/L (Salmerón y cols., 2002; Garde y cols., 2011). Por el riesgo de este problema tecnológico en la producción de queso, los sistemas de control de la calidad de la leche han establecido diversos límites de penalización, como el de 1,00 espora/ml para la leche de las ganaderías de la región francesa de Pirineos Atlánticos (Pirisi y cols., 2007). La necesidad de controlar el riesgo de la contaminación por esporas butíricas de la leche de oveja, propició los estudios de Arias y cols. (2013, 2016), que determinaron diversos factores de riesgo como el tipo de alimentación de las ovejas de ordeño (ensilados o subproductos húmedos tipo bagazo de cerveza), o la higiene del alojamiento y de la sala de ordeño. El resultado medio del recuento esporas butíricas de la mezcla unifeed de las ovejas de ordeño de raza Manchega fue de 3,38 log₁₀ esporas/g (Arias y cols., 2016), menor que el recuento de 4,20 log₁₀ esporas/g aportado por Vissers y cols. (2007a) en



ganaderías de vacuno lechero, pero de calidad mediocre respecto a los rangos establecidos por Baraton (1985) y Coussi (1988).

1.3. Factores que afectan a microorganismos ambientales en ganaderías lecheras.

(Este apartado se corresponde con el Artículo 1 del Anexo 2)

En los últimos años, ha existido una tendencia al estudio de la microbiología ambiental de las ganaderías lecheras, debido principalmente a que pueden afectar a las comunidades microbianas presentes de forma natural en la leche (Montel y cols., 2003). La implementación de buenas prácticas veterinarias en el rebaño, así como una buena gestión e higiene de la sala de ordeño, puede evitar la contaminación directa de la leche a través de los microorganismos ambientales (Fischer y cols., 2015). Sin embargo, no es fácil controlar la calidad microbiológica ambiental de las ganaderías lecheras, debido tanto a factores internos de la propia ganadería (como el sistema de producción y de manejo, el espacio disponible para los animales, orientación de las naves, etc.) así como a factores propiamente ambientales (temperatura, humedad, vientos dominantes, etc.). Por ello, se ha realizado una revisión bibliográfica donde se ha analizado los factores más importantes que pueden llegar a afectar la carga microbiológica del ambiente de las ganaderías, para poder establecer una serie de medidas preventivas en la explotación y conseguir así mantener una producción de calidad en la leche y sus productos derivados.

1.3.1. El ambiente de la ganadería lechera.

En las explotaciones ganaderas existe un ambiente dinámico y muy complejo, debido a la gran diversidad microbiana presente en las diferentes áreas de la instalación (McAuley y cols., 2014). Esto es debido a que el aire que circula entre las diferentes dependencias actúa como vehículo de dispersión de partículas y bioaerosoles, donde los



microorganismos pueden adherirse para desplazarse y depositarse en otras zonas adyacentes (Curiel y cols., 2000). El aire, como vehículo de diseminación de los microorganismos ambientales, ha sido previamente estudiado en industrias lácteas (Brandl y col., 2014), aunque pocos estudios se han dedicado a investigar la microbiología ambiental en las ganaderías desde el punto de vista de la contaminación de la leche de tanque (Vacheyrou y cols., 2011). Sin embargo, la carga microbiana presente en el ambiente puede tener un efecto positivo para la calidad de la leche, ya que existen microorganismos como las bacterias ácido-lácticas y las levaduras de interés en la tecnología quesera, con efecto protector frente a patógenos ambientales (Donnelly, 2001), de mejora del perfil nutricional y de las propiedades organolépticas de la leche, tal y como se ha observado en otros sectores agroalimentarios como el enológico (Pérez-Martín y cols., 2014). Sin embargo, la información disponible sobre la calidad microbiológica en el interior de los alojamientos ganaderos es escasa (Popescu y cols., 2011); además, el origen de la contaminación de la leche por microorganismos ambientales y los factores de variación de la contaminación no han sido prácticamente estudiados (Vacheyrou y cols., 2011).

Por ejemplo, el manejo del ordeño es de gran importancia para la contaminación ambiental de la sala de ordeño, ya que se puede estar condicionada por la carga ganadera, las condiciones higiénicas de la sala de ordeño (heces, polvo, etc.) y su rutina de limpieza, la dispensación de alimento en la propia sala, el gado de suciedad de las ubres, etc., con el consiguiente riesgo de contaminación de la leche de tanque (Vissers y Driehuis, 2009). Del mismo modo, el grado de higiene de los alojamientos de las ovejas de ordeño es un factor de variación de la calidad microbiológica de la leche de tanque (Jiménez y cols., 2015), que estaría condicionada por factores de manejo como la carga ganadera, el movimiento de animales, el tipo de alimentación, el mantenimiento de las camas, etc., y



que contribuyen a la carga microbiana del aire, de la superficie de las ubres, etc. (Vissers y cols., 2007b; Bouton, 2011). Rolesu y cols. (2018) ya demostraron que mantener una higiene correcta en el establo, cambiando asiduamente las camas sucias de los animales, reduce drásticamente la microbiota de la ganadería asociada a enfermedades del ganado.

Como es lógico, la industria quesera también se ve afectada por la contaminación ambiental, puesto que el aire transporta a los microorganismos hasta la leche de tanque, comprometiendo el producto final como es el queso (Kure y cols., 2004). Mantener una correcta calidad higiénica de la leche es vital para la elaboración de queso (Albenzio y cols., 2005). Por todo ello, es importante investigar las posibles rutas de contaminación de la leche a través del ambiente de la ganadería.

1.3.2. Efecto de la temperatura sobre la calidad del aire.

La temperatura juega un papel muy importante en el ambiente de las ganaderías, condicionando de forma notoria sus comunidades microbianas, efecto que se agravará en los sistemas ganaderos con el paso de los años debido al cambio climático (Marino y cols., 2016). La concentración de microorganismos en el ambiente es muy compleja y variable, sujeta a las condiciones microclimáticas de cada zona geográfica (Pangloli y cols., 2008), dependiendo en gran parte de la estación (Vissers y cols., 2007c) y de la temperatura en el momento del estudio (Popescu y cols., 2011).

En este sentido, es importante que el propio diseño de la explotación proporcione protección frente a las condiciones climáticas desfavorables, sobre todo en las zonas donde la climatología sea más dura. Así se podría asegurar unas condiciones óptimas para los animales, evitando que incrementen su tasa de respiración, hecho que contribuye a la polución del aire (Caroprese, 2008). En el ámbito de los pequeños rumiantes, la temperatura óptima para una producción láctea eficiente debe de estar entre los valores de 5°C y 20°C (Sevi y cols., 2009; Ramón y cols., 2016).



Asimismo, la variación de las temperaturas puede condicionar la calidad microbiológica del aire. Así, se ha citado que en épocas con altas temperaturas aumenta la contaminación ambiental, incrementando el riesgo de contaminación de la leche de tanque durante el ordeño (Calamari y cols., 2018), especialmente en las ganaderías con unas condiciones higiénicas deficientes (Vissers y Driehuis, 2009). Del mismo modo, Jiménez (2019) observó diferencia entre las estaciones en ganaderías de ovino manchego, viéndose aumentados los recuentos de algunos microorganismos de origen ambiental como las BAL o los estafilococos. Sin embargo, existen otros estudios, como el de Adhikari y cols. (2004) donde se observa un mayor recuento de microorganismos en el ambiente durante el invierno, lo que puede ser debido a las diferencias microclimáticas entre los distintos países donde se realiza el estudio.

En cuanto a bienestar animal, es aconsejable tomar una serie de medidas según la estación. Por ejemplo, proporcionar sombra en el establo durante las horas de calor extremo minimiza el impacto en el bienestar animal, mejorando la calidad del aire y, por lo tanto, la calidad de la leche (Sevi y cols., 2009); evitando así la reducción de la capacidad defensiva de la ubre debido a una exposición continuada a la radiación, lo que puede permitir la contaminación de la glándula mamaria por patógenos ambientales (Caroprese, 2008). En invierno, es necesario evitar alojamientos mal condicionados, que mantiene al rebaño húmedo en épocas donde las temperaturas son bajas, lo que disminuye su bienestar (Núñez y Callejo, 2006).

1.3.3. Efecto de la humedad sobre la calidad del aire.

El nivel de humedad en las ganaderías es importante, sobre todo, para el bienestar de los animales, debido a que la infectividad de los patógenos que se encuentran en el medio ambiente depende de este nivel (Xiong y cols., 2017). Pero también es importante destacar que la humedad en las explotaciones ganaderas es un factor que condiciona la



contaminación ambiental, ya que existe una relación entre las variaciones de humedad y algunos microorganismos como los hongos (Popescu y cols., 2011).

La humedad relativa, aunque está condicionada por otros factores como la ventilación, la temperatura y las instalaciones de la ganadería (con los que forma un sistema interrelacionado entre sí), también se encuentra condicionada por la carga ganadera, habiéndose visto necesario que los animales dispongan de espacio disponible suficiente por motivos de bienestar animal (Sevi y cols., 1999; Jimeno, 2004). Si no se dan las condiciones adecuadas para obtener valores adecuados de humedad en la ganadería, la concentración de microorganismos patógenos en el ambiente se ve incrementada.

Un dato importante en este aspecto es que los animales tienen poca tolerancia a los cambios de humedad. Por ello, Sevi y cols. (2009) establecieron que el valor de humedad para una adecuada condición ambiental y sanitaria en pequeños rumiantes era de $\leq 70\%$. Este umbral coincide con el nivel óptimo para la supervivencia de la mayoría de microorganismos (Xiong y cols., 2017), existiendo una relación entre el incremento de la humedad y una mayor concentración de microorganismos en el ambiente (Popescu y cols., 2011), siendo los hongos los microorganismos más condicionados por el nivel de humedad. Esto es debido a que las condiciones de alta humedad relativa en el ambiente facilitan la descomposición de la materia orgánica en el establo, lo que provoca un aumento de la carga de esporas fúngicas en el ambiente (Adhikari y cols., 2004).

1.3.4. Efecto de las condiciones de los alojamientos ganaderos sobre la calidad del aire.

El diseño del alojamiento de animales de ordeño en la ganadería tiene un papel fundamental en el bienestar animal (Callejo, 1998), pero además puede influir en la calidad microbiológica del ambiente. Así, tanto Callejo (1998) para vacuno como Sevi y



cols. (2001) para pequeños rumiantes establecieron un volumen óptimo por animal de 35–40 m³/animal y al menos 7 m³/animal respectivamente, con el fin de evitar el incremento de mesófilos totales en el ambiente.

Uno de los factores más importantes por el que se ve afectado la microbiota ambiental es la condición higiénica de la nave de las ovejas de ordeño, que puede verse afectada por diversas fuentes de contaminación microbiológica: animales, aire, camas, suelo, alimento, etc. Las diversas dependencias de la ganadería están interrelacionadas a través del ambiente, por lo que es necesario realizar un correcto mantenimiento higiénico de ellas, sobre todo en aquellas explotaciones con sistema intensivo donde se ha evidenciado una higiene más deficiente (Wathes, 1994). En particular, es importante el buen manejo y mantenimiento de las camas, ya que la concentración de microorganismos ambientales tiende a ser mayor en aquellas ganaderías donde la cama no se renueva frecuentemente (Sevi y cols., 1998; Popescu y cols., 2011).

Otro factor a tener en cuenta es el espacio disponible por animal. La concentración de partículas y microorganismos en el ambiente está inversamente relacionada con este espacio, de modo que la concentración de mesófilos totales se ve reducida cuando los pequeños rumiantes disponen al menos de 2 m²/animal y el recuento de células somáticas (RCS) es hasta cuatro veces menor que en otras ganaderías con menos espacio disponible (Sevi y cols., 1999).

Del mismo modo, la alimentación es una fuente de contaminación del ambiente de la explotación, que finalmente puede ser un riesgo para la leche de tanque (Vissers y Driehuis, 2009). Por ejemplo, los microorganismos esporulados de los alimentos pueden atravesar el tracto digestivo y, siendo excretados con las heces, contaminar las camas de los alojamientos y colonizar la superficie de las ubres y al propio ambiente de las ganaderías (Calamari y cols., 2018).



El ambiente de la sala de ordeño es otro punto crítico de la contaminación de la leche de tanque de la ganadería. Verdier-Metz y cols. (2009) señalan que es el mantenimiento de unas correctas condiciones higiénicas de la sala de ordeño, así como de la rutina de ordeño evita la proliferación de bacterias indeseables en el ambiente. Además, se ha descrito que una deficiente higiene en la sala de ordeño tiene efectos negativos en la calidad de la leche, en particular sobre los microorganismos termodúricos y butíricos (Jiménez, 2019) o sobre el recuento de células somáticas (Arias y cols., 2013).

1.3.5. Efecto de la ventilación sobre la calidad microbiológica del aire de la ganadería.

Los diferentes regímenes de ventilación de los alojamientos de la ganadería tienen como objetivo mantener una calidad de aire óptima y el control de la contaminación ambiental. El aire, y la velocidad a la que se desplaza dentro de las diferentes salas de una ganadería, tiene una gran influencia en el flujo de los microorganismos. Esta dispersión de bacterias se ha descrito en diferentes ambientes (Popescu y cols., 2011; Pérez-Martín y cols., 2014) y microorganismos, como los hongos (Sen y Asan, 2009). Un régimen de ventilación adecuado debe proporcionar el oxígeno necesario para los animales, eliminar los gases nocivos, eliminar el exceso de vapor de agua, disminuir la temperatura de las casas de los animales, eliminar el polvo y los olores y disminuir la concentración de microorganismos; por tanto, disponer de un aire de buena calidad para los animales es esencial puesto que mantienen bajo control a ciertos patógenos ambientales (Callejo, 2013).

La ventilación natural es siempre preferible sobre la ventilación forzada, aunque existen ciertos casos en los que es necesario instalar sistemas de ventilación dinámica para asegurar un régimen de aire apropiado (Callejo, 2013). En el caso de los pequeños rumiantes, Casamassima y cols., (2001) indican que, además de la ventilación natural de



las naves, es beneficioso para la calidad de la leche mantener a los animales en el exterior de las edificaciones durante el día, siempre que las condiciones climáticas no sean extremas.

Una inadecuada ventilación es responsable del incremento de la polución ambiental y de un mayor intercambio de microorganismos entre el animal y el ambiente de su alojamiento (Caroprese, 2008). La contaminación microbiana en el ambiente ganaderos a veces alcanza concentraciones superiores a 10^4 UFC/m³ (Bouton, 2011), mientras que Sevi y cols. (2009) recomiendan menos de 250 UFC/m³ para mejorar el bienestar animal. En este sentido, se recomienda una tasa de ventilación de 85 m³/hora por animal en invierno hasta 1700 m³/hora por animal en verano para ganado vacuno (Lawrence, 1994; B.T.L.P., 2001) y de 47 m³/hora por animal en invierno o de 65 m³/hora por animal en verano para pequeños rumiantes (Sevi y cols., 2003a, 2003b), con el objetivo de reducir la concentración de microorganismos indeseables en el ambiente y en la leche de tanque. Estas tasas de ventilación también se ven afectadas por la orientación de la nave, principalmente debido a la exposición de la edificación al sol y al viento predominante, lo que afecta al intercambio de aire entre el exterior y el interior de la explotación (Núñez y Callejo, 2006).

La ventilación deficiente aumenta la concentración de gases producto de la respiración animal e incrementa la humedad relativa; sin embargo, una alta ventilación produce un aumento de la concentración de polvo y partículas, debido a la formación de turbulencias causadas por los flujos de aire que las mantienen suspendidas más tiempo en el ambiente. Por ello, la ubicación de las entradas y salidas de aire de los alojamientos tiene una gran influencia en la concentración y propagación de la contaminación ambiental del interior de la ganadería, según explicó Gustaffson (1997).



Introducción

Unas correctas medidas preventivas sobre los posibles factores comentados anteriormente (como son la temperatura, humedad, alojamientos animales y ventilación), relacionados con la variación de la carga microbiana en el ambiente de las ganaderías de ovino lechero, podían minimizar el riesgo de contaminación de la leche de tanque.



MATERIAL Y MÉTODOS

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Localización del experimento.

La localización geográfica del estudio ha sido establecida dentro de la superficie territorial amparada por la Denominación de Origen “Queso Manchego”, la cual se sitúa en la región natural de La Mancha, situada en la Comunidad de Castilla-La Mancha (España) (**Figura 1**). Esta superficie incluye buena parte de las provincias de Toledo (26,66% de la región), Cuenca (23,75% de la región), Albacete (16,26% de la región) y Ciudad Real (33,33% de la región) (MAPA, 2019). El clima de esta zona se ha clasificado como mediterráneo, pero con características de climas continentales, con temperaturas más extremas al no recibir influencia del mar. Los veranos suelen ser calurosos y secos, con temperaturas superando los 30°C, mientras que en invierno es frecuente temperaturas por debajo de 0°C, produciéndose heladas en la noche y nevadas esporádicas. Las precipitaciones se producen sobre todo en las estaciones de otoño y primavera, con precipitaciones medias de 300-400 mm anuales, superando los 600 mm las zonas montañosas de la zona occidental.

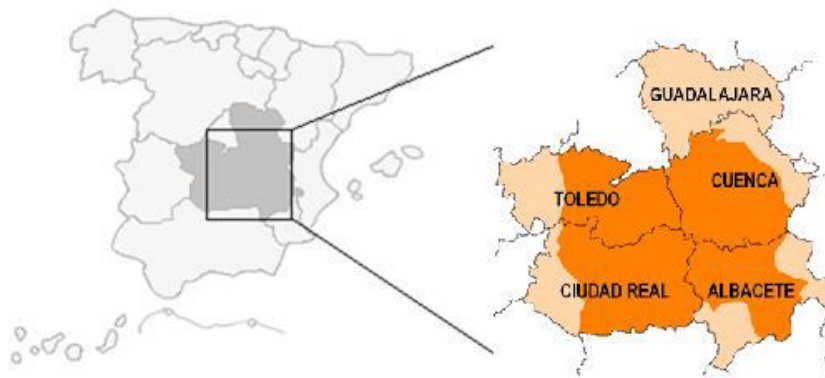


Figura 1. Superficie territorial amparada por la DOP Queso Manchego (detalle en naranja oscuro) incluida en la región de La Mancha, dentro de la Comunidad Autónoma de Castilla-La Mancha (en gris oscuro) de España (Fundación de Consejo Regulador de la Denominación de Origen Queso Manchego, 2021).



2.2. Diseño experimental.

Para la realización del estudio, en el año 2018 se seleccionaron 12 ganaderías de ovino lechero de entre las 151 pertenecientes a la Asociación Nacional de Criadores de Ganado Ovino Selecto de raza Manchega (AGRAMA) (ESROM, 2018).

La selección se realizó mediante muestreo aleatorio de todas las ganaderías que cumplieran con un requisito limitante planteado en el estudio, que estuvieran a menos de dos horas de distancia del laboratorio, con el objetivo de poder realizar en el menor tiempo posible el análisis microbiológico de las muestras. De las explotaciones resultantes del muestreo, se seleccionaron 12 ganaderías que fueran representativas de las diferentes a condiciones higiénicas de la ganadería, de las diferentes prácticas de manejo y alimentación de las ovejas de ordeño.

La información sobre las características propias de cada ganadería, así como de las diferencias en las prácticas ganaderas de cada una, fue recogida en una encuesta cerrada (**Anexo 1**), elaborada a partir de la utilizada por Toro-Mujica y cols. (2012), y que consta de 6 bloques:

- I. Características generales de la explotación.
- II. Datos estructurales.
- III. Aspectos reproductivos.
- IV. Aspectos sanitarios.
- V. Aspectos higiénico-sanitarios de la leche.
- VI. Manejo de la alimentación.



2.3. Toma de muestras.

Las muestras de las distintas matrices se han recogido con periodicidad estacional, considerando primavera (marzo, abril y mayo), verano (junio, julio y agosto), otoño (septiembre, octubre y noviembre) e invierno (diciembre, enero y febrero). En cada una de las cuatro visitas a las ganaderías se recogieron dos muestras de aire, una en la sala de ordeño (A1) y otra en la nave de las ovejas de ordeño (A2), una muestra de leche de tanque (L), una muestra de la alimentación de las ovejas de ordeño (Ali) y una muestra del área cercana a los pezones de cuatro ovejas seleccionadas al azar (P). Se obtuvieron un total de 48 muestras de leche de tanque, 48 muestras de aire de la sala de ordeño, 48 muestras de aire del alojamiento de las ovejas de ordeño, 48 muestras de la alimentación dispensada a las ovejas de ordeño y 192 muestras de la superficie de los pezones con gasas estériles. Las muestras recogidas fueron transportadas en condiciones de refrigeración ($4\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) en contenedores estancos al Laboratorio de Lactología y Quesería Experimental del Centro Regional de Selección y Reproducción Animal (CERSYRA-IRIAF) en Valdepeñas (Ciudad Real), para realizar el procesado y análisis a la llegada al Laboratorio.

Las muestras de leche se han obtenido previa homogeneización del contenido del tanque de refrigeración de cada ganadería, recogiendo una muestra de 50 ml en un bote estéril.

Para las tomas del aire ambiental se ha utilizado un muestreador de aire AirPort MD8 (Sartorius Stedim Biotech), que opera a través del método de filtración e impacto de los microorganismos sobre un filtro de gelatina (Sartorius Stedim Biotech). El caudal fue de 50L/min, durante 20 minutos, por lo que el volumen final filtrado fue de 1 m^3 de aire. Una vez en el laboratorio, el filtro de gelatina se colocaba en tubos con 25 ml de solución



salina estéril (NaCl 0,9%) para su completa disolución, y seguidamente se realizaron las diluciones seriadas necesarias.

Las muestras de alimento de las ovejas de ordeño se han recogido de la ración ya preparada y dispensada en los comederos de las naves de las ovejas de ordeño. Se usaron bolsas de aproximadamente 500 g, mezclando el alimento de la ración en la propia ganadería. Una vez en el laboratorio, 10 g de la muestra del alimento se homogeneizó en 90 ml de solución salina estéril en un Stomacher (Masticator, IUL S.A., Barcelona) durante 1 minuto y se procedió a realizar diluciones en serie.

Para la toma de muestras de la superficie de los pezones de las ovejas, se seleccionaron 4 ovejas al azar, dos al comienzo de la línea de ordeño y dos al final de la misma, previo al ordeño. Se utilizaron dos gasas estériles por oveja previamente impregnadas en 20 ml de agua de peptona estéril (1g/L, NaCl 0,9%), se arrastró toda la suciedad del área cercana a los pezones de cada ubre, siguiendo las recomendaciones de Vacheyrou y cols. (2011). Las dos gasas de cada oveja se introdujeron en un mismo bote estéril que contiene 50 ml de agua de peptona, lo que corresponde a una muestra. Una vez en el laboratorio, cada muestra de las cuatro ovejas, por separado, se introdujo en el Stomacher y se homogenizó durante 1 minuto.

2.4. Análisis microbiológico diferencial.

Se realizaron diluciones seriadas en agua de peptona estéril (1g/L, NaCl 0,9%) de las muestras de cada una de las matrices (leche, aire de la sala de ordeño, aire de la nave de las ovejas de ordeño, alimentación de las ovejas de ordeño y de la superficie de pezones), y se procedió a la siembra en superficie por duplicado, en placas de petri de 20 mm previamente preparadas con 20 ml de los diferentes medios generales o selectivos para



cada uno de los recuentos microbiológicos, con las condiciones de incubación que se detallan en la **Tabla 1**.

Para el recuento de bacterias formadoras de esporas aerobias (EA), fue necesario someter las diluciones de todas las muestras a un tratamiento térmico de 10 minutos a 75°C, con el fin de eliminar las células vegetativas.

La siembra se realizó inoculando 0,1 ml/placa, extendiendo uniformemente por toda la superficie y, una vez seco el inóculo, se incubó a la temperatura y tiempo correspondiente para cada microorganismo (**Tabla 1**). Una vez transcurrido dicho periodo, se realiza el recuento de colonias mediante un contador manual por personal entrenado según Laird y cols. (2004) y la Norma ISO 4833:2003. Los recuentos se normalizaron mediante transformación en \log_{10} , y los resultados se expresaron como el número medio de las colonias contadas en cada una de las placas en las unidades indicadas por Wehr y Frank (2004): \log_{10} UFC por ml en el caso de muestras de leche, \log_{10} UFC por 1 m³ de aire para muestras de aire, \log_{10} UFC por g para muestras de alimento y \log_{10} UFC por pezones para las muestras de la superficie de los pezones.

Los resultados en leche y alimento se refirieron al número de unidades formadoras de colonias por mililitro de muestra (UFC/ml) y unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (UFC/g), respectivamente, aplicando la siguiente ecuación:

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

Donde:

$\sum C$ = sumatorio de colonias contadas en todas las placas seleccionadas.

V = volumen inoculado en mililitros.

n_1 = número de placas contadas de la primera dilución.

n_2 = número de placas contadas de la segunda dilución.

d = factor de dilución correspondiente a la primera dilución.



Tabla 1. Condiciones para el recuento de los diferentes grupos microbianos.

Determinación	Medio de cultivo	Matrices	Diluciones	Incubación	Referencias
Recuento de Mesófilos Totales (RMT)	Tryptone Soy Agar, TSA (Panreac, Barcelona) + 100 mg/L cycloheximide (Sigma, St. Louis, USA)	Leche (L) Aire (A1 y A2) Alimento (Ali) Pezones (P)	3-4-5 1-2-3 1-2 0-1	30°C/72 h	ISO 11133:2014
Bacterias Ácido-Lácticas (BAL)	Man, Rogosa y Sharpe, MRS (Oxoid, Basingstoke, UK) + 50 mg/L sodium azide y 100 mg/L cycloheximide (Sigma, St. Louis, USA)	Leche (L) Aire (A1 y A2) Alimento (Ali) Pezones (P)	1-2-3 0-1-2-3 0-1-2 0-1	30°C/72 h Condiciones de anaerobiosis (Anaerogen, Oxoid)	Pérez-Martín y cols. (2014)
Levaduras (Lev)	Glucose Cloranfenicol Agar, CGA (Sigma, St. Louis, USA) + diphenyl crystals (Sigma, St. Louis, USA)	Leche (L) Aire (A1 y A2) Alimento (Ali) Pezones (P)	1-2 0-1 0-1 0-1-2	25°C/48 horas	Pérez-Martín y cols. (2014)
Mohos (Mo)	Rosa de Bengala Cloranfenicol agar (Panreac, Barcelona)	Leche (L) Aire (A1 y A2) Alimento (Ali) Pezones (P)	1-2 0-1-2 0-1 0-1-2	28°C/3-5 días	Jarvis y Williams (1987)
Estafilococos (St)	Mannitol Salt Agar (Panreac, Barcelona)	Leche (L) Aire (A1 y A2) Alimento (Ali) Pezones (P)	0-1-2 1-2-3 0-1-2 0-1	35-37°C/24-48 horas	Soto y cols. (1991)
Esporas aerobias (EA)	TSA + 2 g/L Almidón (Merck, Darmstadt, Alemania)	Leche (L) Aire (A1 y A2) Alimento (Ali) Pezones (P)	0-1-2 1-2-3 0-1 0-1	30°C/48 h	Michel y cols. (2001)
Esporas ácido-butíricas (BAB)	Bryant-Burkey con resazurina y lactato, BBB (Merck, Darmstadt, Alemania)	Leche (L) Aire (A1 y A2) Alimento (Ali) Pezones (P)	1-2 1-2-3 0-1-2 0-1-2	37°C/7 días	Arias y cols. (2013)

A1: Aire de la sala de ordeño; A2: Aire de la nave de las ovejas de ordeño.



Los resultados en aire se refirieron a UFC/m³ de aire, y se calculó de la siguiente forma:

$$UFC/m^3 = \frac{UFC\ placa}{0,1\ ml\ inoculado} \times \frac{25\ ml\ gelatina\ disuelta}{1\ m^3\ aire}$$

Los resultados de la suciedad en la superficie de los pezones se refirieron a UFC/pezones, calculándose mediante una media de la concentración de microorganismos en la suciedad de la superficie de los pezones de cada una de las 4 ovejas analizadas en cada muestreo de la siguiente manera:

$$UFC/pezones = \frac{UFC\ placa}{0.1\ ml\ inoculado} \times \frac{20 + 50\ ml\ agua\ peptona}{2\ gases}$$

En el caso del recuento de esporas ácido-butíricas (BAB), se utilizó la técnica del número más probable (NMP) (Arias y cols., 2013). A partir de las diluciones seriadas expuestas en la **Tabla 1**, se inoculó 1 ml de cada dilución por separado dentro de tres tubos estériles que contenían 9 ml de caldo *Bryant-Burkey* con resazurina y lactato (BBB, Merck, Darmstadt, Alemania), y posteriormente fueron sellados con una capa de parafina. Después de realizar un tratamiento térmico similar a las EA, los tubos fueron incubados durante 7 días a 37°C, para comprobar la capacidad de producción de gas de cada dilución mediante el desplazamiento vertical del tapón de parafina. Los recuentos a partir de esta técnica se expresan en log₁₀ esporas/L para leche, log₁₀ esporas/m³ de aire para muestras de aire, log₁₀ esporas/g para las muestras de alimento y log₁₀ esporas/pezones para las muestras de superficie de pezones.



2.5. Caracterización de los microorganismos de interés tecnológico: bacterias ácido-lácticas (BAL) y levaduras (Lev).

2.5.1. Análisis mediante RAPD-PCR e identificación de aislados de bacterias ácido-lácticas (BAL) y levaduras (Lev).

Se seleccionó un número representativo (10%) de colonias crecidas de BAL y Lev en cada una de las placas de todas las matrices y para todas las ganaderías seleccionadas dependiendo de su morfología, identificadas según sus características, y purificadas en condiciones de esterilidad. La purificación se realizó en caldo *Man, Rogosa y Sharpe* (MRS, Oxoid, Basingstoke, UK) para las BAL y en caldo *Yeast Extract Peptone Dextrose* (YPD, Pronadisa, Madrid) para el caso de Lev, puesto que este medio para la purificación de Lev presenta una eficiencia mayor. Los cultivos puros se almacenaron a una temperatura de -80°C conteniendo cada vial aproximadamente 20% (v/v) glicerol (Panreac, Barcelona) para evitar el deterioro celular.

En el caso de las BAL, los aislados se genotiparon mediante la técnica *Randomly Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction* (RAPD-PCR) según el procedimiento descrito por Ruiz y cols. (2008). La extracción del ADN se realizó según las indicaciones de Rodas y cols. (2003). El cebador, o primer, M13 (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3') obtenido de Bonsai Technologies Group (Madrid) fue el seleccionado para esta técnica, y las reacciones de amplificación se llevaron a cabo mediante un termociclador 2400 Perkin Elmer (Perkin Elmer Co., Waltham, MA, USA).

Para las Lev, la extracción del ADN previo al proceso de genotipado mediante RAPD-PCR, se realizó como describe Fernández-Pacheco y cols. (2018). Los aislados se recolectaron por centrifugación (5000 rpm durante 5 min) y se lavaron con solución salina estéril (0,9%). El pellet recuperado se trató inmediatamente con una solución de zymolyase (10 mg/ml zymolyase 20T in 1,2M sorbitol buffer, 40mM sodium phosphate buffer, pH=7), y tras una incubación a 37°C durante 30 min y 95°C durante 5 min se



produjo el lisado celular, quedando liberado el ADN para el genotipado. La reacción RAPD-PCR en el caso de levaduras se llevó a cabo usando el mismo cebador que en el caso de las BAL, al igual que el mismo termociclador.

Los componentes de la mezcla de reacción para ambos microorganismos se detallan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Concentración de los componentes de la mezcla de reacción de RAPD-PCR.

Reactivos	Concentración stock	Volumen por reacción	Concentración final en la reacción
Tampón de reacción (Bioline, Londres, Reino Unido)	10X	2 μ l	1X
dNTPs mix (Bioline, Londres, Reino Unido)	10 mM	0,4 μ l	0,2 mM
MgCl ₂ (Bioline, Londres, Reino Unido)	50 mM	1,2 μ l	3 mM
Cebador M13 (Metabion Int., Planegg, Alemania)	10 μ M	2,5 μ l	1,25 mM
rTaq ADN Polimerasa* (Bioline, Londres, Reino Unido)	5U / μ l	0,3 μ l	1,5 U
H ₂ O (Sigma-Aldrich, Atenas, Grecia)	-	12,6 μ l	-
ADN molde	-	1 μ l	-
Volumen final		20 μ l	

* se añade al final del primer ciclo.

Los programas de amplificación para cada BAL y Lev se detallan en la **Tabla 3**.



Tabla 3. Programas de amplificación usados en las reacciones RAPD-PCR dependiendo del microorganismo analizado.

	Nº de ciclos	Fase de desnaturalización	Fase de hibridación	Fase de extensión
BAL	1	5 min a 94°C		
	2	40 seg a 94°C	1 min a 45°C	1 min a 72°C
	35	40 seg a 94°C	1 min a 52°C	3 min a 72°C
	1			4 min a 70°C
Lev	1	4 min a 94°C		
	2	1 min a 94°C	1 min a 45°C	1 min a 72°C
	35	40 seg a 94°C	1 min a 52°C	3 min a 72°C
	1			10 min a 72°C

En todos los ensayos se ha incluido una muestra control negativo que no contiene ADN, para descartar contaminaciones externas, y una muestra control positivo con un ADN de un aislado de BAL o un aislado de Lev conocido, para verificar que la reacción se produce correctamente. Al término de los ciclos, las muestras amplificadas se mantienen a $4\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ en el termociclador hasta la realización de la electroforesis.

La visualización de los productos de amplificación se ha realizado mediante electroforesis (50A en 3 horas, sin enfriamiento) en geles de agarosa que se preparan con agarosa tipo D-1 Baja-EEO (Pronadisa, Madrid) al 1,7% (p/v) en tampón TAE 1X (40 mM tris-acetato, 1mM EDTA, pH 8,3) con 0,4 $\mu\text{g/ml}$ de Bromuro de Etidio (Bio-Rad, California, USA). En cada pocillo del gel de agarosa se cargan 10 μl del amplificado y 4 μl de tampón de carga (17,5 mM EDTA (Panreac, Barcelona), 30% (p/v) glicerol, añadiendo un 0,25% (p/v) azul de bromofenol (Panreac, Barcelona) previamente mezclados. En cada uno de los extremos del gel se carga un marcador de peso molecular 100 pb-ladder (Biotools, Madrid) compuesto por 10 fragmentos comprendidos entre 100 y 1.000 pares de bases (pb). Los marcadores se preparan mezclando 1,2 μl del marcador



con 4 μ l de tampón de carga y 8,8 μ l de agua ultrapura (Sigma-Aldrich, Dorset, Reino Unido). Tras cargar las muestras, el gel se sumerge en tampón TAE 1X en la cubeta de electroforesis (Bio-Rad, California, USA). Al finalizar el proceso, los geles se visualizan en un fotodocumentador con luz ultravioleta (Gel Doc™ XR, Bio-Rad, California, USA).

Las imágenes obtenidas se han procesado mediante el uso del programa informático GelCompar versión 4.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) como describieron Vauterin y Vauterin (1992). Los perfiles obtenidos de ADN se han comparado mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson y se ha realizado un análisis cluster mediante el algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Average linkage*) que ha permitido la construcción de los correspondientes dendrogramas de similitud. El valor del coeficiente de correlación de Pearson (r), se ha expresado en el dendrograma como % de similitud ($r \times 100$). Para determinar el mínimo valor de similitud necesario para la discriminación intraespecífica se realizó un estudio de reproducibilidad descrito por Seseña y cols. (2005), eligiendo al azar 6 aislados para ejecutar, por cuadruplicado, el procedimiento completo de obtención de los perfiles RAPDs, como se ha descrito anteriormente. Una vez se ha realizado la amplificación, tenemos 4 productos para cada aislado. Dos de ellos se resuelven en un gel de agarosa y los otros dos en otro gel diferente, para estimar también la reproducibilidad entre geles. El nivel de similitud obtenido entre las repeticiones, cuando se incluyó dentro del dendrograma para todos los aislados, estableció un umbral de discriminación por debajo del cual los aislados se consideraron diferentes.

Para finalizar, el 10% de los aislados incluidos en cada dendrograma, así como aquellos aislados que se agrupaban en un dendrograma individual, tanto de BAL como de Lev, se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight*) en Probisearch S. L. (Fundación Parque



Científico de Madrid). La identificación de las especies se definió con un 99-100% de similitud en comparación con su propia base de datos.

2.5.2. Estudio de biodiversidad de las bacterias ácido-lácticas (BAL) y de las levaduras (Lev).

Para determinar la riqueza de especies de BAL y Lev en cada ganadería se calculó el índice de biodiversidad de Simpson que tiene en consideración tanto el número de especies presentes como la abundancia relativa de cada una de las especies encontradas. A medida que aumenta la riqueza y la uniformidad de las especies, también aumenta la diversidad. Se utilizó la siguiente ecuación:

$$D=1 - \left(\frac{\sum n(n-1)}{N(N-1)} \right)$$

Donde:

D = índice de diversidad de Simpson.

n = número total de organismos de una especie.

N = número total de organismos de todas las especies en el mismo entorno.

El valor D oscila entre 0 (sin diversidad) y 1 (diversidad infinita).

Además, con el objetivo de evaluar la diversidad genética, se calculó el porcentaje de biodiversidad de las especies como el cociente entre el número de cepas de una especie y el total de aislados de la especie, donde los valores más altos indican una mayor diversidad.

2.6. Análisis estadísticos.

Los recuentos de microorganismos se escalaron en variables ordinales de cinco niveles basados en cuantiles del 20%, debido a que la distribución de algunos recuentos fue fuertemente no-normal (Meulman y cols., 2004).



Se utilizó el análisis de componentes principales categóricos (CATPCA, SPSS v. 15.0) para identificar patrones de variación común en la concentración de microorganismos (RMT, BAL, Lev, Mo, St, EA, y BAB) entre las distintas matrices muestreadas (L, A1, A2, Ali y P). CATPCA es una técnica multivariante que reduce la información contenida en un conjunto de n variables observadas en un conjunto más pequeño de componentes no correlacionados (dimensiones) que representan patrones comunes dentro de los datos originales (Meulman, 1992). A diferencia del análisis de componentes principales, CATPCA permite escalar las variables originales a diferentes niveles y, por tanto, no hace supuestos de normalidad (Pizarro y cols., 2020).

Para obtener relaciones consistentes en la concentración de cada microorganismo entre los distintos lugares de muestreo, primero exploramos con la Tau-B de Kendall las correlaciones entre todos los recuentos (Xu y cols., 2013). CATPCA se interpretó desde el punto de vista biológico observando las saturaciones de las variables originales con las dimensiones extraídas. Sólo se seleccionaron las dimensiones con valores propios mayores que 1 (Abson y cols., 2012).

Después de la aplicación de CATPCA, se calcularon las puntuaciones factoriales de cada dimensión para cada muestreo. Las puntuaciones factoriales individuales se analizaron utilizando un modelo mixto (procedimiento MIXED en SAS® versión 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC) para identificar y describir los factores que determinan cada dimensión (Gonzalo y cols., 2019). El modelo podría expresarse como:

$$D_j = \sum_{i=1}^n \beta_i f_i + \delta$$

Donde:

D_j = puntuación factorial de la dimensión evaluada.

β_i = parámetros desconocidos para estimar.

f_i = variables explicativas.

δ = término de error.



Los factores para evaluar la concentración de los distintos microorganismos en las distintas matrices fueron los siguientes: **Ovejas**: número de hembras totales; **Producción**: leche producida al año; **Estación**: estación del año; **TempSO**: temperatura en la sala de ordeño; **TempNO**: temperatura en la nave de las ovejas de ordeño; **HumSO**: humedad en la sala de ordeño; **HumNO**: humedad en la nave de las ovejas de ordeño; **OriSO**: orientación de la sala de ordeño; **OriNO**: orientación de la nave de ordeño; **VentNO**: ventilación de la nave de las ovejas de ordeño; **HigSO**: higiene de la sala de ordeño; **HigNO**: higiene de la nave de las ovejas de ordeño; **Línea**: tipo de línea de ordeño; **LimpSO**: frecuencia de limpieza de la sala de ordeño; **Filtro**: frecuencia de cambio del filtro de ordeño; **Contacto suelo**: contacto frecuente de las pezoneras con el suelo; **Ácido**: frecuencia del uso de ácido en la limpieza de la máquina de ordeño; **LecheríaSO**: existe comunicación directa lechería-sala de ordeño; **Grano**: dispensación de alimento (gránulos de pienso, cereales, etc.) en la sala de ordeño; **Mamitis**: porcentaje de mamitis clínicas; **Secado**: aplicación de algún tratamiento de secado; **Alimentación**: unifeed comercial o propio; **Ensilado**: uso de ensilado en la alimentación de las ovejas de ordeño; **HigT**: higiene del tanque de ordeño; **TipoT**: tipo de tanque de ordeño; **RevisiónT**: periodicidad de revisión del tanque de ordeño. Como los factores Ovejas, Producción, TempSO, TempNO, HumSO, HumNO y Mamitis son variables métricas, para poder ser incluidos como factores en el modelo mixto se deben transformar en variables categóricas utilizando como límites la media en el caso de Ovejas, Producción y Mamitis, y los cuartiles como límites en el caso de TempSO, TempNO, HumSO, HumNO. La distribución de frecuencias de estos factores, así como la descripción de los factores cuantitativos, se pueden observar en la **Tabla 4**.

Las condiciones utilizadas para determinar una higiene adecuada de la sala de ordeño fueron la ausencia de partículas de polvo en el aire, la ausencia de basura en el suelo y



que la sala no presentara acúmulo de enseres; las condiciones utilizadas para determinar una higiene adecuada en la nave de las ovejas de ordeño fueron el buen estado de la cama (suficiente y limpia), la ausencia de partículas de polvo en el aire y la ausencia de restos de alimento en los comederos; las condiciones utilizadas para determinar una ventilación adecuada en la nave de las ovejas de ordeño fueron la ausencia de olor a amoníaco y la presencia de ventanas y puertas suficientes para proporcionar una buena ventilación; y las condiciones para una correcta higiene del tanque fueron la ausencia de polvo sobre la superficie del mismo, si alguna de sus compuertas está descubierta, la posible presencia de insectos en el interior del tanque y si se sigue un protocolo para su limpieza.

Los modelos se especificaron para analizar los efectos principales de los factores, siguiendo una secuencia de construcción manual basada en Molina y cols. (2018) para evitar problemas derivados del pequeño tamaño muestral (48 casos completos). Como criterio de retención se fijó un nivel de significación $P=0,05$. El modelo inicial para cada dimensión se determinó como aquel modelo de un único predictor significativo con el valor del criterio de información de Akaike (AIC) más bajo. En cada paso se fueron agregando, o quitando, los factores restantes uno por uno, y los comparamos en base al AIC y al factor de inflación de la varianza (FIV). Se consideró que existía un problema grave de multicolinealidad si alguno de los FIV era superior a 10 (Alin, 2010). Esta secuencia se repitió hasta obtener el modelo con el valor de AIC más bajo, especificado con factores significativos y con valores de FIV inferiores a 10. Este se consideró el más plausible y se seleccionó como modelo final. El test de Kolmogorov-Smirnov se utilizó para verificar la normalidad en la distribución de los residuos, el test de Durbin-Watson para detectar la ausencia de autocorrelación de los residuos, y la heterocedasticidad se evaluó mediante la prueba de White. El ajuste de los modelos se determinó mediante el coeficiente de determinación ajustado (Toro-Mujica y cols., 2011; Angón y cols., 2013).



Tabla 4. Distribución de frecuencias (%) y la descripción estadística de las variables cuantitativas obtenidas mediante las respuestas de los ganaderos en la encuesta realizada.

Factores	Niveles	Frecuencias	Media	Desv. T.	Mín-Máx
Ovejas	≤600	58,3%	736,2	473,0	250 - 1.800
	>600	41,7%			
Producción	<320.000	50%	321.750	236.466	85.000 - 940.000
	>320.000	50%			
Estación	Primavera	25%	-	-	-
	Verano	25%			
	Otoño	25%			
	Invierno	25%			
TempSO	<14°C	25%	17,5	14,9	7,3 - 27,7
	14°C - 20°C	50%			
	>20°C	25%			
TempNO	<10°C	25%	14,7	6,5	2,8 - 27
	10°C - 20°C	50%			
	>20°C	25%			
HumSO	<50%	25%	57,1	10,2	33,9 - 74,9
	50% - 66%	50%			
	>66%	25%			
HumNO	<53%	25%	62,7	13,2	26,6 - 81,6
	53% - 73%	50%			
	>73%	25%			
OriSO	N-S	50%	-	-	-
	E-O	16,7%			
	Otras	33,3%			
OriNO	N-S	25%	-	-	-
	E-O	33,3%			
	Otras	41,7%			
VentNO	Alta	50%	-	-	-
	Baja	50%			
HigSO	Adecuada	72,9%	-	-	-
	No	27,1%			
HigNO	Adecuada	72,9%	-	-	-
	No	27,1%			
Línea	Alta	66,7%	-	-	-
	Baja	33,3%			
LimpSO	Después cada ordeño	50%	-	-	-
	Diario	25%			
	Menos frecuente	25%			
Filtro	Después cada ordeño	50%	-	-	-
	Diario	25%			
	Cada dos días	25%			
Contacto suelo	Sí	50%	-	-	-
	No	50%			
Ácido	Diario	16,7%	-	-	-
	Cada dos-tres días	75%			
	Menos frecuente	8,3%			
LecheríaSO	Sí	58,3%	-	-	-
	No	41,7%			
Grano	Sí	50%	-	-	-
	No	50%			
Mamitis	<2%	50%	2,33	1,56	0,5 - 5
	>2%	50%			
Secado	Sí	50%	-	-	-
	No	50%			
Alimentación	Propio	50%	-	-	-
	Comercial	50%			
Ensilado	Sí	33,3%	-	-	-
	No	66,7%			
HigT	Adecuada	50%	-	-	-
	No	50%			
TipoT	Abierto	25%	-	-	-
	Cerrado	75%			
RevisiónT	Cada 6 meses	16,7%	-	-	-
	Anual	66,7%			
	En averías	16,6%			



(**Tabla 4.** continuación) Desv. T.: desviación típica; Mín: valor mínimo; Máx: valor máximo; Ovejas: número de hembras totales; Producción: leche producida al año; Estación: estación del año; TempSO: temperatura en la sala de ordeño; TempNO: temperatura en la nave de las ovejas de ordeño; HumSO: humedad en la sala de ordeño; HumNO: humedad en la nave de las ovejas de ordeño; OriSO: orientación de la sala de ordeño; OriNO: orientación de la nave de ordeño; VentNO: ventilación de la nave de las ovejas de ordeño; HigSO: higiene de la sala de ordeño; HigNO: higiene de la nave de las ovejas de ordeño; Línea: tipo de línea de ordeño; LimpSO: frecuencia de limpieza de la sala de ordeño; Filtro: frecuencia de cambio del filtro de ordeño; Contacto suelo: contacto frecuente de las pezoneras con el suelo; Ácido: frecuencia del uso de ácido en la limpieza de la máquina de ordeño; LecheríaSO: existe comunicación directa lechería-sala de ordeño; Grano: dispensación de alimento en la sala de ordeño; Mamitis: porcentaje de mamitis clínicas; Secado: aplicación de algún tratamiento de secado; Alimentación: unifeed comercial o propio; Ensilado: uso de ensilado en la alimentación de las ovejas de ordeño; HigT: higiene del tanque de ordeño; TipoT: tipo de tanque de ordeño; RevisiónT: periodicidad de revisión del tanque de ordeño.

En el caso específico donde se han estudiado de forma individual las comunidades de BAL y levaduras en leche, también se utilizó un modelo mixto (procedimiento MIXED en SAS® versión 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC) para examinar los factores que influyen en la variación de \log_{10} BAL y \log_{10} Lev en la leche (Gonzalo y cols., 2019).

Los factores evaluados fueron los comentados previamente, sin embargo, para el modelo sólo se tuvieron en cuenta aquellos factores considerados que podrían influenciar la concentración de este tipo de microorganismos.

Las concentraciones de BAL en A1 y A2 y de Lev en A1, A2, Ali y P mostraron una fuerte distribución no-normal, por lo que se decidió escalarlo dentro de una variable categórica con dos niveles (0=ausencia de microorganismo; 1=presencia). Sin embargo, en el caso de las BAL en alimento (Ali) y en la suciedad de los pezones (P) se analizaron como factores continuos.

En primer lugar, se cuantificó la fuerza de la asociación bivariada entre factores y \log_{10} BAL/Lev en leche mediante ANOVA (factores con tres o más niveles) o pruebas t de Student (factores con dos niveles). Los factores asociados significativamente con \log_{10} BAL/Lev ($p < 0,20$) se consideraron variables candidatas a incluir en el modelo mixto.

En segundo lugar, los modelos mixtos se especificaron de acuerdo a la secuencia de construcción manual previamente descrita para determinar los factores que influyen en



las dimensiones resultantes del CATPCA, considerando sólo los factores significativamente asociados de modo bivalente con las variables dependientes.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Descripción de las características microbiológicas en las ganaderías.

Los estadísticos descriptivos de los distintos microorganismos estudiados tanto en leche de tanque como en el aire de la sala de ordeño y del alojamiento de las ovejas de ordeño, de la alimentación de las ovejas de ordeño y de la superficie de los pezones se exponen en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Estadísticos descriptivos de los microorganismos en las distintas matrices estudiadas de las ganaderías de raza Manchega.

Variable	N	Media	Desviación típica	Error estándar
RMT-L	48	5,122	0,467	0,067
RMT-A1	48	2,522	0,611	0,088
RMT-A2	48	2,771	0,718	0,104
RMT-Ali	48	5,878	0,528	0,076
RMT-P	48	4,660	0,405	0,058
BAL-L	48	4,214	0,668	0,096
BAL-A1	48	0,638	0,844	0,122
BAL-A2	48	0,843	1,043	0,151
BAL-Ali	48	4,500	1,356	0,196
BAL-P	48	2,910	0,587	0,085
Lev-L	48	2,112	1,458	0,211
Lev-A1	48	0,151	0,511	0,074
Lev-A2	48	0,144	0,499	0,072
Lev-Ali	48	3,231	1,114	0,161
Lev-P	48	0,500	0,756	0,109
Mo-L	48	0,920	1,358	0,196
Mo-A1	48	1,486	1,000	0,144
Mo-A2	48	1,833	0,760	0,110
Mo-Ali	48	3,920	0,826	0,119
Mo-P	48	0,494	0,723	0,104
St-L	48	4,083	0,463	0,067
St-A1	48	1,941	0,873	0,126
St-A2	48	2,308	0,976	0,141
St-Ali	48	4,504	0,990	0,144
St-P	48	4,335	0,486	0,070
EA-L	48	1,694	0,706	0,103
EA-A1	48	1,646	0,708	0,102
EA-A2	48	1,413	0,920	0,133
EA-Ali	48	4,171	0,884	0,128
EA-P	48	2,407	0,409	0,059
BAB-L	48	3,023	0,482	0,070
BAB-A1	48	3,145	0,662	0,096
BAB-A2	48	3,060	0,613	0,089
BAB-Ali	48	5,574	0,932	0,135
BAB-P	48	3,738	0,539	0,078

N: tamaño de la muestra; RMT: recuento de mesófilos totales; BAL: bacterias ácido-lácticas; Lev: levaduras; Mo: mohos; St: estafilococos; EA: esporas aerobias; BAB: esporas butíricas; L: leche (\log_{10} UFC/ml, excepto para BAB-L que se mide en \log_{10} esporas/L); A1: aire de la sala de ordeño (\log_{10} UFC/m³, excepto para BAB-A1 que se mide en \log_{10} esporas/m³); A2: aire de la nave de las ovejas de ordeño (\log_{10} UFC/m³, excepto para BAB-A2 que se mide en \log_{10} esporas/m³); Ali: alimento (\log_{10} UFC/g, excepto para BAB-Ali que se mide en \log_{10} esporas/g); P: superficie del área cercana a los pezones (\log_{10} UFC/pezones, excepto para BAB-P que se mide en \log_{10} esporas/pezones).



En este estudio se ha constatado la magnitud y el comportamiento de diversos microorganismos relacionados con el ambiente de las ganaderías de ovino lechero. En general, se ha observado que en leche de tanque y en la superficie de los pezones los niveles de mohos, estafilococos y BAB son similares, lo cual supone un riesgo directo para la contaminación de la leche de tanque durante el ordeño debido a la suciedad de la zona de los pezones. Esta relación es muy relevante especialmente en ovino lechero, en el que la práctica de limpieza de pezones previa al ordeño (pre-dipping) no se realiza de forma rutinaria como en vacuno lechero, ya que es poco viable, por el tiempo que se necesitaría para esta práctica con un gran número de ovejas en ordeño.

También se observa que la concentración de microorganismos del aire de la sala de ordeño y del aire del alojamiento de las ovejas de ordeño es similar, con excepción de los estafilococos, lo que parece indicar que ambos ambientes están interrelacionados. En aire, los valores más altos de microorganismos se observan para RMT y BAB, mientras que los más bajos corresponden a BAL y levaduras, microorganismos muy importantes desde el punto de vista tecnológico. En el caso de los estafilococos, se observa un mayor recuento medio en el aire de la nave de las ovejas de ordeño ($St-A2=2,308 \log_{10} \text{UFC/m}^3$), superior al constatado en la sala de ordeño ($St-A1=1,941 \log_{10} \text{UFC/m}^3$), ambos a tener en consideración dada la importancia de este microorganismo en la instauración de infecciones intramamarias.

Asimismo, se ha observado (**Tabla 5**) que las concentraciones de RMT y de BAL en las distintas matrices siguen un patrón similar: los recuentos del alimento de las ovejas de ordeño y de la leche de tanque presentan los valores más altos, mientras que los recuentos del aire de la sala de ordeño y de la nave de las ovejas de ordeño muestran los niveles más bajos. Estos resultados indican que BAL es un grupo de microorganismos relevante en el RMT.



En el caso de los mohos, cabe destacar que la concentración en leche de tanque es la más baja de todos los microorganismos estudiados ($Mo-L=0,920 \log_{10} \text{ UFC/ml}$), similar en rango al recuento de la superficie de pezones. Sin embargo, sí existe una evidente contaminación ambiental a la vista de los niveles de concentración en el aire de la sala de ordeño y de la nave de las ovejas de ordeño ($Mo-A1=1,486 \log_{10} \text{ UFC/m}^3$, $Mo-A2=1,833 \log_{10} \text{ UFC/m}^3$), así como de los niveles de concentración en el alimento ($Mo-Ali=3,920 \log_{10} \text{ UFC/g}$).

En referencia a los microorganismos esporulados, se han observado mayores niveles de BAB que de aerobios en todas las matrices estudiadas. Comparando estas matrices, se constata que el mayor nivel de ambos se encuentra en el alimento de las ovejas de ordeño, seguido de la superficie de los pezones, siendo similares los niveles en leche de tanque y en el aire de sala y de la nave de ordeño.

A continuación, se exponen los resultados de los distintos grupos microbianos de importancia ambiental, desde el punto de vista de riesgo de contaminación de la leche de tanque de las ganaderías de ovino lechero.

3.1.1. Recuento de Mesófilos Totales (RMT).

El valor medio de RMT de la leche de tanque ha sido $5,122 \log_{10} \text{ UFC/ml}$, similar a otros estudios previos (De Garnica y cols., 2011), aunque algo inferior al trabajo de Jiménez (2019) en ovino manchego. A la vista de los límites impuestos por el Reglamento (CE) nº 853/2004, el valor medio de RMT de la leche de tanque de las ganaderías estudiadas está por debajo del recuento máximo permitido ($5,7 \log_{10} \text{ UFC/ml}$) para la leche cruda destinada a la fabricación de productos sin tratamiento térmico previo. Sin embargo, como ya se ha comentado, el RMT es un parámetro poco específico para determinar la calidad higiénica de la leche de tanque, por lo que sería conveniente estudiar



los grupos microbianos más importantes desde el punto de vista higiénico-sanitario y tecnológico.

En el caso de RMT-Ali se ha obtenido el valor más alto de todo el estudio, con 5,878 \log_{10} UFC/g. lo que destaca la matriz del alimento como un posible factor de contaminación de RMT en la leche de tanque. Del mismo modo, encontramos la matriz de superficie de pezones (4,660 \log_{10} UFC/pezones), como posible factor de contaminación de RMT en la leche de tanque, puesto que estos valores de concentración para este tipo de microorganismos son los más altos obtenidos de todos los analizados en el estudio. Estos valores son significativamente mayores que los recuentos obtenidos en otros estudios realizados en ovino lechero, donde obtuvieron recuentos de 2,5 \log_{10} UFC/cm² en superficie de la ubre (Tonamo y col., 2020).

Es importante resaltar los valores de RMT obtenidos en el ambiente de la ganadería, con 2,522 \log_{10} UFC/m³ en aire de la sala de ordeño y 2,771 \log_{10} UFC/m³ en aire de la nave de las ovejas de ordeño. La presencia de una concentración elevada de microbiota en el ambiente puede suponer una contaminación a través del aire de la ganadería, que actúa como un vehículo de dispersión natural, pudiendo llegar a contaminar la leche de tanque. El hecho de estudiar la presencia de esta microbiota ambiental y las vías que usan para poder contaminar la leche puede resultar determinante para la obtención de un producto de calidad, debido a la falta de estudios existentes en este contexto.

3.1.2. Bacterias ácido-lácticas (BAL).

La media para el recuento de las BAL ha sido de 4,214 \log_{10} UFC/ml, prácticamente en concordancia con otros estudios (Pérez-Elortondo y cols., 1999; Delavenne y cols., 2012; Centi y cols., 2017). Las BAL son unos microorganismos esenciales desde el punto de vista tecnológico, ya que contribuyen de manera significativa en los procesos de fermentación y aportan propiedades organolépticas al queso (Poveda y cols., 2004).



En las muestras de aire, resulta interesante observar que la presencia de BAL no es elevada ($0,638 \log_{10} \text{ UFC/m}^3$ para A1 y $0,843 \log_{10} \text{ UFC/m}^3$ para A2) si se compara con otras matrices, como el alimento ($4,5 \log_{10} \text{ UFC/g}$) y/o la superficie de los pezones ($2,910 \log_{10} \text{ UFC/pezones}$), que probablemente contribuyan a la presencia de BAL en la leche de tanque dentro de las ganaderías. Bouton y cols. (2007) indicaban que parece existir un flujo de *Lactobacillus* entre la máquina de ordeño y la leche de tanque en ganado vacuno, siendo el origen de estas especies la alimentación y la cama, desde donde se puede contaminar la superficie de los pezones. Sin embargo, es importante resaltar el hecho de que algunas especies de BAL, pertenecientes a los géneros *Streptococcus* y *Lactobacillus*, se dan de forma natural en la leche de ovejas sin síntomas clínicos de mamitis (Esteban-Blanco y cols., 2019), por lo que se ha de considerar como una fuente para la presencia de BAL en leche.

3.1.3. Levaduras (Lev).

Para levaduras se obtuvo una media de $2,112 \log_{10} \text{ UFC/ml}$, coincidiendo con otras investigaciones previas (Torkar y Vengušt, 2008; Esteban, 2018). Está demostrado que la presencia de comunidades de levaduras puede influir positivamente en las propiedades del queso. Sin embargo, las altas concentraciones de levaduras podrían provocar el deterioro del mismo y la producción de olores y sabores desagradables (Esteban, 2018). Por estas razones, es importante mejorar el conocimiento sobre la comunidad de levaduras presente en el entorno de las ganaderías, que podría afectar la leche y los productos lácteos.

Al igual que para las BAL, las levaduras presentan concentraciones bajas en ambos aires ($0,151 \log_{10} \text{ UFC/m}^3$ para A1 y $0,144 \log_{10} \text{ UFC/m}^3$ para A2). Del mismo modo, los valores encontrados en la superficie de pezones son bajos ($0,5 \log_{10} \text{ UFC/pezones}$). Por ello, al igual que pasa en el caso de las BAL, se podría pensar que la fuente de



contaminación más influyente de las matrices estudiadas en esta investigación podría ser el alimento ($3,231 \log_{10}$ UFC/g). Sin embargo, la presencia de levaduras en el ambiente, en especial en el aire del alojamiento de las ovejas de ordeño, tiene gran importancia en la contaminación de la leche de tanque por levaduras, como se observará en apartados posteriores.

3.1.4. Mohos (Mo).

En el caso de los mohos se ha obtenido un recuento medio de $0,920 \log_{10}$ UFC/ml, prácticamente similar a la concentración obtenida por Torkar y Vengušt (2008) en su estudio ($0,6 \log_{10}$ UFC/ml). La presencia de mohos en leche de oveja es importante, sobre todo para garantizar la seguridad del consumidor, ya que existen géneros como el *Aspergillus* que pueden producir micotoxinas. Además, los mohos son responsables de muchos problemas tecnológicos en el queso, aunque existen ciertas especies que pueden crecer en su superficie realizando una labor muy importante en la maduración del queso.

Los valores de mohos en la superficie de los pezones son incluso más bajos que en leche ($0,494 \log_{10}$ UFC/pezones), siendo la matriz más contaminada el alimento ($3,920 \log_{10}$ UFC/g), como también se ha observado para el resto de los microorganismos estudiados. Además, el hecho de que la presencia de mohos en los ambientes ($1,486 \log_{10}$ UFC/m³ para el caso de A1 y $1,833 \log_{10}$ UFC/m³ en el caso de A2) sea mayor que en la leche de tanque puede implicar que existe una recirculación de mohos en la ganadería, pero no llega a colonizar la superficie de pezones, matriz que puede ser clave para la contaminación de la leche de tanque.

3.1.5. Estafilococos (St).

En cuanto al grupo de estafilococos, la media aritmética obtenida ha sido $4,083 \log_{10}$ UFC/ml, similar al estudio de Jiménez y cols. (2014). Estos microorganismos son los más



prevalentes en las infecciones intramamarias (Albenzio y cols., 2002), habiéndose descrito un mayor recuento en explotaciones de mayor producción lechera (Jiménez, 2019) así como en sistemas de producción más intensivos (Marogna y cols., 2010). Además, se pueden observar también niveles altos de estafilococos tanto en superficie de los pezones (4,335 log₁₀ UFC/pezones) como en muestras de alimento (4,504 log₁₀ UFC/g).

Cabe destacar los valores de estafilococos encontrados tanto en aire de la sala de ordeño (1,941 log₁₀ UFC/m³) como en el aire de la nave de las ovejas de ordeño (2,308 log₁₀ UFC/m³). El estudio de la microbiota presente en el ambiente de las ganaderías de ovino lechero, que no ha sido previamente investigado, adquiere especial relevancia para la prevención y el control de los niveles de estafilococos, y de las infecciones intramamarias en el rebaño.

3.1.6. Bacterias formadoras de esporas aerobias (EA).

En el caso de microorganismos esporulados, los resultados obtenidos fueron 1,694 log₁₀ UFC/ml. En estudios previos en leche de vacuno se ha observado una gran variabilidad en el recuento, con rangos entre 1,460 y 4,450 log₁₀ UFC/ml (Buehner y cols., 2014; Montebello y cols., 2018). Las esporas aerobias, principalmente de *Bacillus* spp., son un problema para la industria láctea debido a su capacidad para producir enzimas extracelulares hidrolíticas que causan sabores desagradables y defectos estructurales en la leche (Montebello y cols., 2018).

Los valores encontrados en aire para los microorganismos esporulados son prácticamente idénticos (1,646 log₁₀ UFC/m³ para el caso de A1 y 1,413 log₁₀ UFC/m³ en el caso de A2), lo que podría suponer una recirculación entre ambientes donde encontramos prácticamente el mismo nivel de esporas en la ganadería, puesto que las



esporas son capaces de soportar la deshidratación y condiciones adversas del transporte mediante el aire.

El recuento de EA en alimento es el más elevado de las matrices estudiadas (4,171 \log_{10} UFC/g), siendo también relevante la concentración obtenida para la superficie de pezones (2,407 \log_{10} UFC/pezones). El recuento de esporas aerobias es un buen indicador de la suciedad de las ubres en vacuno (Vissers y cols., 2007b), por lo que su estudio en ovino lechero podría ser clave para comprender la transmisión de microorganismos desde la suciedad cercana al pezón hacia la leche de tanque.

3.1.7. Esporas ácido-butíricas (BAB).

El valor medio para el grupo de las BAB es de 3,023 \log_{10} esporas/L, similar a los valores obtenidos en el estudio de Arias y cols. (2013), e inferiores a los obtenidos por Garde y cols. (2011) que fueron 4,160 \log_{10} esporas/L, diferencias que pueden deberse a la tipología de las ganaderías estudiadas dentro de la misma área de estudio. El nivel de BAB en leche es considerado de gran interés debido a que son los microorganismos causantes de un grave problema de carácter tecnológico como es la hinchazón tardía de los quesos de pasta prensada (Arias y cols., 2013).

En el caso del ambiente, estas esporas se comportan igual que las bacterias formadoras de esporas aerobias, con recuentos similares en sala de ordeño y alojamiento de las ovejas de ordeño (3,145 \log_{10} esporas/m³ para el caso de A1 y 3,060 \log_{10} esporas/m³ en el caso de A2), lo que sugiere la existencia de una recirculación de esporas en la ganadería. Del mismo modo que para los microorganismos esporulados, encontramos el mayor nivel de BAB en el alimento (5,574 \log_{10} UFC/g) y un nivel importante en la superficie de los pezones (3,738 \log_{10} UFC/pezones), lo que puede indicar que, de las matrices estudiadas, estas dos son las principales fuentes de contaminación de esporas butíricas de la leche de tanque. Arias y cols. (2013) también



indican que el riesgo de contaminación por BAB de la leche de tanque se incrementa cuando aumenta el nivel de contaminación de BAB en la ración de las ovejas de ordeño; asimismo, Vissers y cols. (2007b) establecieron una relación entre el recuento de esporas en leche y la superficie de los pezones.

3.2. Influencia de las prácticas ganaderas sobre los distintos grupos microbianos.

En este apartado se estudia la relación entre las prácticas ganaderas sobre los diferentes microorganismos encontrados en las distintas matrices de las ganaderías, así como las posibles rutas de contaminación entre matrices estudiadas, lo cual tiene especial relevancia dada las escasas investigaciones sobre estos aspectos en ovino lechero.

En la **Tabla 6** se presentan las correlaciones significativas obtenidas con la tau-B de Kendall entre los diferentes microorganismos en las diferentes matrices. Los resultados muestran correlaciones significativas dentro de cada tipo de microorganismos, pero también entre distintos microbios, por lo que se optó por aplicar un modelo CATPCA para cada uno de ellos, con el objetivo de resaltar patrones dentro de los datos sobre el mismo microorganismo, evitando así que CATPCA se sature con patrones entre ellos. El análisis se realizó de forma multivariante entre todos los microorganismos y todos los factores (**Tablas 7 y 8**). A continuación, se presentan los resultados para cada tipo de microorganismo.



Resultados y Discusión

Tabla 7. Dimensiones extraídas mediante componentes principales categóricos y saturaciones con las variables originales.

Dimensión	Recuento mesófilos totales		Bacterias ácido- lácticas		Levaduras		Mohos		Estafilococos		Esporas aerobias	Esporas butíricas	
	RMT-D1	RMT-D2	BAL-D1	BAL-D2	Lev-D1	Lev-D2	Mo-D1	Mo-D2	St-D1	St-D2	EA-D1	BAB-D1	BAB-D2
Leche (L)	0,69	-0,08	0,10	0,86	0,52	0,43	-0,15	-0,73	0,67	-0,47	0,73	0,82	-0,02
Sala de ordeño (A1)	0,68	-0,43	0,82	0,01	0,41	0,55	0,64	-0,13	0,82	0,23	0,70	0,82	0,29
Nave de ordeño (A2)	0,63	-0,46	0,67	-0,34	0,39	0,57	0,82	-0,00	0,42	0,68	0,59	0,35	0,87
Alimentación (Ali)	0,35	0,81	0,42	-0,43	0,68	-0,44	0,56	0,42	-0,03	0,70	0,64	0,47	-0,30
Pezones (P)	0,69	0,52	0,64	-0,49	0,76	-0,40	0,53	-0,61	0,77	-0,18	0,84	0,78	-0,49
Autovalor	1,94	1,35	1,73	1,29	1,62	1,26	1,69	1,20	1,90	1,26	2,50	2,30	1,18
Varianza (%)	38,76	26,70	34,62	25,85	32,45	25,11	33,84	24,03	38,83	24,64	48,19	45,98	23,57



Resultados y Discusión

Tabla 8. Factores asociados con las dimensiones extraídas mediante modelos mixtos.

Factores	Dimensiones (<i>F</i> valor de factores significativos, <i>p</i> <0,05)												
	RMT-D1	RMT-D2	BAL-D1	BAL-D2	Lev-D1	Lev-D2	Mo-D1	Mo-D2	St-D1	St-D2	EA-D1	BAB-D1	BAB-D2
Ovejas	ns	4,71	5,35	ns	ns	ns	ns	ns	5,45	ns	ns	8,62	ns
Producción	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	3,27	ns	ns	ns
Estación	ns	ns	ns	ns	2,76	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
TempSO	4,81	ns	ns	ns	ns	ns	6,02	ns	9,61	ns	ns	ns	ns
TempNO	ns	ns	4,99	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
HumSO	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
HumNO	ns	ns	ns	ns	ns	3,26	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
OrientSO	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
OrientNO	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
VentNO	ns	ns	5,68	ns	ns	ns	4,93	2,51	15,07	ns	ns	ns	ns
HigSO	ns	ns	ns	ns	ns	3,25	ns	4,32	ns	ns	ns	ns	ns
HigNO	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	3,08	ns	ns	ns
Línea	4,70	ns	ns	5,84	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
LimpiezaSO	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Filtro	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	2,93	11,79	ns
Contacto suelo	ns	5,95	ns	ns	10,04	ns	ns	ns	24,86	ns	ns	ns	ns
Ácido	ns	ns	ns	3,36	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
LecheríaSO	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Grano	6,42	ns	ns	ns	ns	ns	5,32	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Mamitis	13,59	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Secado	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Alimentación	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Ensilado	4,68	ns	ns	ns	12,73	ns	ns	10,34	ns	ns	26,43	9,90	ns
HigT	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
TipoT	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
RevisiónT	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Valor crítico	<0,01	<0,01	<0,001	<0,01	<0,001	<0,05	<0,001	<0,01	<0,001	<0,05	<0,001	<0,001	ns
R ² ajustada	34,8	18,7	38,7	15,9	24,1	17,2	26,5	17,9	58,0	10,3	43,3	47,0	-

Ovejas: número de hembras totales; Producción: leche producida al año; Estación: estación del año; TempSO: temperatura en la sala de ordeño; TempNO: temperatura en la nave de las ovejas de ordeño; HumSO: humedad en la sala de ordeño; HumNO: humedad en la nave de las ovejas de ordeño; OriSO: orientación de la sala de ordeño; OriNO: orientación de la nave de ordeño; VentNO: ventilación de la nave de las ovejas de ordeño; HigSO: higiene de la sala de ordeño; HigNO: higiene de la nave de las ovejas de ordeño; Línea: tipo de línea de ordeño; LimpSO: frecuencia de limpieza de la sala de ordeño; Filtro: frecuencia de cambio del filtro de ordeño; Contacto suelo: posibilidad de contacto de las pezoneras con el suelo; Ácido: frecuencia del uso de ácido en la limpieza de la máquina de ordeño; LecheríaSO: existe comunicación directa lechería-sala de ordeño; Grano: adición de alimento en la sala de ordeño; Mamitis: porcentaje de mamitis clínicas; Secado: aplicación de algún tratamiento de secado; Alimentación: unifeed comercial o propio; Ensilado: uso de ensilado; HigT: higiene del tanque de ordeño; TipoT: tipo de tanque de ordeño; RevisiónT: periodicidad de revisión del tanque de ordeño.



3.2.1. Recuento de Mesófilos Totales (RMT).

Se retuvieron dos dimensiones en los recuentos de mesófilos totales (RMT), que explicaron el 65,46% de la variación total en las cinco matrices estudiadas (leche de tanque, aire de sala de ordeño y nave de las ovejas de ordeño, alimentación de las ovejas de ordeño y superficie de los pezones) incluidas en CATPCA (**Tabla 7**).

La primera dimensión (RMT-D1) relacionó positivamente la concentración en la leche de tanque con la suciedad en la superficie de los pezones y el aire de la sala de ordeño y de la nave de las ovejas de ordeño. El modelo GLM con el mejor ajuste para la dimensión RMT-D1 obtuvo un coeficiente de determinación ajustado del 34,80%, e incluyó cinco de los factores estudiados en las ganaderías: uso de ensilado en la alimentación de las ovejas de ordeño, adición de alimento en la sala de ordeño (grano), porcentaje de mamitis clínicas en la ganadería, tipo de línea de ordeño, y temperatura media de la sala de ordeño (**Tabla 8**). La concentración de microorganismos presentes en las matrices de la dimensión RMT-D1 (leche, suciedad del área cercana a los pezones, y ambos aires de la explotación) aumentó significativamente cuando se utilizaba ensilado en la ración de las ovejas de ordeño y se adicionaba alimento durante el ordeño (grano), cuando el porcentaje de mamitis clínicas era elevado (superior al 2%), la ganadería disponía de una línea de ordeño baja, así como cuando la temperatura media de la sala de ordeño era superior a 14°C (**Figura 2a**).

El uso de ensilado en la ración de las ovejas de ordeño está relacionado con el incremento significativo de la concentración de RMT en el ambiente de la ganadería (aire de la sala de ordeño y aire del alojamiento de ovejas de ordeño), en la leche de tanque y en la superficie de los pezones.



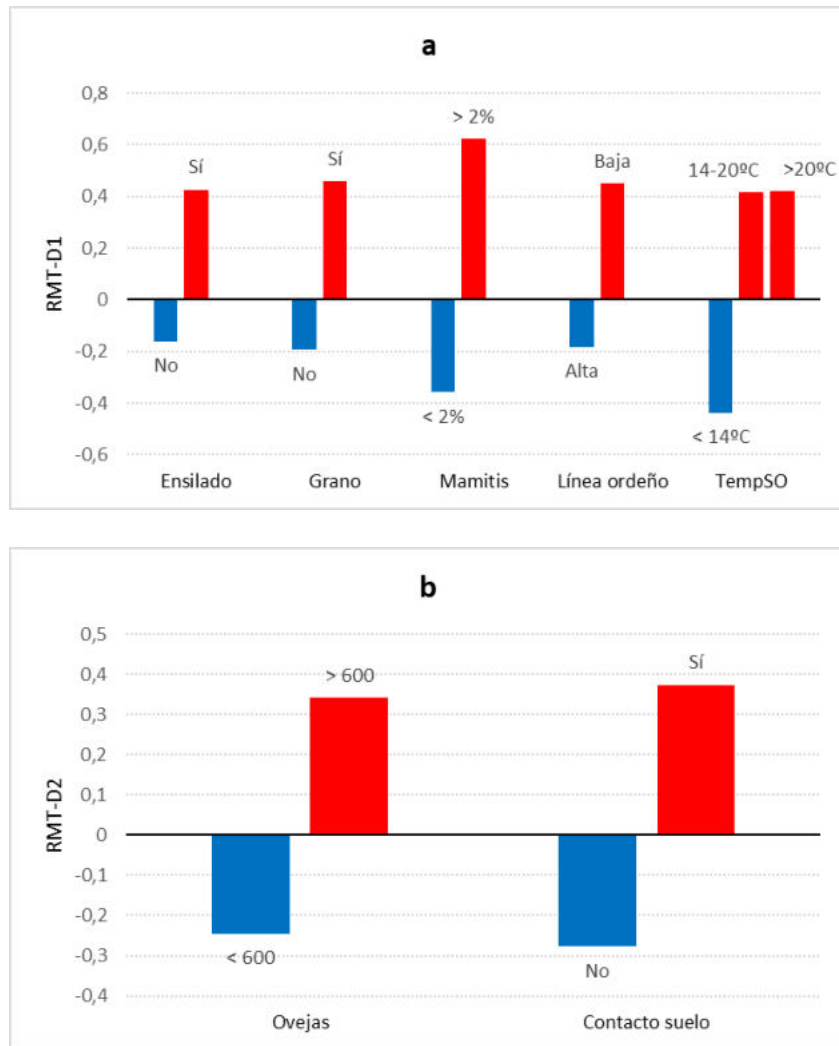


Figura 2. Medias de mínimos cuadrados de las dimensiones extraídas con la concentración de mesófilos totales (a: RMT-D1, b: RMT-D2) respecto a los factores incluidos en el modelo mixto con el mejor ajuste. Los colores indican diferencias significativas dentro de cada factor (Student–Newman–Keuls, SNK $p < 0,05$).

Previamente, Arias (2013) había observado una tendencia al incremento del RMT en leche de tanque cuando se utilizaba ensilado en la alimentación de las ovejas de ordeño. Además, en este estudio el uso de ensilado es característico de ganaderías con una gran densidad de animales y manejo intensivo, por lo que serían esperables altas concentraciones aéreas de RMT, como señalaban Bergonier y cols. (2003). Del mismo modo, la dispensación de alimento en sala de ordeño se relaciona con el aumento de RMT en las matrices de la dimensión RMT-D1. La dispensación de alimento en la sala de



ordeño provoca una mayor circulación del polvo y microorganismos, lo que aumenta el riesgo de contaminación de la leche de tanque a través de las pezoneras durante el ordeño.

En esta línea, el porcentaje de mamitis clínicas en la ganadería es otro factor relacionado con la cantidad de RMT en el aire de sala de ordeño y nave de las ovejas de ordeño, en la superficie de los pezones y en leche de tanque, siendo superior en las ganaderías con un porcentaje de mamitis superior al 2% (dimensión RMT-D1). Estudios previos han correlacionado positivamente el recuento de células somáticas de leche de tanque (RCS), indicador de infecciones intramamarias, con el RMT (Gonzalo y cols., 2006; De Garnica y cols., 2013); incluso, otros trabajos como el de Jiménez (2019), relacionan el aumento de RCS con una higiene deficiente del alojamiento de las ovejas de ordeño. Esta investigación está en concordancia con estos resultados, ya que un ambiente más contaminado en las ganaderías, con una mayor suciedad de los pezones de las ovejas, podría elevar el RCS y condicionar el aumento de infecciones intramamarias en el rebaño.

En el caso de la línea de ordeño, se observó que la línea baja contribuye a una mayor concentración de RMT en el ambiente de la ganadería y suciedad del área de los pezones, afectando a la leche de tanque. Existen otros estudios previos donde se mostraban diferencias estadísticamente significativas entre el uso de línea alta o línea baja en relación a la concentración de RMT, aumentando la presencia de bacterias en las ganaderías de ovino con línea alta (Gonzalo y cols., 2019). Sin embargo, en otras investigaciones se encontraron diferencias, aunque no fueron significativas, en donde la línea baja aumenta la concentración de RMT en ganaderías de ovino Manchego (Jiménez, 2019). En este estudio, el aumento de RMT en leche en las ganaderías con línea baja puede ser debido a la inclusión en el modelo de matrices ambientales como son el aire de la sala de ordeño, el aire de la nave de las ovejas de ordeño y la superficie de los pezones,



factores no estudiados previamente. Además, la propia configuración de la línea baja en cuanto a la disposición de los tubos de leche más cerca del suelo, donde el ambiente está más contaminado, así como otros factores diferenciales con el tipo de línea alta, podría condicionar el aumento de RMT en leche de tanque en ganaderías con línea baja.

El RMT en las matrices de RMT-D1 también se ha visto influenciado por la temperatura media de la sala de ordeño. Este recuento es menor cuando la temperatura es inferior a 14°C, aumenta con temperaturas entre 14°C y 20°C, y aún tiene un mayor incremento si la temperatura es superior a 20°C, lo que es acorde con el rango de temperatura óptimo de crecimiento de los microorganismos en condiciones aerobias (Camarotte, 2013). Este factor no ha sido previamente estudiado en ganaderías de ovino lechero; sólo Sevi y cols. (2009) indicaron que el rango óptimo de temperatura ambiental para una eficiente producción lechera en pequeños rumiantes varía entre 5°C y 20°C, en términos de bienestar animal, estando el valor entre 10°C y 20°C en ovino de raza Manchega (Ramón y cols., 2016).

La segunda dimensión (RMT-D2) mostró una relación positiva entre la concentración de microorganismos en el alimento suministrado en pesebre a las ovejas de ordeño y la suciedad cercana a los pezones (**Tabla 7**). El modelo GLM con el mejor ajuste (18,70%) identificó dos factores significativos: el número de ovejas de la ganadería y el contacto de las pezoneras con el suelo (**Tabla 8**). La concentración de mesófilos totales en las matrices de la dimensión RMT-D2 aumentó significativamente cuando el número de ovejas en la ganadería es superior a 600 hembras, y se observa una mayor caída de pezoneras y su contacto con el suelo (**Figura 2b**).

El aumento de RMT cuando la ganadería tiene más de 600 hembras (dimensión RMT-D2) también es coherente con la relación de estas ganaderías con una higiene más deficiente, lo cual aumenta la cantidad de suciedad en el ambiente y camas, afectando la



contaminación por mesófilos del alimento y de los pezones. Arias y cols. (2013) y Jiménez y cols. (2015) ya observaron la importancia de la higiene de los alojamientos en la ganadería y cómo afecta negativamente a la contaminación ambiental cuando es deficiente. Además, una de las zonas más contaminadas de la sala de ordeño es el suelo debido a la suciedad acumulada, heces animales y polvo, por lo que, en las ganaderías con una alta frecuencia de caídas de pezoneras al suelo, la contaminación a través de los pezones de las ovejas será mayor, y por ello la concentración de RMT puede verse aumentada.

3.2.2. Bacterias ácido-lácticas (BAL).

En el caso de las bacterias ácido-lácticas (BAL), se retuvieron dos dimensiones en el estudio multivariante con los factores relacionados con la ganadería, que explicaron el 60,47% de la variación total (**Tabla 7**).

Las saturaciones con BAL-D1 indican una relación positiva entre las concentraciones de BAL del aire de la sala de ordeño, el aire de la nave de las ovejas de ordeño y la superficie de los pezones. El modelo GLM con el mejor ajuste alcanzó un coeficiente de determinación ajustado del 38,70% e identificó tres factores significativamente asociados con BAL-D1: el tamaño del rebaño y la ventilación y la temperatura de la nave de las ovejas de ordeño (**Tabla 8**). La concentración de BAL en las matrices asociadas a la dimensión BAL-D1 aumentó significativamente en ganaderías con un censo mayor de 600 ovejas, con alta ventilación y temperaturas superiores a 10°C en la nave de las ovejas de ordeño, siendo más evidente su incremento con temperaturas superiores a 20°C (**Figura 3a**).



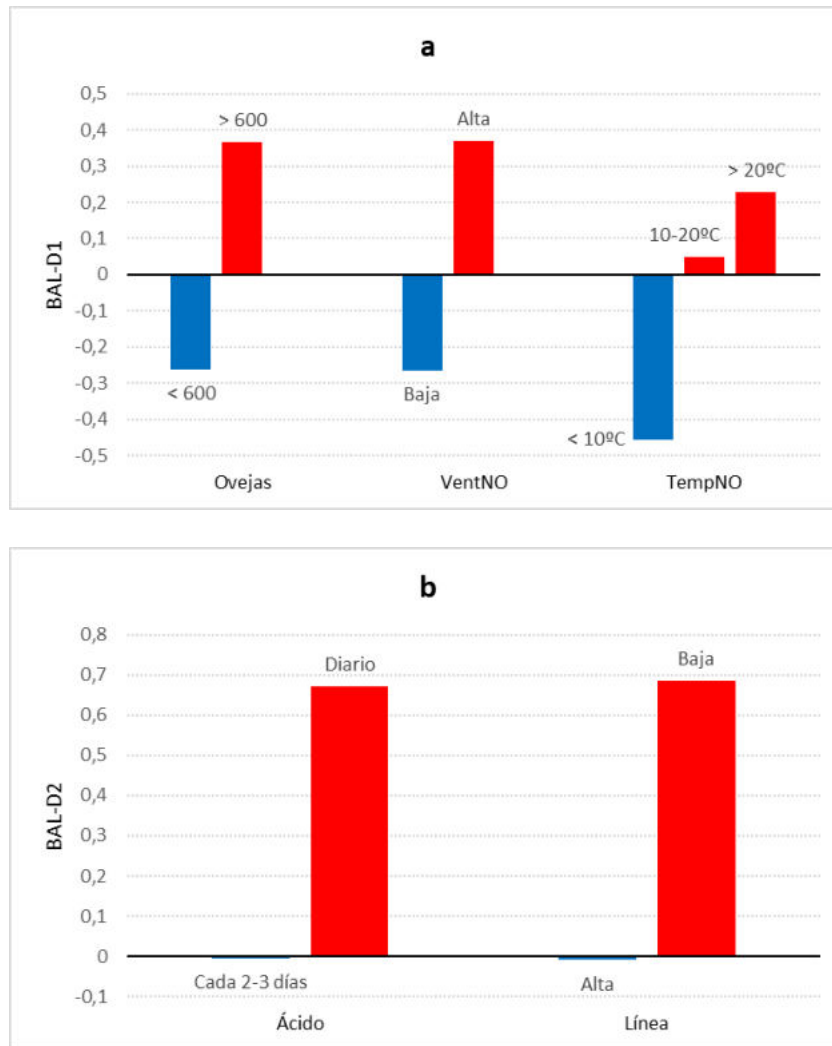


Figura 3. Medias de mínimos cuadrados de las dimensiones extraídas con la concentración de BAL (a: BAL-D1, b: BAL-D2) respecto a los factores incluidos en el modelo mixto con el mejor ajuste. Los colores indican diferencias significativas dentro de cada factor (Student–Newman–Keuls, SNK $p < 0,05$).

En este caso, se observa que la contaminación en el ambiente de la ganadería se ve influenciada por la ventilación. Caroprese (2008) explicó que una ventilación inadecuada en las naves de la ganadería es responsable de un incremento en la contaminación ambiental, ya que una ventilación pobre aumenta la concentración de gases resultantes de la respiración animal y aumenta la humedad, mientras que una ventilación excesiva aumenta la concentración de polvo debido probablemente a un régimen de aire turbulento causado por los altos flujos de ventilación que mantienen las partículas suspendidas durante mucho tiempo. En nuestra investigación, una ventilación elevada genera un



aumento de la concentración de BAL en el aire de las ganaderías y en la superficie de los pezones, viéndose afectada esta concentración también en las ganaderías con mayor censo de ovejas y, por consiguiente, más movimiento de animales y más suciedad y polvo transportado, lo que aumenta la concentración de microorganismos en las matrices descritas en la dimensión BAL-D1. Además, dicha concentración de BAL también se vio afectada por temperaturas superiores a 10°C en la nave del alojamiento de las ovejas, acentuándose en temperaturas superiores a 20°C, lo cual es coherente con el rango de temperaturas óptimo para el crecimiento y dispersión BAL, comprendido entre 30°C y 40°C (Herrerros y cols., 2003).

La segunda dimensión (BAL-D2) sólo mostró una relación positiva de la concentración en la leche de tanque (**Tabla 7**). El modelo GLM con el mejor ajuste (25,85%) identificó dos factores significativos: el tipo de línea de la sala de ordeño y el uso de ácido durante la limpieza (**Tabla 8**). La concentración de BAL en las matrices de la dimensión BAL-D2 aumentó significativamente con el uso diario de ácido durante la limpieza y cuando la ganadería tiene una sala de ordeño de línea baja (**Figura 3b**).

En el presente estudio, el sistema de ordeño en línea baja contribuye a la presencia de BAL en la leche de tanque, igual que se ha descrito para la concentración de RMT; sin embargo, en otro estudio en ovino manchego llevado a cabo por Jiménez (2019) no se observaron diferencias significativas en el nivel de BAL entre salas de ordeño de línea baja y línea alta. Ante la falta de referencias bibliográficas sobre el tema, estos resultados podrían deberse a las diferencias existentes en la concentración de BAL en función de la altura de la sala o de la instalación, donde probablemente los mayores niveles de este microorganismo se encontrarían en zonas cercanas al suelo, y a diferencias entre el tipo de sala de ordeño tal y como se ha comentado en el apartado de RMT-D1. Este hecho provocaría un aumento de los niveles de BAL en leche de tanque en ganaderías donde el



sistema de ordeño sea en línea baja, particularmente en ganaderías con un mantenimiento deficiente en la máquina de ordeño y que puedan tener alterados los valores del sistema de vacío, ambos aspectos recientemente evidenciados en instalaciones de ordeño españolas (Gonzalo y cols., 2019).

De la misma forma, el uso diario de ácido en la rutina de limpieza de la máquina de ordeño favorece la presencia de BAL en la leche de tanque debido a que esta práctica de limpieza probablemente seleccione los microorganismos más resistentes, aunque una mayor contaminación microbiana se puede ver favorecida por el deterioro del ácido de las pezoneras y tubos de leche. Por lo tanto, el uso diario de detergente ácido podría causar un mayor deterioro del material del revestimiento de estos elementos de la sala, lo que podría facilitar la proliferación y transmisión de BAL. Las BAL son microorganismos que pueden dar una diferenciación cualitativa a los productos lácteos, y su presencia es siempre deseable; sin embargo, esta práctica no sólo facilita la aparición de BAL en la leche, sino que podría ser un foco de contaminación de bacterias indeseables también. El control de la higiene y de las prácticas de limpieza de la sala de ordeño ayudaría a preservar una mayor comunidad bacteriana de la leche, obteniendo un perfil más equilibrado entre bacterias deseables y no deseables (Verdier-Metz y cols., 2009).

3.2.3. Levaduras (Lev).

Para los recuentos de levaduras (Lev) se retuvieron dos dimensiones, que explicaron el 57,56% de la variación en las cinco matrices muestreadas e incluidas en CATPCA (**Tabla 7**).

La primera dimensión (Lev-D1) relacionó positivamente la concentración de levaduras en la leche de tanque con la concentración en el alimento de las ovejas de ordeño y de la superficie de los pezones. El modelo GLM con el mejor ajuste para la dimensión Lev-D1 obtuvo un coeficiente de determinación ajustado del 24,1%, e incluyó



dos factores: contacto de las pezoneras con el suelo y el uso de ensilado en la alimentación (Tabla 8). La concentración de levaduras en las matrices asociadas a Lev-D1 aumentó significativamente cuando era más frecuente la caída de pezoneras, cuando se usó ensilado en la alimentación de las ovejas de ordeño y en los meses correspondientes a invierno y, sobre todo, otoño. (Figura 4a).

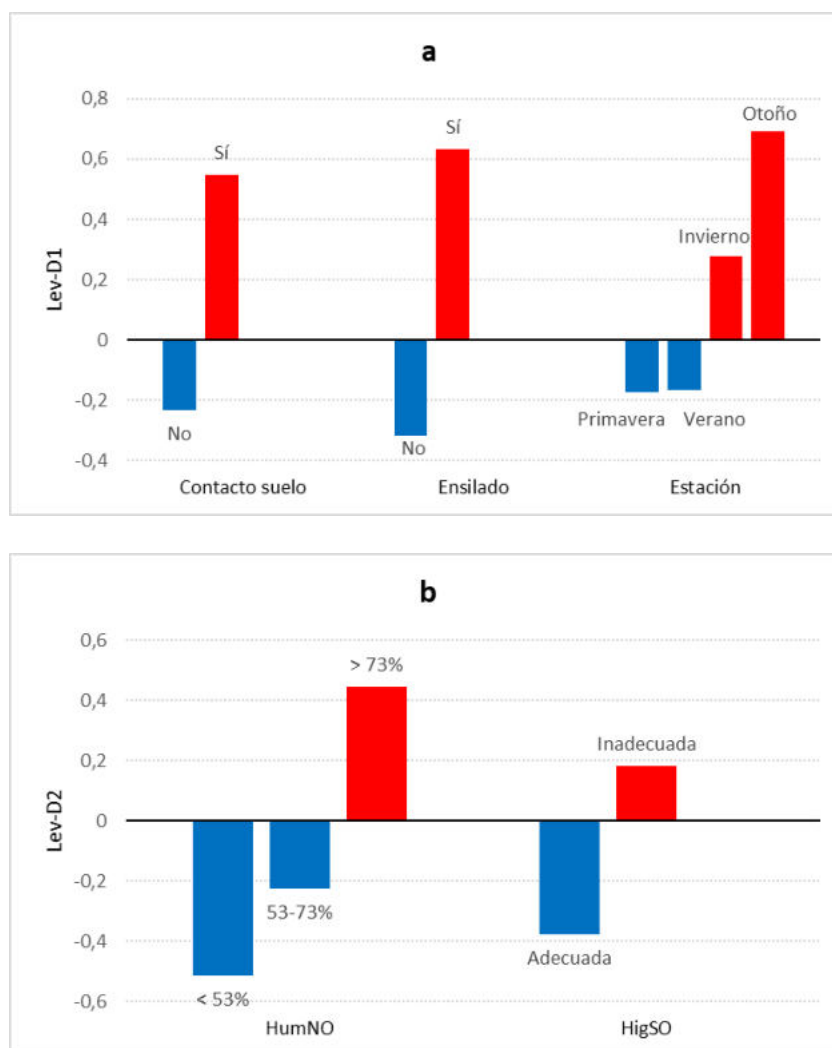


Figura 4. Medias de mínimos cuadrados de las dimensiones extraídas con la concentración de levaduras (a: Lev-D1, b: Lev-D2) respecto a los factores incluidos en el modelo mixto con el mejor ajuste. Los colores indican diferencias significativas dentro de cada factor (Student–Newman–Keuls, SNK $p < 0,05$).

Estos resultados sugieren que la contaminación de levaduras en leche de tanque puede provenir principalmente de determinadas materias primas, como el ensilado, utilizadas en la elaboración de las raciones de las ovejas de ordeño, de forma similar a lo



descrito sobre otros microorganismos, como las esporas del género *Clostridium* en las ganaderías (Arias y cols., 2013). En esta línea, López y cols. (2003), también indican que aumenta el recuento de levaduras en leche al utilizar ensilado, especialmente en invierno. Vissers y cols. (2007d) explican esta circunstancia por la proliferación de gérmenes aerobios (generalmente iniciados por levaduras) en ensilados con deficiencias en su elaboración y conservación, que promueven su deterioro.

Además, los resultados indicaron que un manejo inadecuado de la rutina en el ordeño, con una mayor frecuencia de caída de las pezoneras y su contacto con el suelo, puede contaminar pezoneras y pezones, y potenciar la presencia de levaduras en la leche. Este hecho supone un aumento de levaduras presentes en la leche de tanque, donde previamente se habían documentado concentraciones de levaduras en la leche de forma natural, pero en cantidades reducidas (Von Neubeck y cols., 2015), probablemente debido a la competencia por los sustratos de crecimiento con las bacterias psicrófilas presentes en la leche. Las levaduras necesitan alta humedad relativa y su rango óptimo de crecimiento está en torno a 25°C (Camacho y cols., 2009), por lo que se ha observado una mayor cantidad de levadura en leche en las estaciones más frías, viéndose acentuada la concentración durante los meses en los que las temperaturas no son tan extremas, como es el caso de la estación de otoño.

La segunda dimensión (Lev-D2) mostró una relación positiva entre el aire de la sala de ordeño y el aire de la nave de las ovejas de ordeño (**Tabla 7**). El modelo GLM con el mejor ajuste (17,2%) identificó dos factores significativos: humedad de la nave de las ovejas de ordeño e higiene de la sala de ordeño (**Tabla 8**). Las concentraciones de levaduras en las matrices de Lev-D2 aumentaron significativamente con una humedad relativa mayor del 73% en la nave de las ovejas de ordeño y cuando la higiene de la sala de ordeño fue clasificada como inadecuada (**Figura 4b**).



Carlile y Watkinson (2001) indican que este tipo de microorganismos necesitan una humedad relativa elevada en el aire (en torno al 90%) para su óptimo crecimiento. Por ello, en este caso, la presencia de levaduras en el aire de la ganadería se ve aumentada cuando el valor supera el 73% de humedad relativa. Sevi y cols. (2009) establecieron que la condición óptima para la producción de leche en ovejas debería ser menor de 70% para optimizar la eficiencia metabólica de los pequeños rumiantes, por lo que regular la humedad relativa de estos ambientes podría suponer un equilibrio en la población de levaduras presentes en los ambientes de la ganadería.

Además, este aumento del recuento de levaduras se relaciona con el factor estado higiénico de la sala de ordeño, por lo que mantener una correcta higiene en las instalaciones de ordeño es primordial, debido a que incentiva la eliminación de bacterias indeseables (Jiménez, 2019). Por ello, establecer un código de buenas prácticas higiénicas en el ordeño, así como los programas de revisión en los equipos de ordeño, podría mejorar las características organolépticas y la calidad del producto final, controlando altas concentraciones de especies indeseables que podrían provocar olores y sabores desagradables, y manteniendo un equilibrio con aquellas que tienen propiedades beneficiosas en la calidad de los productos lácteos. Además, el conocimiento sobre la concentración de levaduras en el aire de la sala de ordeño es muy interesante, con el fin de minimizar la contaminación iatrogénica de la glándula mamaria en el momento de la práctica de la terapia de secado antibiótico.

3.2.4. Mohos (Mo).

Se retuvieron dos dimensiones en los recuentos de mohos (Mo), que explicaron el 57,87% de la variación las cinco matrices muestreadas e incluidas en CATPCA (**Tabla 7**).



Las saturaciones con Mo-D1 indican una relación positiva entre el aire de la sala de ordeño, el aire de la nave de las ovejas de ordeño, la alimentación y la superficie de los pezones. El modelo GLM con el mejor ajuste alcanzó un coeficiente de determinación del 26,5% e identificó tres factores significativamente asociados con Mo-D1: la ventilación en la nave de las ovejas de ordeño, la dispensación de alimento en la sala de ordeño (grano) y la temperatura de la sala de ordeño (**Tabla 8**).

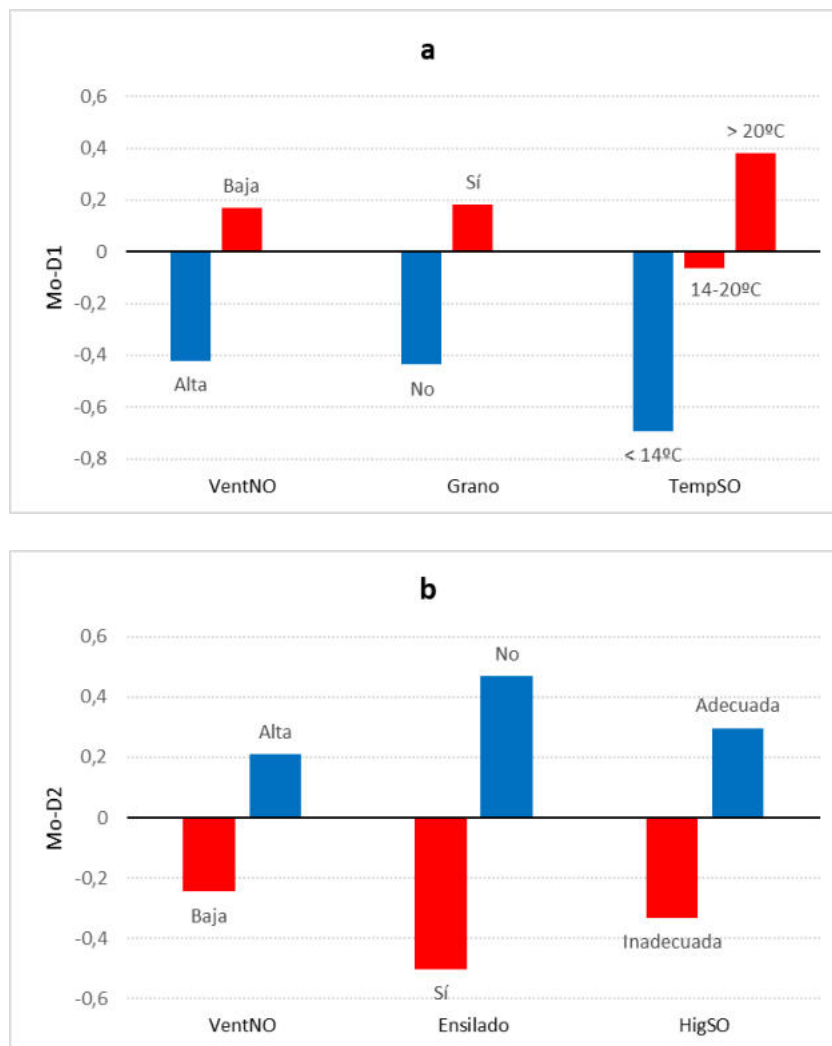


Figura 5. Medias de mínimos cuadrados de las dimensiones extraídas con la concentración de mohos (a: Mo-D1, b: Mo-D2) respecto a los factores incluidos en el modelo mixto con el mejor ajuste. Los colores indican diferencias significativas dentro de cada factor (Student–Newman–Keuls, SNK $p < 0,05$).

Las concentraciones de mohos en las muestras asociadas a la dimensión Mo-D1 aumentaron significativamente con una baja ventilación en la nave de las ovejas de



ordeño, cuando se dispensa alimento durante el ordeño y cuando la temperatura es superior a 20°C en la sala de ordeño (**Figura 5a**).

Como se ha comentado previamente, una baja ventilación aumenta la concentración de gases resultantes de la respiración animal y aumenta la humedad relativa, habiéndose correlacionado positivamente la humedad elevada en ganaderías y el aumento de la presencia de hongos (Popescu y cols., 2011). Así, en este estudio se observa como una baja ventilación afecta el nivel de mohos en los ambientes de la ganadería, probablemente debido a la contaminación existente en el alimento que recircula entre los ambientes de la ganadería contaminando también los pezones. La dispensación de alimento durante el ordeño también aumenta la cantidad de moho en el ambiente, lo que puede deberse al aumento de polvo que produce este manejo en la sala. A su vez, la temperatura óptima de crecimiento de los mohos se sitúa en el rango entre 25°C y 30°C (Camacho y cols., 2009), y en este estudio la concentración de moho en el ambiente y pezones ha sido superior cuando la temperatura es mayor de 20°C.

La segunda dimensión (Mo-D2) mostró una relación entre la concentración en la leche de tanque con la superficie de los pezones, con valores negativos de la dimensión (**Tabla 7**). El modelo GLM con el mejor ajuste (17,9%) identificó tres factores relacionados con el recuento de mohos: la ventilación en la nave de las ovejas de ordeño, el uso de ensilado y la higiene en la sala de ordeño (**Tabla 8**).

Así, el recuento de mohos de la leche de tanque y la superficie de pezones, matrices de la dimensión Mo-D2, aumentaron significativamente con una baja ventilación en la nave de las ovejas de ordeño, cuando se usó ensilado en la alimentación y con una inadecuada higiene de la sala de ordeño (**Figura 5b**). Como ya se ha explicado en la dimensión Mo-D1, la baja ventilación puede afectar a la concentración de mohos en la ganadería, lo que parece ser un factor determinante para la transmisión de mohos dentro



de la ganadería. El aumento en los niveles de mohos en la suciedad del área cercana a los pezones aumenta el riesgo de que estos contaminen la leche de tanque a través de la pezonera durante el ordeño, como ya se ha visto en otros estudios (Vacheyrou y cols., 2011).

En el ensilado es bien conocida la presencia de especies de mohos y el riesgo de producción de micotoxinas (Ogunade y cols., 2018), por lo que el uso de ensilado puede provocar una mayor la contaminación por mohos de los pezones de las ovejas de ordeño y de la leche de tanque.

En el aspecto de la higiene de la sala de ordeño, como ya demostraron Oliete y cols. (2010), la calidad microbiológica de la leche está relacionada con las prácticas higiénicas de las ganaderías, por lo que la inadecuada eficiencia en los métodos de limpieza afecta a la concentración de gérmenes en la leche de tanque, siendo probable, en este caso, esta vía de contaminación de los mohos a partir de la suciedad de los pezones.

3.2.5. Estafilococos (St).

Se retuvieron dos dimensiones en los recuentos de estafilococos (St), explicando el 63,47% de la variación las cinco matrices muestreadas e incluidas en CATPCA (**Tabla 7**).

La primera dimensión (St-D1) relacionó positivamente el recuento de estafilococos en la leche de tanque con el aire de la sala de ordeño y la superficie de los pezones. El modelo GLM con el mejor ajuste para la dimensión St-D1 obtuvo un coeficiente de determinación ajustado del 58,00%, e incluyó cuatro factores de variación: ventilación en la nave de las ovejas de ordeño, tamaño del rebaño, contacto de las pezoneras con el suelo y temperatura en la sala de ordeño (**Tabla 8**). La concentración de estafilococos en las matrices de la dimensión St-D1 aumentó significativamente cuando la ventilación de la nave de las ovejas de ordeño era alta, cuando el tamaño de rebaño era mayor de 600



ovejas, en ganaderías donde se observó una mayor frecuencia de caída de pezoneras y cuando la temperatura de la sala de ordeño fue superior a 14°C, sobre todo a partir de 20°C (Figura 6a).

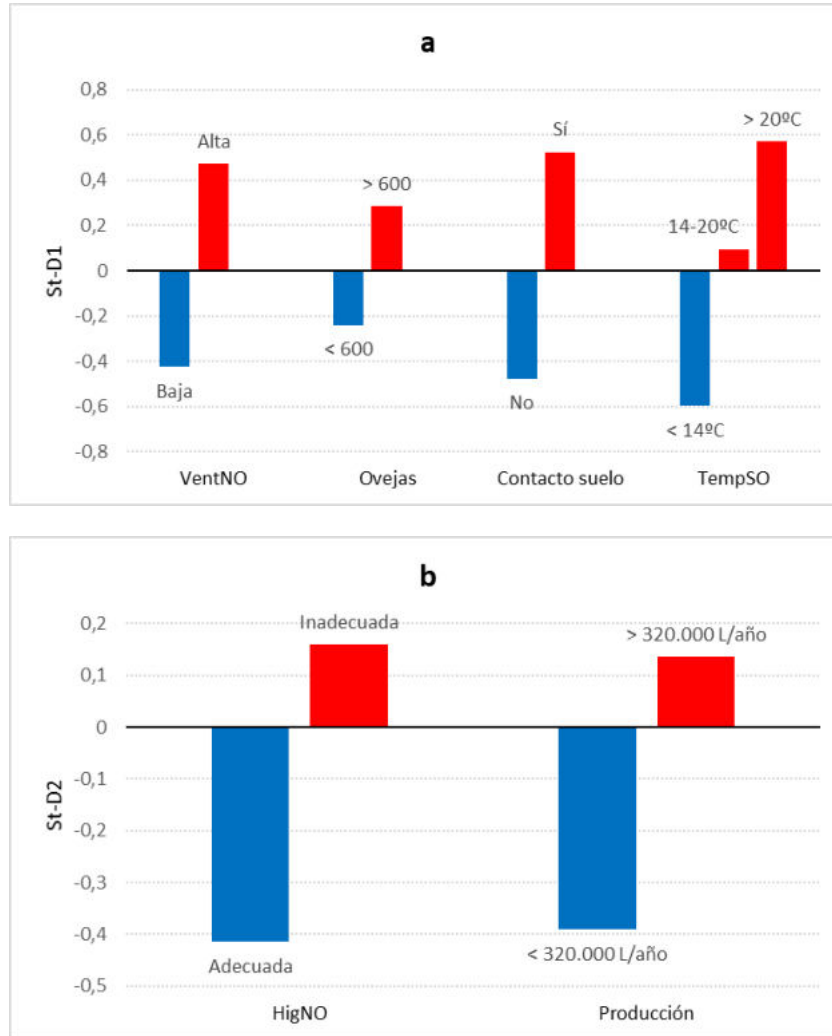


Figura 6. Medias de mínimos cuadrados de las dimensiones extraídas con la concentración de estafilococos (a: St-D1, b: St-D2) respecto a los factores incluidos en el modelo mixto con el mejor ajuste. Los colores indican diferencias significativas dentro de cada factor (Student–Newman–Keuls, SNK $p < 0,05$).

Como se ha ido comprobando a lo largo del estudio, la ventilación de la nave de ordeño es un factor importante para la contaminación ambiental, debido a la acumulación de suciedad, polvo, etc., que compromete la sanidad y el bienestar animal (Bouton, 2011). En este estudio, una elevada ventilación aumenta la concentración de estafilococos en la leche, aire de la sala de ordeño y superficie de pezones, probablemente debido a que altos flujos de aire producen, igual que en el caso de BAL-D1, aumentos en la cantidad de



polvo debido al régimen de aire turbulento, que mantiene las partículas suspendidas, incentivando la contaminación entre el ambiente de la nave de ordeño y la leche.

De la misma forma, se ha observado que el contacto frecuente de las pezoneras con el suelo aumenta la concentración de estafilococos en estas matrices; además, en este estudio, las ganaderías de mayor tamaño censal presentan una higiene más deficiente en las salas, con un mayor acúmulo de suciedad, polvo, y heces, por lo que el riesgo de contaminación de pezoneras y de pezones es mayor y, por ende, de la leche.

Asimismo, en otros estudios en la misma raza (Jiménez, 2019) se ha observado una tendencia a aumentar la concentración de estafilococos en leche de tanque cuando la capacidad de la sala de ordeño es mayor de 20 puestos de ordeño. Esta información es coherente con los resultados obtenidos, donde se observa que, en las ganaderías de mayor tamaño censal, en las que lógicamente el suelen disponer de un mayor número de puestos de ordeño, aumenta la concentración de estafilococos en leche, en el ambiente de la sala y en la superficie de los pezones.

La temperatura también ha sido un factor que ha influido en la presencia de estafilococos en el ambiente de la nave de ordeño, superficie de pezones y leche de tanque. Stewart (2003) indica que la temperatura óptima de crecimiento de estos microorganismos es de 37°C, por lo que el aumento de temperatura ambiental por encima de 20°C deberá favorecer su incremento, tal como sucede en este estudio.

La segunda dimensión (St-D2) mostró una relación positiva entre los niveles de contaminación en el aire de la nave y en el alimento de las ovejas de ordeño (**Tabla 7**). El modelo GLM con el mejor ajuste (10,3%) identificó dos factores significativos: higiene de la nave de las ovejas de ordeño y producción de leche de la ganadería (**Tabla 8**). St-D2 aumentó significativamente cuando la higiene de la nave no era adecuada y cuando la producción de leche de la ganadería superaba los 320.000 L/año (**Figura 6b**).



La principal fuente de contaminación de la leche de tanque por estafilococos es la leche de ovejas con infecciones intramamarias, aunque se han descrito otras fuentes de contaminación ambiental, como la presencia de biofilms en la máquina de ordeño o procedentes de las manos del personal que se ocupa del ordeño (Cullor, 1997).

En el presente estudio, se ha constatado que el nivel de contaminación por estafilococos del alimento es alto (4,504 log₁₀ UFC/g alimento), de hecho, el valor más elevado entre las distintas matrices analizadas en esta dimensión. La dispensación del alimento, las labores de limpieza de comederos, etc., en la nave de las ovejas ordeño podría ser la fuente de contaminación por estafilococos del aire de estas dependencias, lo cual explica que el factor higiene de la nave de ordeño (HigNO) resulte significativo en la variación del recuento de estafilococos; otros estudios en la raza Manchega (Jiménez, 2019) también indican un incremento del recuento de estafilococos en ganaderías con higiene calificada como deficiente, sobre todo en ganaderías con un mayor nivel de producción de leche, es decir, en las más especializadas y/o con mayor tamaño censal.

3.2.6. Bacterias formadoras de esporas aerobias (EA).

En el análisis multivariante entre los factores de la ganadería y las bacterias formadoras de esporas aerobias sólo se retuvo una dimensión (EA-D1), que explicó el 48,19% de la variación total de las diferentes muestras estudiadas (**Tabla 7**).

La dimensión EA-D1 indica una alta relación positiva entre la concentración de esporas aerobias de la leche de tanque, aire de la sala de ordeño y de la nave de las ovejas de ordeño, superficie de los pezones y alimento de las ovejas de ordeño. El modelo GLM con el mejor ajuste alcanzó un coeficiente de determinación ajustado del 43,3% e identificó dos factores significativamente asociados con EA-D1: frecuencia de cambio de filtro en la sala de ordeño y el uso de ensilado en la alimentación de las ovejas de ordeño (**Tabla 8**). La concentración de microorganismos productores de esporas aerobias para



las matrices asociadas en la dimensión EA-D1 aumentó significativamente con una menor frecuencia de cambio del filtro de sala de ordeño y el uso de ensilado (**Figura 7**).

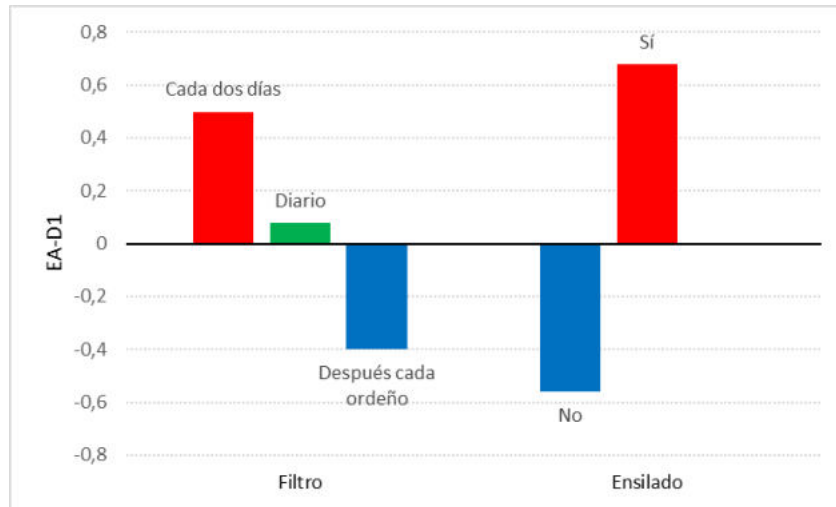


Figura 7. Medias de mínimos cuadrados de la dimensión extraída con la concentración de microorganismos productores de esporas aerobias (EA-D1) respecto a los factores incluidos en el modelo mixto con el mejor ajuste. Los colores indican diferencias significativas dentro de cada factor (Student–Newman–Keuls, SNK $p < 0,05$).

Previamente ha sido demostrado en ganado vacuno que existe un gran riesgo de contaminación de la leche por esporas de microorganismos aerobios mesófilos mediado por el deterioro de los ensilados usados en la alimentación animal (Driehuis y cols., 2016). Estas esporas se concentran en las heces animales y se transfieren a través de la suciedad de los pezones hasta la leche de tanque durante el ordeño (Vissers y cols., 2007b), por lo que sería un buen indicador de la suciedad de las ubres y de riesgo de contaminación de la leche de tanque. Esta información previa es congruente con este estudio, puesto que con el uso de ensilado aumenta el nivel de esporas aerobias en el ambiente de las ganaderías y en la leche. Además, esta relación se ve afectada por la frecuencia del cambio de filtro de la máquina de ordeño, aumentando la concentración de bacterias cuando este se cambia con menos frecuencia, lo que reduce su eficacia de filtrado, aumentando la contaminación por esporas aerobias de la leche de tanque.



3.2.7. Esporas ácido-butíricas (BAB).

En el estudio de las esporas butíricas (BAB) se retuvieron dos dimensiones, que explicaron el 69,55% de la variación total (**Tabla 7**).

Las saturaciones con la primera dimensión, BAB-D1, indican una relación positiva entre la concentración esporas butíricas en leche de tanque, el aire de la sala de ordeño y la superficie de los pezones. El modelo GLM con el mejor ajuste alcanzó un coeficiente de determinación ajustado del 47,00% e identificó tres factores significativamente asociados con BAB-D1: el tamaño del rebaño, la frecuencia de cambio del filtro de ordeño y el uso de ensilado en la alimentación (**Tabla 8**). Así, el recuento de esporas butíricas en las dimensiones asociadas a BAB-D1 aumentó significativamente con un mayor tamaño de rebaño, cuando el filtro de ordeño era cambiado cada dos o más días y cuando se usó ensilado en la alimentación (**Figura 8**).

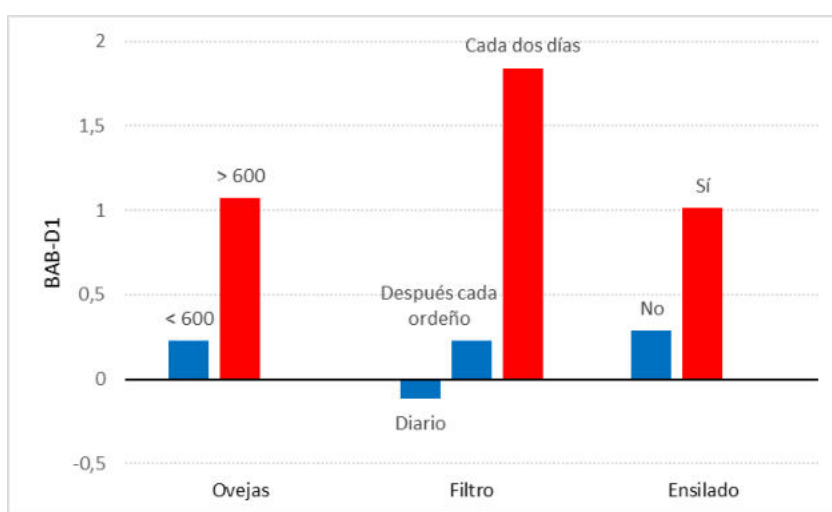


Figura 8. Medias de mínimos cuadrados de la dimensión extraída con la concentración de esporas butíricas (BAB-D1) respecto a los factores incluidos en el modelo mixto con el mejor ajuste. Los colores indican diferencias significativas dentro de cada factor (Student–Newman–Keuls, SNK $p < 0,05$).

Como ocurre en el caso de las esporas aerobias, el cambio de filtro cada 2-3 días implica un aumento de las esporas butíricas en el ambiente de la sala de ordeño, en la superficie de los pezones y en la leche de tanque. La acumulación de suciedad en el filtro



parece ser un factor decisivo para la contaminación de esporas en la ganadería. De este mismo modo, así como ocurre para las esporas aerobias, el uso de ensilado aumenta notoriamente la cantidad de esporas en la leche de tanque, afirmación que ya ha sido reportada previamente por Arias y cols. (2013). El control y buen uso de los ensilados en la ración de las ovejas de ordeño sería un buen manejo de la ganadería en cuanto a prevención de esporas en leche.

Además, se ha observado que con la presencia de un número elevado de animales de ordeño es mucho más complicado preservar las condiciones higiénicas de la ganadería, provocando aumentos en la concentración de gérmenes esporulados, tal y como se había observado anteriormente en ganado vacuno (Magnusson y cols., 2007; Martin y cols., 2019) y en ovino (Arias, 2013).

La segunda dimensión, BAB-D2, indicó sólo una relación positiva con el aire de la nave de ovejas de ordeño. Sin embargo, no pudo realizarse un modelo GLM debido a que no se ha identificado ningún factor significativo, lo que indicaría que las BAB en este ambiente podrían estar influenciadas por otros factores no considerados en este estudio.

3.3. Biodiversidad de las bacterias ácido-lácticas (BAL) en ganaderías de ovino manchego.

(Este apartado se corresponde con el Artículo 2 del Anexo 3)

3.3.1. Genotipado e identificación de aislados de BAL.

La presencia de BAL en el ambiente de las ganaderías no ha sido previamente estudiada en profundidad, especialmente en el caso del ovino lechero. Por ello, este estudio ha realizado la caracterización de las BAL y su posible transferencia entre los ambientes de estas explotaciones y otras matrices, como la alimentación de las ovejas de



ordeño, la superficie de los pezones y la leche de tanque, en relación con el sistema de producción y manejo de las ganaderías estudiadas.

Las bacterias lácticas (BAL) han sido aisladas en todas las matrices a lo largo del periodo de estudio, lo cual es muy interesante dada la importancia de este microorganismo de interés tecnológico. Entre las matrices estudiadas, los recuentos de BAL han sido superiores en las muestras de alimentación de las ovejas de ordeño ($4,5 \log_{10}$ UFC/g), seguidos por las de leche de tanque ($4,214 \log_{10}$ UFC/ml) y las de superficie de pezones ($2,910 \log_{10}$ UFC/pezones) (**Tabla 5**), mientras que las matrices con menores recuentos fueron el aire de la sala de ordeño y de la nave de las ovejas de ordeño ($0,638 \log_{10}$ UFC/m³ y $0,843 \log_{10}$ UFC/m³, respectivamente).

Para el genotipado de las bacterias lácticas, se estudiaron un total de 703 aislados en medio de cultivo MRS de todas las matrices analizadas. La RAPD-PCR, mostró 304 patrones diferentes con un valor $r > 86\%$, obtenido a partir de un estudio de reproducibilidad realizado previamente. El análisis mediante MALDI-TOF, al menos de un aislado de estos patrones, permitió la identificación de especies de los géneros *Lactobacillus* (Lb.), *Pediococcus* (P.), *Streptococcus* (S.), *Lactococcus* (Lc.), *Leuconostoc* (L.), *Weissella* (W.) y *Enterococcus* (E.), con una probabilidad de identificación del 99,9%. En todas las matrices se identificó al menos una especie de cada uno de estos géneros, con excepción de los géneros *Streptococcus* y *Lactococcus*, que sólo se encontraron en muestras de leche y en el caso de *Lactococcus* también en el aire de la sala de ordeño.

El género predominante fue *Lactobacillus* con un porcentaje del 74% de todas las especies identificadas, mientras que el género *Pediococcus* supuso un porcentaje del 8%. *Lb. pentosus/plantarum/paraplantarum* fue la especie más numerosa en este estudio, representando un total del 32,4% de todas las especies, seguida de *Lb. curvatus* que



representaba un 25% del total. Otras especies minoritarias fueron *Lb. casei/paracasei/rhamnosus* (7,5%), *Lb. brevis* (4%), *Lb. fermentum* (3,6%) y *Lb. coryniformis* subsp. *coryniformis* (1,5%) del género *Lactobacillus*, mientras que del género *Pediococcus* se identificaron las especies *P. acidilactici* (4,7%) y *P. pentosaceus* (3,3%).

El género *Enterococcus* representa el 8,8% de todas las especies identificadas. Dentro de este género encontramos las siguientes especies: *E. hirae* (6,7%), *E. faecalis* (0,9%), *E. faecium* (0,7%), *E. casseliflavus* (0,4%) y *E. mundtii* (0,1%).

El género *Weissella* representa el 6,4% del total, con dos especies identificadas: *W. confusa* (5,8%) y *W. paramesenteroides* (0,6%); mientras el género *Leuconostoc* tiene un papel menos importante, representando el 1,8% del total con tres especies identificadas: *L. citreum* (1,3%), *L. mesenteroides* (0,4%) y *L. pseudomesenteroides* (0,1%).

Por último, el género *Lactococcus* representa el 0,6% con sólo una especie identificada en las muestras de leche de tanque y de aire de la nave de ordeño, *Lc. lactis*; mientras que el género *Streptococcus* con un 0,4% está representado por dos especies *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (0,3%) y *S. infantarius* subsp. *infantarius* (0,1%), sólo identificadas en las muestras de leche.

La especie *Lb. pentosus/plantarum/paraplantarum* ha sido la más representativa en cuatro de las matrices analizadas, seguida de *Lb. curvatus*, que representan en conjunto más del 50% del total de especies presentes en cada matriz. Como excepción, *Lb. curvatus* es la especie predominante en las muestras de la superficie de pezones, superando en términos porcentuales a *Lb. pentosus/plantarum/paraplantarum*. Las demás especies han presentado una alta variabilidad en cuanto a porcentajes en las distintas muestras. La **Figura 9** muestra los porcentajes de las especies de cada uno de los géneros identificados para cada una de las matrices analizadas.



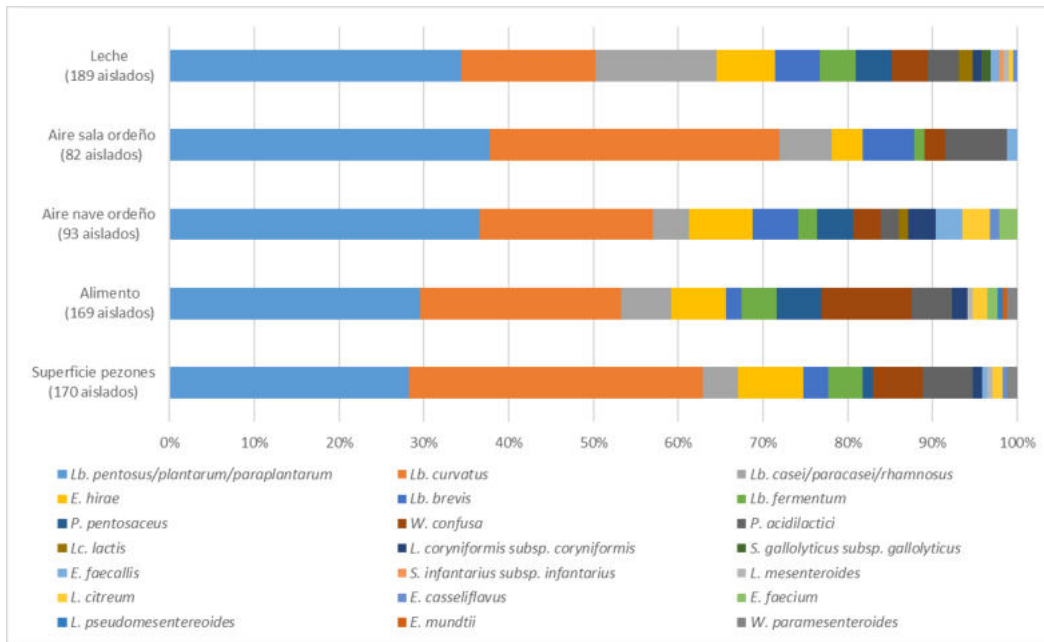


Figura 9. Porcentajes de cada especie presente para cada una de las matrices analizadas.

En el conjunto de muestras analizadas, se ha puesto de manifiesto la presencia de un total de 21 especies pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Weissella*, que son los géneros identificados de forma más frecuente en los productos lácteos, según el criterio taxonómico de Fox y cols. (2016). El género predominante en las ganaderías de ovino Manchego ha sido el género *Lactobacillus*, en concordancia con los resultados de estudios realizados en leche de tanque de otras especies (del Pozo y cols., 1988; Morais, 2004). Los géneros *Pediococcus*, *Weissella* y *Enterococcus* fueron importantes en los ambientes de la ganadería, siendo destacable la presencia de especies del género *Enterococcus* ya que son indicadoras de deficiencias higiénicas en el ordeño (Medina y cols., 2001). El bajo porcentaje del género *Leuconostoc* puede ser consecuencia de las exigencias nutricionales que presentan este tipo de bacterias para su crecimiento (Garvie, 1984). Para finalizar, sorprende el hecho de que los géneros *Lactococcus* y *Streptococcus* tengan una representación tan minoritaria, lo que podría estar condicionado con aspectos dependientes del cultivo.



De cada una de las especies identificadas se encontraron entre 1 y 46 aislados diferentes. A pesar de las limitaciones de los propios análisis RAPD-PCR para asignar aislados a los diferentes genotipos, es interesante mencionar que las agrupaciones (*clusters*) obtenidas en el análisis UPGMA de los patrones, asociaron aislados de diferentes matrices, con un alto porcentaje de similitud, lo que podría apoyar la idea de que existe una contaminación cruzada entre matrices. Por ello, la microbiología presente en las distintas dependencias o matrices de las ganaderías estudiadas (aire de la sala de ordeño, aire de la nave de las ovejas de ordeño, alimentación y superficie de los pezones de las ovejas) podría ser un foco de contaminación de la leche de tanque.

3.3.2. Estudio de biodiversidad de las BAL.

La biodiversidad de especies de BAL en cada ganadería, calculada como el índice de Simpson (D), se muestra en la **Tabla 9**, con valores que oscilaron entre 0,71 y 0,85.

La mayor variedad de especies se obtuvo en la ganadería G7 (0,852) con 12 especies identificadas, seguidas por las ganaderías G9 (0,829), G1 (0,827), G2 (0,819) y G12 (0,804) que presentaron entre 11 y 9 especies. Las otras explotaciones mostraron un buen índice D, que osciló entre 0,700 y 0,800, siendo G8 (0,778), G3 (0,775), G10 (0,759), G6 (0,748), G5 (0,729), G11 (0,728) y G4 (0,714), las que presentaron un menor número de especies identificadas. Sin embargo, el índice de diversidad más bajo, observado en las ganaderías G4, G11, y G5, puede ser debido a la existencia de una especie predominante particular de la ganadería: *Lb. curvatus* en el caso de la ganadería G4 y *Lb. pentosus/plantarum/paraplantarum* en las ganaderías G11 y G5.



Tabla 9. Índice de Simpson de biodiversidad de especies en cada ganadería y en cada una de las matrices: el valor va de 0 a 1, donde 1 representa diversidad infinita y 0 representa sin diversidad.

<u>Índice Simpson</u>	<u>Valor D</u>
<u>Ganadería</u>	
G1	0,827
G2	0,819
G3	0,775
G4	0,714
G5	0,729
G6	0,748
G7	0,852
G8	0,778
G9	0,829
G10	0,759
G11	0,728
G12	0,804
<u>Matrices</u>	
Leche	0,826
Aire sala ordeño	0,734
Aire nave ordeño	0,815
Alimento	0,834
Superficie pezones	0,787

Los valores D obtenidos para cada uno de los tipos de muestra se exponen también en la **Tabla 9**; el valor más alto correspondía al alimento de las ovejas de ordeño (0,834), seguido de la leche de tanque (0,826) y, por otra parte, el valor D más bajo fue el correspondiente al aire en la sala de ordeño, que a su vez se correspondía con la matriz menos contaminada (0,734).

El porcentaje de biodiversidad de las especies en las matrices estudiadas osciló entre 4 y 100% (**Figura 10**). Las especies con los valores más altos de biodiversidad fueron *S. infantarius* subsp. *infantarius*, *L. pseudomesentereoides* y *E. mundtii*; mientras que



aquellas que resultaron mayoritarias, como es el caso de *Lb. pentosus/plantarum/paraplantarum* y *Lb. curvatus* fueron las que presentaron los porcentajes más bajos (20% y 4% respectivamente) debido al hecho de que algunas cepas eran predominantes en la mayoría de las matrices analizadas. En general, aquellas especies con cinco o más aislados presentaron un porcentaje de biodiversidad en las matrices inferior al 50%.

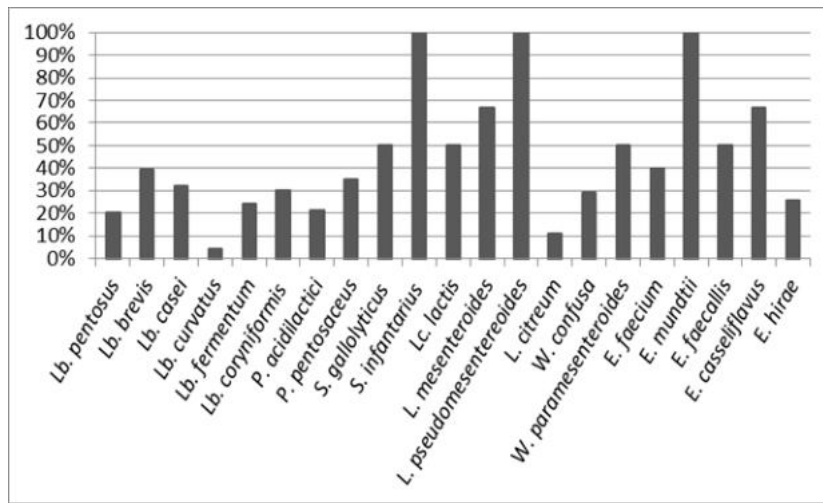


Figura 10. Diversidad genética de cada una de las especies identificadas en las muestras analizadas.

Así, el cálculo del Índice Simpson ha permitido evaluar la riqueza de las especies dominantes presentes en cada ganadería y en cada una de las muestras estudiadas. Los resultados han mostrado una amplia diversidad de especies BAL en el ambiente de las ganaderías de ovino lechero, aunque sólo 5 especies identificadas representan más del 70% de todas las detectadas. Sin embargo, se observa que existe una pérdida de biodiversidad cuando una especie es predominante en las muestras analizadas, lo que puede ser debido a distintos factores, como las condiciones climáticas durante el muestreo, ambientes con condiciones desfavorables para algunas especies de BAL, etc. En contraste, en las muestras de leche y de alimento se observó una alta variedad de especies, lo que puede ser debido a que son ambientes ricos en nutrientes, favorecido por



el transporte natural a través tanto del aire como de los animales, que actúan como vehículo para la dispersión de las BAL.

A pesar de que el 57% de las cepas identificadas pertenecían a las especies *Lb. pentosus/plantarum/paraplantarum* y *Lb. curvatus*, su variabilidad genética resultó ser bastante pobre debido a la presencia de un genotipo predominante que parece presentar una mayor capacidad de dispersión y resistencia. El mismo comportamiento se observó para *Lb. casei/paracasei/rhamnosus*, *E. hirae* y *W. confusa*, con la presencia de una cepa dominante en todas las matrices estudiadas. Estas especies parecen ser habituales en el ambiente de las ganaderías de ovino lechero, ya que tanto *Lb. pentosus/plantarum/paraplantarum* como *Lb. casei/paracasei/rhamnosus* han sido descritas en leche de ovino (Patil y cols., 2019) y también han sido también identificadas en quesos elaborados con leche de oveja, siendo la predominancia de *Lb. pentosus/plantarum/paraplantarum* determinante de las características de los quesos artesanales, debido a su alta actividad proteolítica y lipolítica (Medina y cols., 2001). *Lb. pentosus/plantarum/paraplantarum* y *Lb. casei/paracasei/rhamnosus* son especies con capacidad de producción de ácido linoleico conjugado (CLA) y *Lb. brevis* de ácido gamma-aminobutírico (GABA), propiedades que les confieren interés como cultivos iniciadores en la elaboración de quesos (Renes y cols., 2017). *Lb. curvatus*, *E. hirae* y *W. confusa* han sido también identificadas en diversos estudios de quesos elaborados con leche de oveja (Čanžek y cols., 2007; Mortazavi y cols., 2007).

Además, cabe destacar que se ha encontrado una coincidencia de genotipos tanto en las matrices analizadas como en las diferentes ganaderías estudiadas, lo que demuestra la capacidad de dispersión de estas cepas predominantes, vinculadas al área geográfica estudiada. Un uso extensivo de RAPD-PCR con más de un cebador, en investigaciones futuras, podría ayudar a rastrear con más detalle las rutas de contaminación de la



población de BAL en el ambiente de las ganaderías. Finalmente, algunas especies identificadas en este trabajo como *E. faecalis*, *Lc. lactis*, *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* y *S. infantarius* subsp. *infantarius* también fueron identificadas en la leche de tanque por otros autores usando el método de identificación 16S rDNA (De Garnica y cols., 2014), lo que fortalece estos resultados, ya que la utilización de diferentes técnicas moleculares ofrece una mayor fiabilidad a la caracterización de estas bacterias de gran interés tecnológico, que deben ser de gran ayuda para determinar la tipología de la flora láctica y su influencia en las características organolépticas de los productos lácteos, particularmente de los quesos tradicionales característicos de cada zona de producción.

3.3.3. Factores relacionados con la concentración de BAL en leche de tanque.

Las principales características de las ganaderías en relación al estudio y a los recuentos de BAL se muestran en la **Tabla 10**.

Seis variables categóricas se asociaron significativamente con la concentración de BAL en leche ($p < 0,05$): orientación de la sala de ordeño ($p=0,026$), frecuencia de limpieza de la sala de ordeño ($p=0,001$), tipo de línea de la sala de ordeño ($p < 0,001$), frecuencia de uso de ácido en la limpieza de la máquina de ordeño ($p < 0,001$), uso de ensilado en la alimentación de las ovejas de ordeño ($p=0,041$) y dispensación de alimento (grano) durante el ordeño ($p=0,030$). La orientación E-O de la sala de ordeño, la limpieza de la sala de ordeño después de cada ordeño, el tipo de línea baja de la máquina de ordeño y el uso diario de ácido en la limpieza de la máquina de ordeño tienden a aumentar la concentración de BAL en la leche, mientras que la dispensación de alimento (grano) durante el ordeño y el uso de ensilado en la alimentación tiende a disminuir la concentración de BAL en la leche. La asociación bivariada de BAL-L con BAL-Ali y BAL-P se exploró utilizando el coeficiente de correlación de Pearson, estando BAL-P positivamente, aunque de forma débil, correlacionada con BAL-L ($r=0,417$, $p=0,003$).



Resultados y Discusión

Tabla 10. Distribución de frecuencias de los factores categóricos considerados, y la asociación bivariada (ANOVA o *t*-Student) entre estos factores y la concentración de BAL en leche (\log_{10} UFC/ml).

Variable	Niveles	n (%)	\log_{10} BAL-L (Media \pm EE)	<i>p</i> Valor
BAL-A1	No	30 (62,5)	4,14 \pm 0,12	0,431
	Sí	18 (37,5)	4,31 \pm 0,16	
BAL-A2	No	28 (58,3)	4,24 \pm 0,14	0,735
	Sí	20 (41,7)	4,17 \pm 0,14	
BAL-Ali	No	0 (0,0)	-	
	Sí	48 (100,0)	4,21 \pm 0,67	
BAL-P	No	0 (0,0)	-	
	Sí	48 (100,0)	4,21 \pm 0,67	
Estación	Primavera	12 (25,0)	4,47 \pm 0,22	0,394
	Verano	12 (25,0)	4,22 \pm 0,20	
	Otoño	12 (25,0)	4,01 \pm 0,16	
	Invierno	12 (25,0)	4,14 \pm 0,19	
HigSO	Adecuada	35 (72,9)	4,27 \pm 0,12	0,380
	No	13 (27,1)	4,07 \pm 0,16	
HigNO	Adecuada	35 (72,9)	4,23 \pm 0,12	0,787
	No	13 (27,1)	4,17 \pm 0,17	
OriSO	N-S	24 (50,0)	4,16 \pm 0,12	0,026
	E-O	8 (16,7)	4,79 \pm 0,36	
	NE-SO	8 (16,7)	3,83 \pm 0,06	
	NO-SE	8 (16,7)	4,18 \pm 0,19	
OriNO	N-S	12 (25,0)	4,13 \pm 0,19	0,127
	E-O	16 (33,3)	4,54 \pm 0,20	
	NE-SO	8 (16,7)	3,83 \pm 0,06	
	NO-SE	8 (16,7)	4,17 \pm 0,19	
	Otro	4 (8,3)	3,99 \pm 0,30	
VentNO	Alta	24 (50,0)	4,29 \pm 0,15	0,414
	Baja	24 (50,0)	4,13 \pm 0,12	
LimpSO	Después cada ordeño	25 (50,0)	4,03 \pm 0,11	0,001
	Diario	12 (25,0)	4,79 \pm 0,22	
	Menos frecuente	12 (25,0)	3,98 \pm 0,15	
Filtro	Después cada ordeño	20 (41,7)	4,37 \pm 0,18	0,365
	Diario	24 (50,0)	4,11 \pm 0,11	
	Cada dos días	4 (8,3)	4,04 \pm 0,10	
Línea	Alta	32 (66,7)	3,99 \pm 0,09	<0,001
	Baja	16 (33,3)	4,65 \pm 0,18	
Contacto suelo	Sí	24 (50,0)	4,18 \pm 0,16	0,711
	No	24 (50,0)	4,25 \pm 0,10	
Ácido	Diario	8 (16,7)	5,06 \pm 0,27	<0,001
	Cada dos-tres días	36 (75,0)	4,06 \pm 0,09	
	Menos frecuente	4 (8,3)	3,88 \pm 0,08	
Ensilado	Sí	16 (33,3)	4,49 \pm 0,21	0,041
	No	32 (66,7)	4,07 \pm 0,09	
Grano	Sí	24 (50,0)	4,42 \pm 0,16	0,030
	No	24 (50,0)	4,00 \pm 0,08	

BAL-L: recuento de BAL en leche de tanque; BAL-A1: presencia de BAL en el aire de la sala de ordeño; BAL-A2: presencia de BAL en el aire de la nave de las ovejas de ordeño; BAL-Ali: presencia de BAL en el alimento; BAL-P: presencia de BAL en la superficie de los pezones; Estación: estación del año; HigSO: higiene de la sala de ordeño; HigNO: higiene de la nave de las ovejas de ordeño; OriSO: orientación de la sala de ordeño; OriNO: orientación de la nave de ordeño; VentNO: ventilación de la nave de las ovejas de ordeño; LimpSO: frecuencia de limpieza de la sala de ordeño; Filtro: frecuencia de cambio del filtro de ordeño; Línea: Tipo de línea de ordeño; Contacto suelo: contacto frecuente de las pezoneras con el suelo; Ácido: frecuencia del uso de ácido en la limpieza de la máquina de ordeño; Ensilado: uso de ensilado en la alimentación de las ovejas de ordeño; Grano: dispensación de alimento durante el ordeño.



Los dos factores que se asociaron significativamente se incluyeron en el mejor modelo para la concentración de BAL en leche de ovino Manchego (**Tabla 11**). Estos factores fueron el tipo de línea de ordeño ($p=0,001$) y la frecuencia de uso de ácido para la limpieza de la máquina de ordeño ($p <0,001$). La concentración de microbiota láctica en la leche aumenta significativamente con la línea baja de la máquina de ordeño y el uso diario de ácido en la limpieza de la máquina de ordeño.

Tabla 11. Medias de mínimos cuadrados de los recuentos de BAL en la leche de tanque (\log_{10} UFC/ml) de las granjas de ovejas lecheras de raza Manchega para los factores incluidos en el modelo mixto de mejor ajuste.

Factores	Media	Error Estándar	F Valor	p Valor
<u>Línea</u>			11,76	0,001
Alta	4,18 ^b	0,11		
Baja	4,73 ^a	0,15		
<u>Ácido</u>			10,68	<0,001
Diario	5,06 ^a	0,18		
Cada 2–3 días	4,15 ^b	0,09		
Menos frecuente	4,15 ^b	0,26		

El coeficiente de determinación ajustado y el error porcentual absoluto promedio alcanzaron valores de 47,4% y 0,39, respectivamente. Además, el factor de inflación de la varianza (FIV) de los coeficientes de regresión fluctuó entre 1,01 y 1,37, por lo que no existe un problema de multicolinealidad.

El modelo estadístico empleado demostró que los factores que influían en la presencia de BAL en la leche de tanque de las ganaderías de ovino lechero fueron el tipo de línea de la sala de ordeño y la frecuencia de uso de ácido en la limpieza de la máquina de ordeño, exactamente los mismos factores obtenidos al aplicar el modelo CATPCA previamente. Por tanto, las conclusiones son comunes para este modelo: la propia configuración de la línea baja en cuanto a la disposición de los tubos de leche más cerca de un ambiente más contaminado como es el suelo, particularmente en ganaderías con un mantenimiento deficiente en la máquina de ordeño y que puedan tener alterados los valores del sistema de vacío, podría condicionar el aumento de BAL en leche de tanque



en ganaderías con línea baja. Por otra parte, el uso diario de ácido en la rutina de limpieza de la máquina de ordeño incentiva la presencia de BAL en la leche de tanque, lo que se podría relacionar con una mayor resistencia de estos microorganismos a estas condiciones particulares de limpieza de las conducciones de la máquina de ordeño.

3.4. Biodiversidad de levaduras en ganaderías de ovino manchego.

(Este apartado se corresponde con el Artículo 3 del Anexo 4)

3.4.1. Genotipado e identificación de aislados de levaduras.

La caracterización y dispersión de comunidades de levaduras en ganaderías de oveja Manchega se realizó del mismo modo que en el caso de las BAL, mediante el uso de técnicas de RAPD-PCR y MALDI-TOF, y analizando parámetros de biodiversidad. Este estudio no sólo proporciona nueva información sobre la contaminación por levaduras en las ganaderías de ovino lechero, ante la falta de estudios previos, sino que también establece una relación entre las diferentes matrices y de factores propios de las ganaderías estudiadas.

En general, el aire en la sala de ordeño y el aire de la nave de la sala de ordeño estaba menos contaminado que en el resto de matrices (**Tabla 5**). Esto es debido a que el aire es un vehículo importante de difusión, pero también es un entorno hostil como hábitat para este tipo de microorganismos debido al estrés que sufren por la falta de nutrientes y por la deshidratación.

En el caso de las levaduras, se obtuvieron un total de 633 aislados de todas las muestras analizadas. Con una reproducibilidad >86% entre patrones de RAPD-PCR para el mismo aislado, obtenido a partir de un estudio de reproducibilidad realizado previamente, se identificaron 88 aislados representativos de todas las muestras mediante MALDI-TOF. Con una probabilidad de identificación >99%, estos aislados



representativos pertenecían a 11 especies del género *Candida*, el cual estaba presente en todas las matrices muestreadas. Sólo en un caso se obtuvo un aislado de diferente género, identificado como *Rhodotorula mucilaginosa*, procedente de la superficie de los pezones. Es probable que no haya sido posible detectar otras especies de levadura debido a los bajos recuentos y/o a los sesgos propios de las técnicas moleculares como la RAPD-PCR.

La especie predominante fue *C. parapsilosis*, con un porcentaje del 57%. Esta especie se identificó en todas las muestras analizadas, encontrándose los mismos genotipos en todas las matrices. También fueron importantes las especies *C. famata*, *C. krusei* y *C. guilliermondii*, con porcentajes de 13%, 12% y 6%, respectivamente, y se encontraron los mismos genotipos en leche de tanque, alimentación de las ovejas de ordeño y superficie de los pezones. A pesar de encontrarse en un porcentaje menor que las otras especies, *C. kefyri* (3%) relaciono el ambiente de la sala de ordeño, de la nave de las ovejas de ordeño y la alimentación animal, debido a que se encontraron los mismos genotipos tanto en aire de sala como de la nave de ordeño, así como en el alimento. Las especies identificadas y las relaciones obtenidas entre las matrices se presentan en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Presencia (+) o ausencia (-) de las diferentes cepas de levaduras identificadas en las matrices.

Especies	Leche	Aire sala ordeño	Aire nave ordeño	Alimento	Superficie pezones
<i>Candida inconspicua</i>	+	+	-	-	-
<i>Candida krusei</i>	+	-	-	+	+
<i>Candida guilliermondii</i>	+	-	-	+	+
<i>Candida parapsilosis</i>	+	+	+	+	+
<i>Candida lambica</i>	-	-	-	+	-
<i>Candida holmii</i>	-	-	-	+	-
<i>Candida famata</i>	+	-	+	+	+
<i>Candida catenulata</i>	+	-	-	-	+
<i>Candida rugosa</i>	-	-	-	+	-
<i>Candida zeylanoides</i>	-	-	-	-	+
<i>Candida kefyri</i>	-	+	+	+	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-	-	-	+

La mayoría de las cepas de levaduras identificadas en la leche de tanque también se identificaron en el alimento y en la superficie del pezón, lo que sugiere un vínculo entre



el alimento, la higiene del pezón y la leche. Además, *C. catenulata* reafirmó que existe una conexión entre la leche y la superficie del pezón, una relación que ya fue demostrada por Vissers y cols. (2007b), quienes además llegaron a la conclusión de que una correcta gestión de la explotación ganadera podría reducir la transmisión de contaminación de microorganismos vía suciedad de pezones hacia la leche de tanque. Mientras, *C. inconspicua* expuso una relación entre la leche y el aire en la sala de ordeño. Finalmente, las otras especies sólo se identificaron en una matriz: *C. lambica*, *C. holmii* y *C. rugosa* en el alimento de las ovejas de ordeño, y *C. zeylanoides* y *Rh. mucilaginosa* en la superficie de los pezones, como se indica en la **Tabla 12**.

El género *Candida* es uno de los más resistentes que se pueden encontrar en cualquier ambiente, y es comúnmente identificado en ambientes de explotaciones ganaderas, asociándose tanto al microbioma animal (tejidos mucosos, tracto gastrointestinal, etc.) como al de los productos lácteos (Cabañes, 2010; Delavenne y cols., 2011). Este género está presente en una amplia variedad de quesos artesanales (Wanderley y cols., 2013), siendo dominante en algunos como la Torta del Casar (Sahelices, 2018). En esta investigación, *C. parapsilosis* no sólo fue la principal especie identificada, sino que también se asoció con todas las matrices estudiadas. *C. parapsilosis* había sido una especie relacionada previamente con productos lácteos y con animales de abasto, por lo que su presencia en los ambientes de este estudio no ha sido sorprendente (Delavenne y cols., 2011; Buehler y cols., 2017). Con respecto a las otras especies de *Candida* identificadas en las distintas matrices, estas levaduras (generalmente patógenos oportunistas) han sido previamente reportadas en la leche cruda de diferentes especies, pudiendo llegar a ser muy prevalentes en infecciones intramamarias (Buzzini y Vaughan-Martini, 2006; Dworecka-Kaszak y cols., 2012). Estudios recientes han investigado casos de mamitis en ovejas (Knuth, 2019) donde *Candida* es el género principal involucrado en



mamitis fúngica de pequeños rumiantes (Machado, 2018). Por otra parte, estas especies también están relacionadas con los procesos de fermentación de los productos lácteos o el de maduración de los quesos (Buzzini y Vaughan-Martini, 2006; Atanassova y cols., 2016). Como ya se ha comentado anteriormente, *Rh. mucilaginosa* fue la única especie identificada en el estudio que no pertenecía al género *Candida*, habiéndose demostrado en otros estudios su relación con la leche de oveja (Delavenne y cols., 2011).

3.4.2. Estudio de biodiversidad de levaduras.

La biodiversidad de cada ganadería se evaluó mediante el cálculo del Índice Simpson (D, con valores entre 0 y 1) (**Figura 11**). El valor D osciló entre 0,5 y 1 para ocho de las doce ganaderías estudiadas, mientras que las otras cuatro ganaderías estuvieron por debajo del 0,5 en este valor D.

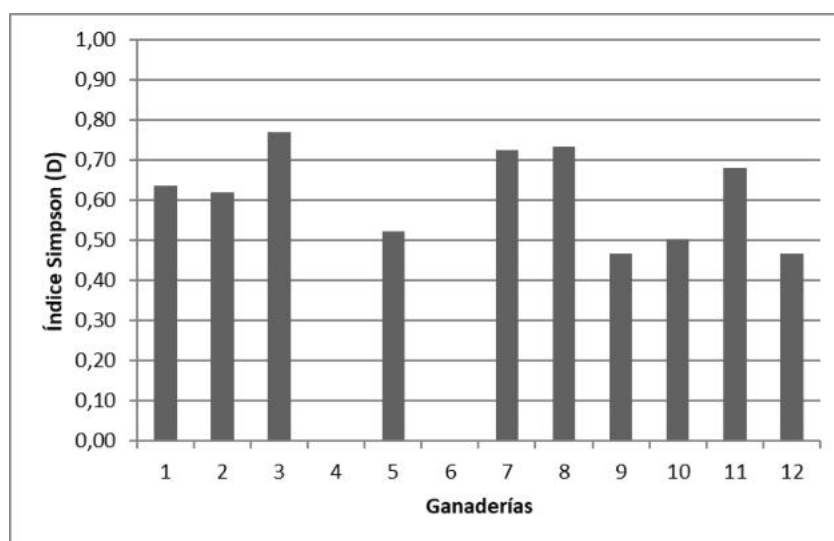


Figura 11. Índice Simpson (D) de biodiversidad para las especies de levaduras de cada ganadería. El valor oscila entre 0 y 1, siendo 1 diversidad infinita y 0 nula diversidad.

La mayor variedad de especies se encontró en la ganadería 3 (0,769), con siete especies identificadas, seguida de las ganaderías 8 (0,733) y 7 (0,725), que presentaron siete y cuatro especies, respectivamente. Las otras ganaderías que presentaron un alto índice D, que osciló entre 0,500 y 0,700, fueron la 11 (0,682), 1 (0,636) y 2 (0,621),



aunque con un menor número de especies identificadas. Sin embargo, se observó que dos de las ganaderías presentaban nula diversidad debido a la existencia de una especie predominante, es decir, en las granjas 6 y 4 sólo se aisló *Candida parapsilosis* en todas las matrices.

En cuanto a la variedad de especies en cada matriz estudiada (**Figura 12**), el índice D fue superior a 0,500 en todas ellas. La matriz que presentó mayor valor fue la suciedad cercana a la superficie de los pezones (0,719), seguida del alimento de las ovejas de ordeño (0,679). En contraste, el aire en la nave de las ovejas de ordeño mostró el índice D más bajo (0,524). Dado que la transmisión de especies es más fácil entre muestras del mismo entorno, se encontraron mejores resultados de biodiversidad en las matrices estudiadas que en las ganaderías.

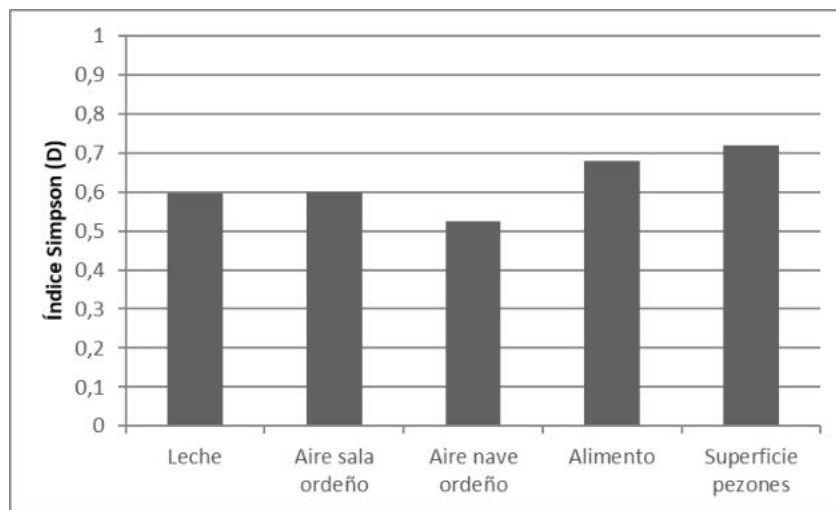


Figura 12. Índice Simpson (D) de biodiversidad para las especies de levaduras presentes en cada matriz.

Por otro lado, se realizó un análisis de diversidad genética calculando el porcentaje de biodiversidad de cada especie. Los resultados se describen en la **Figura 13**, con valores que oscilan entre 0% y 100%.



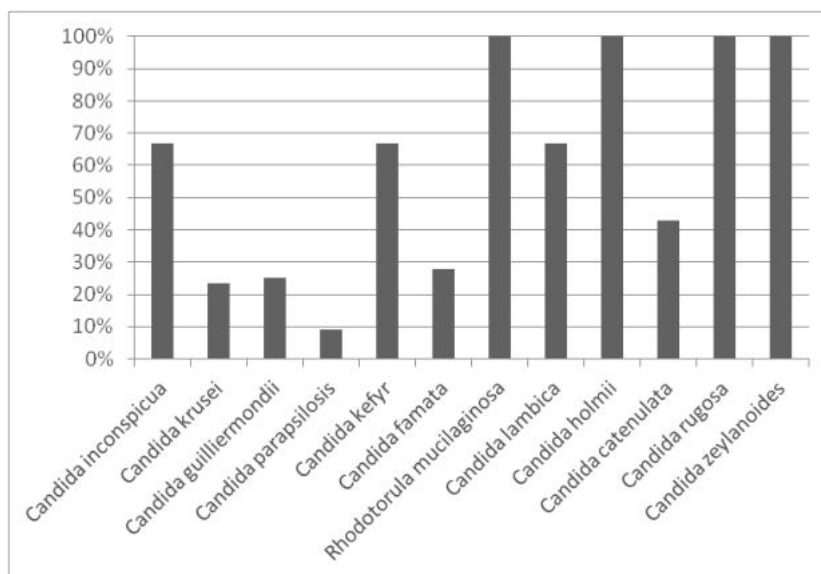


Figura 13. Diversidad genética de cada especie de levadura aislada en los ambientes de ganaderías de ovino Manchego.

La máxima biodiversidad genética se obtuvo en las especies *C. holmii*, *C. rugosa*, *C. zeylanoides* y *Rh. mucilaginosa*. Por el contrario, la especie que presentó mayor número de aislados (*C. parapsilosis*) también mostró la menor diversidad genética (9%) debido a la existencia de una cepa predominante en la mayoría de las muestras analizadas. En general, aquellas especies con cinco o más aislados tuvieron un porcentaje de biodiversidad inferior al 50%.

El Índice de Simpson permitió evaluar la riqueza de especies en cada ganadería y en cada matriz estudiada. Los resultados indican que hay una pérdida de diversidad cuando existe una especie predominante. Esto podría deberse al hecho de que algunos ambientes pueden ser desfavorables para algunas especies de levaduras, pero también a que las condiciones climáticas durante el muestreo pueden afectar la riqueza de especies (Yurkov y cols., 2016). Por el contrario, las matrices de las ganaderías estudiadas resultaron ser ambientes ricos en levaduras no sólo por el alto contenido de nutrientes presentes en ciertas muestras (leche y alimento) que favorecen su presencia, sino también porque las otras matrices son un vehículo natural para la dispersión de este microorganismo (aire,



animales, etc.). A pesar de que *C. parapsilosis* fue la especie más identificada, su variabilidad genética resultó ser muy baja debido a la presencia de un genotipo predominante que parece presentar la mejor capacidad de dispersión y resistencia. El mismo comportamiento se observó en *C. krusei*, *C. guillermondii*, *C. famata* y *C. catenulata*, donde también se identificó una cepa predominante en diferentes matrices. Sin embargo, se han identificado genotipos comunes de algunas especies de levaduras tanto en las diferentes matrices analizadas como en diferentes ganaderías estudiadas, lo que hace pensar en la capacidad de dispersión que poseen estas cepas, ligadas a la zona geográfica estudiada. Como se mencionó anteriormente, estas especies se asocian comúnmente con el microbioma de los animales de las ganaderías, por lo que la transferencia desde los pezones a la leche puede ocurrir fácilmente. Además, la presencia de cepas comunes en diferentes ganaderías puede explicarse por el hecho de que estas cepas también han sido identificadas en el aire, el cual es un vector de transmisión de levaduras y puede estar involucrado en su dispersión (Buzzini y cols., 2017).

3.4.3. Factores relacionados con la concentración de levaduras en leche.

Las principales características de las ganaderías en relación al estudio de la presencia de Lev en las matrices, de factores ambientales y de las características de las ganaderías recogidas en la encuesta se detallan en la **Tabla 13**.

Los factores incluidos en el análisis bivariado se presentan en la **Figura 14**. Nueve variables (marcadas en negro en la **Figura 14**) se asociaron con la concentración de levaduras en leche con un valor de $P < 0,20$ y, por lo tanto, fueron variables candidatas para su inclusión en el modelo mixto.



Tabla 13. Distribución de frecuencias de los factores categóricos considerados.

Variable	Niveles	Frecuencia (%)
Lev-A1	Sí	44 (91,7)
	No	4 (8,3)
Lev-A2	Sí	44 (91,7)
	No	4 (8,3)
Lev-Ali	Sí	31 (64,6)
	No	17 (35,4)
Lev-P	Sí	3 (6,3)
	No	45 (93,7)
Estación	Primavera	12 (25,0)
	Verano	12 (25,0)
	Otoño	12 (25,0)
	Invierno	12 (25,0)
HigSO	Adecuado	35 (72,9)
	No	13 (27,1)
HigNO	Adecuado	35 (72,9)
	No	13 (27,1)
OriSO	N-S	24 (50,0)
	E-O	8 (16,7)
	NE-SO	8 (16,7)
	NO-SE	8 (16,7)
OriNO	N-S	12 (25,0)
	E-O	16 (33,3)
	NE-SO	8 (16,7)
	NO-SE	8 (16,7)
	Otro	4 (8,3)
VentNO	Adecuado	24 (50,0)
	No	24 (50,0)
LimpSO	Después cada ordeño	25 (50,0)
	Diario	12 (25,0)
	Menos frecuente	12 (25,0)
Filtro	Después cada ordeño	20 (41,7)
	Diario	24 (50,0)
	Cada dos días	4 (8,3)
Línea	Alta	32 (66,7)
	Baja	16 (33,3)
Contacto suelo	Sí	24 (50,0)
	No	24 (50,0)
Ácido	Diario	8 (16,7)
	Cada 2-3 días	36 (75,0)
	Menos frecuente	4 (8,3)
Ensilado	Sí	16 (33,3)
	No	32 (66,7)
Grano	Sí	24 (50,0)
	No	24 (50,0)

Lev-A1: presencia de levaduras en el aire de la sala de ordeño; Lev-A2: presencia de levaduras en el aire de la nave de las ovejas de ordeño; Lev-Ali: presencia de levaduras en el alimento; Lev-P: presencia de levaduras en la superficie de los pezones; Estación: estación del año; HigSO: higiene de la sala de ordeño; HigNO: higiene de la nave de las ovejas de ordeño; OriSO: orientación de la sala de ordeño; OriNO: orientación de la nave de ordeño; VentNO: ventilación de la nave de las ovejas de ordeño; LimpSO: frecuencia de limpieza de la sala de ordeño; Filtro: frecuencia de cambio del filtro de ordeño; Línea: Tipo de línea de ordeño; Contacto suelo: contacto frecuente de las pezoneras con el suelo; Ácido: frecuencia del uso de ácido en la limpieza de la máquina de ordeño; Ensilado: uso de ensilado en la alimentación de las ovejas de ordeño; Grano: dispensación de alimento durante el ordeño.



Cuatro de ellas se asociaron significativamente con Lev-L en el análisis bivariado ($p < 0,05$): el tipo de línea de ordeño ($p=0,045$), la frecuencia de limpieza de la sala de ordeño ($p=0,016$), el uso de ensilado en la alimentación de las ovejas de ordeño ($p=0,035$) y la dispensación de alimento durante el ordeño (grano) ($p=0,018$). Así, la dispensación de alimento durante el ordeño, el uso de ensilado para la alimentación, la configuración de la sala de ordeño en línea baja y una frecuente limpieza de la sala de ordeño tienden a aumentar la concentración de levaduras en la leche.

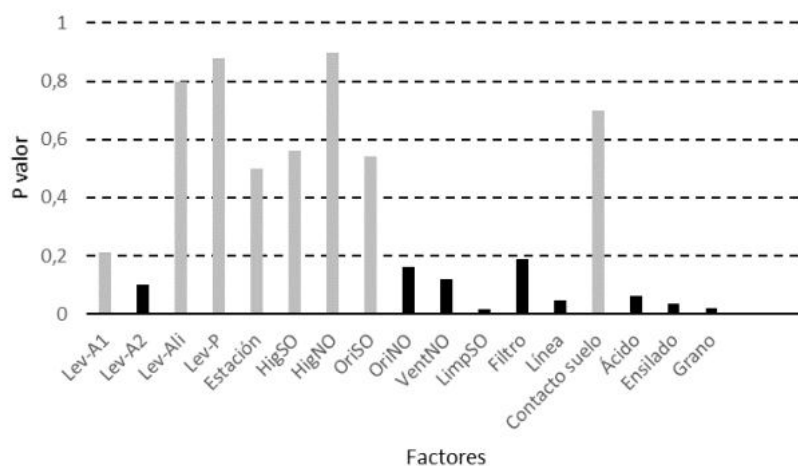


Figura 14. Asociación bivariada (ANOVA o prueba t de Student) entre la concentración de levaduras en la leche (\log_{10} UFC/ml) y los factores considerados. Lev-A1: presencia de levaduras en el aire de la sala de ordeño; Lev-A2: presencia de levaduras en el aire de la nave de las ovejas de ordeño; Lev-Ali: presencia de levaduras en el alimento; Lev-P: presencia de levaduras en la superficie de los pezones; Estación: estación del año; HigSO: higiene de la sala de ordeño; HigNO: higiene de la nave de las ovejas de ordeño; OriSO: orientación de la sala de ordeño; OriNO: orientación de la nave de ordeño; VentNO: ventilación de la nave de las ovejas de ordeño; LimpSO: frecuencia de limpieza de la sala de ordeño; Filtro: frecuencia de cambio del filtro de ordeño; Línea: Tipo de línea de ordeño; Contacto suelo: contacto frecuente de las pezoneras con el suelo; Ácido: frecuencia del uso de ácido en la limpieza de la máquina de ordeño; Ensilado: uso de ensilado en la alimentación de las ovejas de ordeño; Grano: dispensación de alimento durante el ordeño.

En la **Tabla 14** se muestran los resultados obtenidos por el modelo con mejor ajuste para la concentración de levaduras en leche de tanques de ganaderías de oveja Manchega. El coeficiente de determinación ajustado y el error porcentual absoluto promedio alcanzaron valores de 40,0% y 0,94, respectivamente. Además, el factor de inflación de



la varianza (FIV) de los coeficientes de regresión fluctuó entre 1,03 y 1,33, por lo que no existe un problema de multicolinealidad.

Tabla 14. Factores asociados con la concentración de levaduras en la leche de tanque (\log_{10} UFC/ml) de granjas de ovino lechero de raza Manchega utilizando un modelo mixto.

Variable	Coefficiente	DE	F valor	P valor	FIV
Levaduras en nave de ordeño (Lev-A2)	-	-	8,63	0,005	1,06
No	-0,94	0,32			
Sí	0,94	0,32			
Ensilado	-	-	13,30	<0,001	1,33
No	-0,77	0,21			
Sí	0,77	0,21			
Ácido	-	-	5,90	0,005	1,03
Diario	1,19	0,35			
Cada 2-3 días	0,17	0,31			
Menos frecuente	-1,36	0,33			

DE: Desviación Estándar; FIV: Factor de Inflación de la Varianza.

En este modelo con mejor ajuste se asociaron tres factores: la presencia de levaduras en el aire de la nave de las ovejas de ordeño ($p=0,005$), la frecuencia de uso de ácido para la limpieza de la máquina de ordeño ($p=0,005$) y el uso de ensilado ($p <0,001$). La concentración de levaduras en la leche de tanque aumenta significativamente con una mayor frecuencia de uso de ácido para la limpieza de la máquina de ordeño, el uso de ensilado en la alimentación y la presencia de levaduras en el aire de la nave de las ovejas de ordeño (**Figura 15**).

Mediante la aplicación de este modelo estadístico sólo coincide el uso de ensilado como factor común al compararlo con el modelo CATPCA aplicado previamente. Esto es debido a que en este modelo CATPCA, en vez de usar la concentración de microorganismos como variable dependiente, se usa el sistema de dimensiones, es decir, las posibles rutas de contaminación entre el ambiente de las ganaderías.



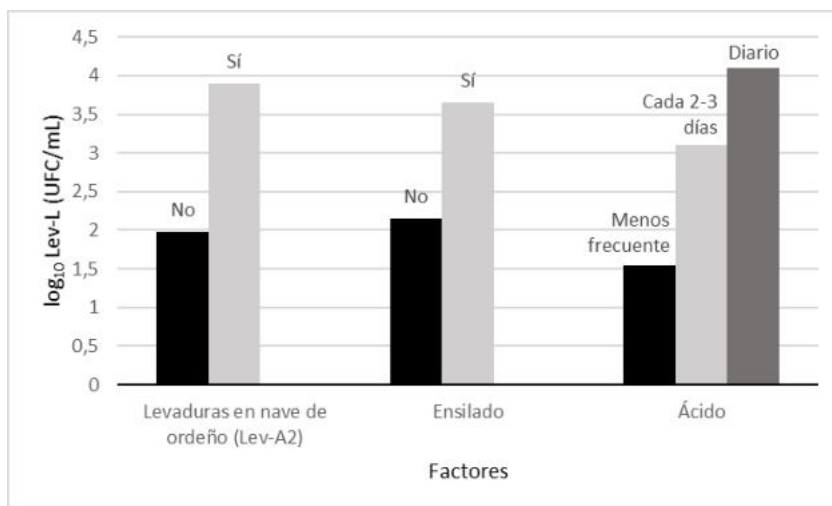


Figura 15. Medias de mínimos cuadrados de la concentración de levaduras en la leche de tanque (\log_{10} UFC/ml) de las ganaderías de oveja Manchega para los factores incluidos en el modelo mixto con mejor ajuste. Las medias con diferentes colores dentro de los factores varían (Student–Newman–Keuls, SNK $p < 0,05$).

Como ya se ha explicado, el uso de ensilado en la alimentación de las ovejas de ordeño puede aumentar la concentración de levaduras, lo que podría explicarse por un deterioro del ensilado debido a una mala conservación, que promueve la actividad de levaduras, siendo un riesgo de contaminación de la leche de tanque, de forma similar a lo que ocurre en la contaminación por esporas butíricas (Arias y cols., 2013). De manera similar, en esta investigación se han identificado cepas de diferentes especies de levaduras (*C. parapsilosis* y *C. famata*) tanto en el aire de la nave de las ovejas de ordeño como en la leche de tanque, lo que refuerza la idea de que puede existir una vía de transmisión de levaduras entre el ambiente y la leche de tanque.

Además, el efecto del uso de ácido diariamente en la limpieza de las conducciones de la sala de ordeño, que también ha sido estudiado en por Gonzalo y cols. (2019), puede ser el causante del deterioro de diversos elementos de la máquina de ordeño facilitando la contaminación microbiana por levaduras, como también se ha comentado para las BAL. Por ello, es necesario establecer un código de buenas prácticas en la ganadería, especialmente para la limpieza de la sala de ordeño, con el fin de establecer un equilibrio



entre especies indeseables y aquellas que aportan un valor añadido sobre la tecnología quesera.

3.5. Discusión final.

La mejora de la calidad de la leche de oveja es uno de los principales objetivos del sector. El sector del ovino lechero, tradicionalmente muy importante en la cuenca mediterránea, continúa evolucionando en la actualidad para aunar los requerimientos de los nuevos sistemas productivos con mejora de la calidad sus quesos y productos lácteos, salvaguardando sus especiales peculiaridades. En particular, la oveja Manchega, raza autóctona de aptitud láctea de mayor censo en España, y materia prima de la figura de calidad diferenciada “Queso Manchego”, mantiene como objetivo principal de su programa de cría el aumento de producción lechera, con la premisa de sustentar la calidad de la leche. Las ganaderías de raza Manchega en la actualidad están experimentado una importante transformación hacia la especialización en la producción lechera, con un incremento en el tamaño censal y una optimización de su sistema productivo en áreas tan importantes como la reproducción, la sanidad o la alimentación. La investigación en estos aspectos es fundamental para la mejora de la raza, siendo uno de los principales objetivos la evaluación de la calidad de la leche de sus ganaderías, en este marco de incremento de la producción de leche y cambios en el sistema productivo de la raza.

La calidad microbiológica de la leche de oveja ha sido estudiada previamente desde distintos aspectos sanitarios y tecnológicos. Igualmente, los sistemas de calidad de la leche que el sector tiene implantados para el cumplimiento de los requisitos legales y de la industria, incluyen límites de indicadores de calidad higiénica o sanitaria, como los recuentos de gérmenes totales (RMT) o de células somáticas de la leche de tanque (RCS) (Pirisi y cols., 2007); sin embargo, estos indicadores son poco específicos para diferenciar



la flora microbiana de la leche (Jayarao y cols., 2004), y su importancia tecnológica. Estudios anteriores en raza Manchega (Arias, 2013; Jiménez, 2019) se han ocupado de evaluar la calidad de leche de tanque y los factores productivos inherentes a la ganadería que influyen en su variación. Como continuidad a estos estudios, y ante la escasa bibliografía sobre la flora microbiana en el ambiente de las ganaderías de ovejas, se ha planteado esta Tesis Doctoral, con el fin de aportar conocimientos sobre la microbiología ambiental de las ganaderías, sobre los factores que pueden influir en su variación, y su influencia en la flora microbiana de la leche de tanque de las ganaderías de raza Manchega.

Los resultados que se han expuestos en los apartados anteriores indican que existe una diversidad microbiana en las diferentes matrices estudiadas (aire de la sala de ordeño, aire del alojamiento de las ovejas de ordeño, alimentación de las ovejas de ordeño y superficie de los pezones) que tiene su repercusión en la leche de tanque. Este hecho es importante, porque pone de manifiesto que existe una interacción entre la flora microbiana de las distintas matrices, siendo de destacar la que se ha observado entre el aire de la nave y el de la sala de ordeño, o entre las distintas matrices y la superficie de los pezones, como vía directa de transmisión microbiana a través de las pezoneras a la leche de tanque. Especial importancia cobra esta vía directa de transmisión, a la vista de los relevantes recuentos obtenidos en superficie de pezones y en leche de tanque, para estafilococos, microorganismos esporulados y bacterias ácido-lácticas.

Diversos aspectos sobre las características ambientales de las ganaderías y su repercusión en la calidad del aire han sido tratados por diversos autores (temperatura, humedad, ventilación, etc.) (Sevi y cols., 2003a; Albenzio y cols., 2005), aunque no se habían abordado estudios en ganaderías de oveja Manchega, cuyo ámbito geográfico es una meseta de clima continental. Del mismo modo, la influencia de factores ligados al



sistema de producción y de manejo de la ganadería respecto a la calidad del aire apenas han sido estudiados en ovino lechero, de ahí el interés de este estudio por aportar conocimiento sobre estos aspectos. Los resultados en cuanto a la carga microbiana del aire de la sala de ordeño y del alojamiento de las ovejas de ordeño muestran variaciones de los grupos microbianos analizados en relación con determinados factores de la ganadería, siendo relevantes la influencia de la temperatura, humedad o ventilación sobre BAL, Lev, Mo y St. Son interesantes varios factores de influencia, como la estación del año y el uso de ensilado sobre el recuento de Lev, la ventilación o la temperatura sobre Mo o la higiene de la nave de ordeño y el nivel de producción lechera sobre el nivel de St. Cabe destacar que la alimentación es una de las matrices estudiadas con mayores recuentos de los diferentes grupos microbianos. La contaminación de la superficie de pezones reviste una especial importancia, como antes se ha comentado, por el buen número de factores con los que se relaciona, prácticamente para la totalidad de grupos microbianos estudiados, siendo de especial relevancia los factores relacionados con el ambiente (temperatura, humedad, ventilación), así como con la carga ganadera y nivel de producción, las condiciones de manejo e higiénicas de la nave de las ovejas de ordeño y de la sala de ordeño (contacto de pezoneras con el suelo, cambio de filtro de ordeño, dispensación de alimento en la sala de ordeño) y la utilización de ensilado en la alimentación animal.

Los factores relacionados con la variación de los diversos grupos microbianos en la leche de tanque son especialmente importantes para estimar los riesgos directos de los factores considerados en el estudio y de las vías de transmisión. Los factores relacionados con el ambiente también están relacionados con la contaminación de la leche de tanque, como el aumento de temperatura de la sala de ordeño sobre el RMT y St, o como la elevada ventilación de la nave de ordeño sobre este último grupo. Los factores de la propia



ganadería también han sido identificados. El manejo del ordeño cobra especial relevancia en la línea de las observaciones de otros estudios en ovino lechero (Gonzalo y cols., 2019) habiéndose relacionado el tipo de línea baja de la sala de ordeño con un aumento del RMT o BAL en leche de tanque, la dispensación de alimento durante el ordeño con el incremento de RMT, la utilización diaria del ácido en la limpieza de la sala de ordeño con los niveles de BAL, el contacto de las pezoneras con el suelo con el incremento de LEV y St, la mayor periodicidad del cambio de filtro con el aumento de microorganismos esporulados EA y BAB, o una inadecuada higiene de la sala de ordeño con el nivel de Mo en la leche de tanque. Por último, son también de gran interés factores ligados con la alimentación, como que el uso de ensilado condicione un aumento de EA y BAB, o con el nivel de infecciones intramamarias, como el efecto de un mayor porcentaje de mamitis clínicas sobre el RMT, en la línea de otros estudios realizados en leche de oveja Manchega (Arias y cols., 2013; Jiménez y cols., 2018).

Con lo anteriormente expuesto, se ha comprobado la relación de muchos factores sobre la gran variedad de flora microbiana de la ganadería, siendo una relación compleja que establece el equilibrio entre los distintos grupos microbianos. Por ello, las modificaciones en el sistema de manejo de las ganaderías pueden tener repercusiones directas sobre su ecosistema microbiano, y tienen especial trascendencia en la toma de decisiones sobre la adopción de medidas de control sobre los gérmenes indeseables o los microorganismos de interés tecnológico propios de una ganadería o de un ámbito geográfico. En esta línea, diversos investigadores aconsejan una visión de las prácticas de actuación sobre estos factores, no de forma individualizada, sino de forma combinada, dada la complejidad de la comunidad microbiana de una ganadería (Tormo y Monsallier, 2011).



El interés por la caracterización de los microorganismos de interés tecnológico ha sido tratado desde hace décadas (Alvarado y Albo, 1928; Barroso, 1934), con el objetivo de salvaguardar las características diferenciales de los productos lácteos de una determinada área de producción como la de la raza Manchega. En nuestro estudio, por este interés, se han caracterizado las BAL y Lev de las distintas matrices que se han comentado anteriormente.

La caracterización molecular de BAL indica la existencia de una amplia diversidad de géneros y especies en las distintas matrices (aire de la nave de las ovejas ordeño y de la sala de ordeño, alimentación, superficie de pezones y leche de tanque), con excepción de los géneros *Streptococcus* y *Lactococcus* que sólo se encuentran en leche y en aire. Es muy relevante que *Lactobacillus* sea el género predominante, como ocurre en otras especies de ovino lechero (del Pozo y cols., 1988; Morais, 2004), aunque se han identificado otros géneros de BAL. En cualquier caso, la caracterización genética a nivel de cepa indica que cualquiera de las matrices estudiadas puede ser una fuente de contaminación de BAL para la leche de tanque. Es interesante constatar que existe una biodiversidad variable de BAL entre las matrices estudiadas y entre las especies identificadas, existiendo una mayor diversidad en leche de tanque y alimento de las ovejas de ordeño, y una menor diversidad en el aire de la sala de ordeño que también es la matriz menos contaminada, junto al aire de la nave de ordeño, lo que vuelve a indicar el papel importante de la transmisión a leche vía pezones de estos gérmenes. Las especies mayoritarias como *Lb. pentosus/plantarum/paraplantarum* y *Lb. curvatus* son las que presentaron una menor variabilidad genética debido a la presencia de un genotipo predominante que parece presentar una mayor capacidad de dispersión y persistencia. Sobre estos convendría continuar los estudios, en particular respecto a sus propiedades, lipolíticas, proteolíticas, acidificantes, bioconservadoras frente a patógenos, de



producción de compuestos bioactivos, etc., dado el interés tecnológico de las cepas autóctonas de esta zona geográfica de producción.

Por su parte, las Lev han sido caracterizadas en todas las matrices estudiadas, aunque como se ha mencionado, su presencia en el aire de la nave de las ovejas de ordeño y de la sala de ordeño es muy bajo, dado que estos microorganismos son muy lábiles en este ambiente hostil, lo que contrasta con su elevado recuento en el alimento de las ovejas de ordeño. Prácticamente la totalidad de las levaduras estudiadas pertenecen al género *Candida*, con una especie predominante *C. parapsilopsis*, observando la misma identidad genética en todas las matrices. Se ha constatado la biodiversidad de Lev en las distintas ganaderías, salvo en aquellas en las que *C. parapsilopsis* es mayoritaria, y matrices, especialmente en alimento y superficie de pezones, lo que indica su interés como fuente de contaminación de la leche de tanque, a la vista también de sus recuentos. La predominancia en este estudio del género *Candida*, del que diversos estudios han descrito su mayor capacidad de resistencia en el medio ambiente y en quesos que otras Lev (Cabañes, 2010; Delavenne y cols., 2011), y también de la capacidad de dispersión y resistencia de la cepa predominante *C. parapsilopsis* (Delavenne y cols., 2011; Buehler y cols., 2017), recomiendan que sea interesante la realización de estudios futuros para la determinación de sus posibles propiedades tecnológicas en la producción de queso.

Para completar el estudio, dado el interés de determinar los factores asociados a la contaminación de la leche de tanque, se ha establecido la relación entre estos factores de forma individual con la presencia de BAL o Lev. Así, se ha relacionado el tipo de línea baja de la sala de ordeño con un incremento de BAL en la leche de tanque, la presencia de levaduras en la nave de las ovejas de ordeño y la utilización del ensilado en la ración con el aumento de Lev en leche, y el uso diario de ácido en la limpieza de la sala de ordeño sobre el incremento de ambos tipos de microorganismos, BAL y Lev. La



identificación de estos factores reafirma la complejidad en la determinación de estrategias de control de microorganismos, ya que muchos de estos son deseables desde el punto de vista tecnológico y enriquecen la flora microbiana, y los indeseables es conveniente minimizarlos para este fin. Por ello, la continuidad de las investigaciones para determinar el comportamiento de las especies y cepas mayoritarias es imprescindible en la toma de decisiones sobre las pautas a seguir en el manejo de las ganaderías de ovino lechero, para optimizar su calidad bacteriológica, siempre desde la premisa que el principal objetivo de la producción de leche en esta ganadería debe ser la mejora de su calidad para la elaboración de queso y otros productos lácteos.

Habiéndose constatado las diferentes relaciones entre los microorganismos y matrices estudiadas, que revela las complicadas interrelaciones entre el dinámico ecosistema microbiano de una ganadería, y los factores relacionados con su variación, sería conveniente la consideración de medidas o prácticas encaminadas a mejorar la calidad microbiológica de la leche. Como se ha comentado, investigadores como Tormo y Monsallier (2011) indican que estas prácticas no deben ser consideradas de forma individual sino de forma combinada, y que deben ser contrastadas y evaluadas para cada ganadería, con el fin de salvaguardar el equilibrio entre las comunidades microbianas de la ganadería, evitando los riesgos de contaminación de la leche de tanque con gérmenes indeseables desde el punto de vista sanitario o tecnológico. Así, a continuación, se plantea una relación de buenas prácticas ganaderas o de puntos de especial atención inspiradas en los resultados de nuestra investigación:

- El alojamiento de las ovejas de ordeño debería guardar las debidas condiciones higiénicas en cuanto al estado de camas (limpias y con renovación frecuente), y demás enseres, evitando en lo posible la generación de aerosoles en la manipulación de camas y dispensación de alimento para evitar la contaminación del aire. Asimismo, la



temperatura, humedad y ventilación de la nave de las ovejas de ordeño debería ser evaluada por técnicos competentes, para precisar los rangos óptimos de trabajo, que deberían ser vigilados en la ganadería.

- El alimento de las ovejas de ordeño debería ser adquirido, cultivado y conservado, con las debidas garantías para evitar contaminación microbiana. Especial atención debería prestarse a la elaboración y conservación de los ensilados, por el riesgo de vehicular contaminación microbiana indeseable, sobre todo microorganismos esporulados.
- El manejo del ordeño es un punto crítico de relevancia en el riesgo de contaminación de la leche de tanque. Por ello, es necesario una especial atención a los siguientes aspectos:
 - La sala de ordeño, al igual que la nave de las ovejas de ordeño, debería guardar las debidas condiciones de temperatura ambiental para evitar el riesgo de proliferación de gérmenes, cuyos rangos deberían ser fijados por los técnicos y vigilados por el ganadero.
 - La sala de ordeño deberá guardar las debidas condiciones higiénicas en cuanto a limpieza, especialmente de heces y otros elementos groseros, que se realizará con la periodicidad necesaria para evitar su acúmulo, evitando la generación de polvo.
 - Debería evitarse la dispensación de alimento en la sala en el momento del ordeño para evitar la diseminación de polvo que puede vehicular carga microbiana.
 - El momento del ordeño es crucial, debiendo poner el ganadero especial atención en el estado de suciedad de las ubres, que pueden transmitir contaminación directamente a través de las pezoneras a la leche de tanque,



tomando las medidas necesarias de limpieza y secado de camas, ante la extrema dificultad de aplicar medidas de limpieza de ubres y pezones previas al ordeño, como se realiza habitualmente en vacuno lechero.

- Debería evitarse en lo posible la caída de pezoneras, porque pueden promover la contaminación a la leche de tanque, poniendo especial atención a los nuevos lotes de animales en ordeño o de animales jóvenes, disponiendo para las labores de ordeño del suficiente personal debidamente entrenado para esta práctica, y revisando periódicamente las condiciones de funcionamiento de la maquinaria de ordeño.
- Es fundamental el cambio de filtro de ordeño para evitar la contaminación de la leche en función de la cantidad de animales en ordeño, incluso, realizando cambios en un mismo ordeño.
- La rutina de limpieza de la sala de ordeño deberá ser contrastada con los técnicos especializados para utilizar un sistema de lavado adecuado, con la debida alternancia de detergentes ácidos y básicos, en función del tipo de sala, e incluso de las temperaturas ambientales de cada estación del año, para optimizar las temperaturas de lavado de la sala de ordeño.

En definitiva, una serie de medidas en puntos de especial atención del manejo de la ganadería, que deberían validarse en el marco de un sistema de evaluación de los riesgos de contaminación de la leche de tanque de cada ganadería, mediante sistemas de vigilancia analítica tanto de la leche como de otras fuentes de microorganismos, incluidas las ambientales.



CONCLUSIONES

4. CONCLUSIONES

1. Las ganaderías de oveja Manchega presentan una amplia diversidad microbiana que varía en cada una de las matrices analizadas: aire de nave de las ovejas de ordeño, sala de ordeño, alimentación de las ovejas de ordeño, superficie de pezones y leche de tanque, aunque es el alimento la matriz con los mayores recuentos de los microorganismos estudiados (recuento de mesófilos totales, bacterias ácido-lácticas, levaduras, mohos, estafilococos, microorganismos formadores de esporas aerobias y esporas butíricas), y la superficie de pezones la matriz con un papel más relevante en la transmisión de los microorganismos a la leche de tanque.
2. Los factores ambientales (temperatura, humedad, ventilación) están relacionados con la variación de diversos microorganismos en las ganaderías de ovino lechero, en particular sobre bacterias ácido-lácticas, levaduras, mohos y estafilococos del aire del alojamiento de las ovejas de ordeño y de la nave de ordeño. Igualmente, también condicionan la variación de los grupos microbianos determinados factores de manejo propios de la ganadería relacionados con la carga ganadera, el nivel de producción, sus condiciones higiénicas, el manejo del ordeño, o el uso de ensilado en la alimentación animal.
3. La amplia diversidad de géneros y especies caracterizadas de bacterias ácido-lácticas en las matrices analizadas, pone de manifiesto la riqueza de esta flora de las ganaderías. Sin embargo, las especies mayoritarias son *Lactobacillus pentosus/plantarum/paraplantarum* y *Lactobacillus curvatus*, con la presencia de un genotipo predominante que parece presentar una mayor capacidad de dispersión y persistencia. También se ha constatado diferente grado de diversidad genética en función de la matriz analizada, siendo mayor en leche de tanque y alimento de las ovejas de ordeño y menor en el aire de la sala de ordeño. Además, se ha encontrado



Conclusiones

una relación entre la presencia de bacterias ácido-lácticas y ciertas características de la ganadería, como el tipo de línea de sala de ordeño y la periodicidad de uso de detergentes ácidos en la limpieza de la maquinaria de ordeño.

4. La caracterización de las levaduras ha permitido constatar que existen genotipos comunes en las diferentes matrices (leche, aire de la nave de las ovejas de ordeño y de la sala de ordeño, alimentación y superficie de los pezones), aunque su presencia de aire de nave de las ovejas de ordeño y de la sala de ordeño es muy bajo. *C. parapsilopsis* es la especie predominante en este estudio, especialmente en alimento y superficie de pezones, lo que indica su implicación en la contaminación de la leche de tanque. Además, se ha establecido una relación entre la presencia de levaduras en leche de tanque y ciertas características de la ganadería, como la periodicidad de uso de detergentes ácidos en la limpieza de la maquinaria de ordeño y el uso de ensilado en la alimentación de las ovejas de ordeño, así como la presencia de levaduras en el aire de la nave de las ovejas de ordeño incentivan su presencia en leche.
5. La presencia de los distintos grupos microbianos en la ganadería y los factores ambientales y de manejo de la propia ganadería condicionan la calidad de la leche de tanque de oveja. Los sistemas de control de calidad de la leche deberían estimar estos aspectos, instaurando un programa de buenas prácticas en cada ganadería, en base a los riesgos determinados en este estudio, respecto a la higiene de los alojamientos y sala de ordeño, manejo de la alimentación y del ordeño de las ovejas; así como un sistema de vigilancia analítica de los grupos microbianos en las principales fuentes de contaminación de la leche, incluidas las ambientales. La continuidad de los estudios en esta línea de investigación, en particular respecto a las bacterias ácido-lácticas y levaduras caracterizadas, contribuirán al mejor conocimiento de sus propiedades diferenciales en la elaboración de quesos y otros productos lácteos.



5. CONCLUSIONS

1. Manchega sheep farms have a wide microbial diversity that varies in each of the matrices analysed: the air in the livestock housing and milking parlour, animal feed, teat surface, and bulk tank milk. Animal feed is the matrix with the highest counts of microorganisms studied: total bacterial count, lactic acid bacteria, yeasts, moulds, staphylococci, aerobic and butyric spore-forming microorganisms, and the teat surface is the matrix with the leading role in the transmission of microorganisms to bulk tank milk.
2. The environmental factors (temperature, humidity, ventilation) are related to the variation of some microorganisms in dairy sheep farms, in particular the effect of the air in the livestock housing and milking parlour on lactic acid bacteria, yeasts, moulds, and staphylococci. Likewise, some microbial groups' variation is also conditioned by certain management factors related to farm density, the level of milk production, hygienic conditions, milking management, or the use of silage in animal feed.
3. The wide diversity of genera and species characterized by lactic acid bacteria in the matrices analysed shows this flora's richness in sheep farms. However, *Lactobacillus pentosus/plantarum/paraplantarum* and *Lactobacillus curvatus* species are the vast majority, with the presence of a predominant genotype that appears to have a greater capacity for dispersion and persistence. A different degree of genetic diversity has also been observed in relation to the matrix analysed, being higher in bulk tank milk and animal feed and lower in the air of milking parlour. Also, a relationship has been found between the presence of lactic acid bacteria and some characteristics of the farm, such as the milkline and the frequency of using acid detergents in the cleaning of milking parlours.



Conclusions

4. The characterization of yeasts has shown that there are common genotypes in the different matrices (milk, the air of livestock housing and milking parlour, animal feed and teat surface), although its presence in the air of the livestock housing and milking parlour is very low. *C. parapsilopsis* is the predominant specie in this study, especially in animal feed and teat surface, indicating its involvement in bulk tank milk contamination. Moreover, a relationship has been established between the presence of yeasts in bulk tank milk and certain characteristics of the farm, such as the frequency of the use of acid detergents in the cleaning of milking machinery and the use of silage in the feed of ewes, with the presence of yeast in the air of the livestock housing of ewes encouraging its presence in the milk.
5. The presence of different microbial groups in the livestock, and the environmental and management conditions of the farm influence the quality of sheep's bulk tank milk. Milk quality control systems should estimate these aspects, establishing quality assurance programmes on each farm based on the risks studied, regarding the milking parlour hygiene, livestock housing hygiene, feed management practices and milking management; as well as surveillance programs of microbial groups in the primary sources of milk contamination, including environmental ones. The continuity of studies in this research line, particularly concerning the lactic acid bacteria and yeasts characterised, will contribute to the better knowledge of their differential properties in making cheese and other dairy products.



BIBLIOGRAFÍA

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abson, D.J.; Dougill, A.J.; Stringer, L.C. Using principal component analysis for information-rich socio-ecological vulnerability mapping in Southern Africa. *Appl Geogr.* 2012, 35: 515–524.

Adhikari, A.; Sen, M.M.; Gupta-Bhattacharya, S.; Chanda, S. Volumetric assessment of airborne fungi in two sections of a rural indoor dairy cattle shed. *Environ. Int.* 2004, 29: 1071–1078.

Albenzio, M.; Taibi, L.; Muscio, A.; Sevi, A. Prevalence and etiology of subclinical mastitis in intensively managed flocks and related changes in the yield and quality of ewe milk. *Small Rumin. Res.* 2002, 43: 219–226.

Albenzio, M.; Santillo, A.; Caroprese, M.; Marino, R.; Centoducati, P.; Sevi, A. Effect of different ventilation regimens on ewes' milk and Canestrato Pugliese cheese quality in summer. *J. Dairy Res.* 2005, 72: 447–455.

Alin, A. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics. *Multicollinearity* 2010, 2: 370–374.

Alvarado y Albo, Ventura. *Industria de la Leche: quesos y mantecas*; Biblioteca Agrícola Española: Madrid, Spain, 1928.

Angón, E.; García, A.; Perea, J.; Acero, R.; Toro-Mujica, P.; Pacheco, H.; González, A. Technical efficiency and viability of grazing dairy cattle systems in La Pampa, Argentine. *Agrociencia* 2013, 47: 443–456.

Arias, C. Recuento y caracterización de *Clostridium* spp. en la ración unifeed y en la leche en relación con las condiciones higiénico-sanitarias y de manejo de las ganaderías de oveja Manchega. Tesis Doctoral, Universidad de Castilla-La Mancha, Spain, 2013.

Arias, C.; Oliete, B.; Seseña, S.; Jiménez, L.; Pérez-Guzmán, M.D.; Arias, R. Importance of on-farm management practices on lactate fermenting *Clostridium* spp. spore contamination of Manchega ewe milk: Determination of risk factors and characterization of *Clostridium* population. *Small Rumin. Res.* 2013, 111: 120–128.



Arias, C.; Oliete, B.; Seseña, S.; Jiménez, L.; Palop, Ll.; Pérez-Guzmán, M.D.; Arias, R. Importance of on-farm management practices on lactate-fermenting *Clostridium* spp. spore contamination of total mixed ration of Manchega ewe feeding. Determination of risk factors and characterization of *Clostridium* population. *Small Rumin. Res.* 2016, 139: 39–45.

Atanassova, M.; Fernández-Otero, C.; Rodríguez-Alonso, P.; Fernández-No, J.I.; Garabal, J.I.; Centeno, J.A. Characterization of yeasts isolated from artisanal short-ripened cows' cheeses produced in Galicia (NW Spain). *Food Microbiol.* 2016, 53: 172–181.

Banjara, N.; Suhr, M.J.; Hallen-Adams, H.E. Diversity of yeast and mold species from a variety of cheese types. *Curr. Microbiol.* 2015, 70: 798–800.

Baraton, Y. *La Contamination du lait par les spores butyriques*; Institut Technique de l'Elevage Bovin, Ed.; Le Point Sur, Paris, France, 1985; pp. 32.

Barroso, Gonzalo. *La industria quesera y mantequera española. Técnicas modernas*; Madrid (Viuda de M.Navarro): Madrid, Spain, 1934. pp. 235–252.

Bergonier, D.; De Crémoux, R.; Rupp, R.; Lagriffoul, G.; Berthelot, X. Mastitis of dairy small ruminants. *Vet. Res.* 2003, 34: 689–716.

Binetti, A.; Carrasco, M.; Reinheimer, J.; Suárez, V. Yeasts from autochthonal cheese starters: technological and functional properties. *J. Appl. Microbiol.* 2013, 115: 434–444.

Bouton, Y. L'environnement des animaux. En *Microflore du Lait cru. Vers Une Meilleure Connaissance des Écosystèmes Microbiens du Lait de Leurs Facteurs de Variation*; Laithier, C., Ed.; CNAOL-RMT Fromages de Terroirs: Lyon, France, 2011; pp. 101–107.

Bouton, Y.; Guyot, P.; Vacheyrou, M.; Normand, A.C.; Piarroux, R.; Beuvier, E. Etude des flux bactériens dans les étables de production laitière de Franche-Comté. Exemple des LHF. En *15ème colloque du Club des Bactéries Lactiques*, Rennes, France, 13–15 novembre, 2007.



Brandl, H.; Fricker-Feer, C.; Ziegler, D.; Mandal, J.; Stephan, R.; Lehner, A. Distribution and identification of culturable airborne microorganisms in a Swiss milk processing facility. *J. Dairy Sci.* 2014, 97: 240–246.

B.T.P.L. (Bureau Technique de Promotion Laitière). *Le logement du troupeau laitière*; Editions France Agricole, Paris, France, 2001; pp. 189.

Buehler, A.J.; Evanowski, R.L.; Martin, N.H.; Boor, K.J.; Wiedmann, M. Internal transcribed spacer (ITS) sequencing reveals considerable fungal diversity in dairy products. *J. Dairy Sci.* 2017, 100: 8814–8825.

Buehner, K.P.; Anand, S.; Garcia, A. Prevalence of thermophilic bacteria and spores on 10 Midwest dairy farms. *J. Dairy Sci.* 2014, 97: 6777–6784.

Buzzini, P. y Vaughan-Martini, A. Yeast Biodiversity and Biotechnology. En *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook*; Péter, G., Rosa, C. Eds.; Springer: Berlin, Germany, 2006; pp. 533–559.

Buzzini, P.; Lachance, M.A.; Yurkov, A. *Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology*; Springer: Heidelberg, Germany, 2017.

Cabañes, F.J. Yeast pathogens of domestic animals in Ashbee. En *Pathogenic Yeasts. The Yeast Handbook*; Ashbee, H.R.; Bignell, E.M. Eds.; Springer: Berlin, Germany, 2010; pp. 253–279.

Calamari, L.; Morera, P.; Bani, P.; Minuti, A.; Basiricò, L.; Vitali, A.; Bernabucci, U. Effect of hot season on blood parameters, fecal fermentative parameters, and occurrence of *Clostridium tyrobutyricum* spores in feces of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2018, 101: 4437–4447.

Callejo, A. Alojamiento para vacas lecheras. En *Alojamientos e Instalaciones (II)*; Buxadé, C., Ed.; Mundi-Prensa: Madrid, Spain, 1998; pp. 115–159.

Callejo, A. Ventilación de alojamientos de vacas de leche. Funciones y diseño. En *Frisona Española 197*; CONAFE: Madrid, Spain, 2013; pp. 106–116.



Camacho, A.; Giles, M.; Ortegón, A.; Palao, M.; Serrano, B.; Velázquez, O. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. En *Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos*. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México. 2009.

Camarotte A. Caracterización de cepas proteolíticas de bacterias psicrotrofas aisladas de leche cruda bovina refrigerada. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad de la Republica, Uruguay, 2013.

Cano-García, L.; Flores, M.; Belloch, C. Molecular characterization and aromatic potential of *Debaryomyces hansenii* strains isolated from naturally fermented sausages. *Food Res. Int.* 2013, 52(1): 42–49.

Carafa, I.; Clementi, F.; Tuohy, K.; Franciosi, E. Microbial evolution of Traditional Mountain cheese and characterization of early fermentation cocci for selection of autochthonous dairy starter strains. *Food Microbiol.* 2016, 53: 94–103.

Carlile, M.J. y Watkinson, S. *The Fungi*, 2ª ed.; Academic Press, San Diego, USA, 2001; pp. 70.

Caroprese, M. Sheep housing and welfare. *Small Rumin. Res.* 2008, 76: 21–25.

Carr, F.J.; Chill, D.; Maida, N. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.* 2002, 28(4): 281–370.

Casamassima, D.; Sevi, A.; Palazzo, M.; Ramacciato, R.; Colella, G.E.; Bellitti, A. Effects of two different housing systems on behaviour, physiology and milk yield of Comisana ewes. *Small Rumin. Res.* 2001, 41: 151–161.

Centi, V.; Matteucci, F.; Lepidi, A.; Del Gallo, M.; Ercole, C. Microbiological and biochemical aspects of inland Pecorino Abruzzese cheese. *Heliyon* 2017, 3, e00258.

Ceugniesz, A.; Drider, D.; Jacques, P.; Coucheney, F. Yeast diversity in a traditional French cheese “Tomme d’orchies” reveals infrequent and frequent species with associated benefits. *Food Microbiol.* 2015, 52: 177–184.

Christiansson, A.; Ekelund, K.; Ogura, H. Membrane filtration method for enumeration and isolation of spores of *Bacillus cereus* from milk. *Int. Dairy J.* 1997, 7: 743–748.



Colombari, G.; Allegretti, A.; Melani, D.; Bettoni, B.; Pecorari, M. Sviluppo di spore di clostridi nel terreno negli alimenti zootecnici, nelle feci e nel latte di allevamenti a diverso livello evolutivo in area Parmigiano-Reggiano. *Scienza e tecnica lattiero-casearia*, 2005, 56(5): 309–344.

Contreras, A.; Sierra, D.; Sánchez, A.; Corrales, J.C.; Marco, J.C.; Paape, M.J.; Gonzalo, C. Mastitis in small ruminants. *Small Rumin Res.* 2007, 68: 145–153.

Cosentino, S.; Mulargia, A.F.; Pisano, B.; Tuveri, P.; Palmas, F. Incidence and biochemical characteristics of *Bacillus* flora in Sardinian dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 1997, 38: 235–238.

Costerton, J.W.; Stewart, P.S.; Greenberg, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 1999, 284: 1318–1322.

Coussi, G. Butyriques et fermentation butyrique. *Dossiers Techniques Veterinaire*, 1988, Juillet: 75–96.

Cullor, J.S. Risks and prevention of contamination of dairy products. *Revue scientifique et technique. OIE*, 1997, 16: 472–481.

Curiel, G.J.; Van Eijk, H.M.J.; Lelieveld, H.L.M. Risk and control of airborne contamination. En *Encyclopedia of Food Microbiology*; Robinson, R.K.; Batt, C.A.; Patel, P.D., Eds.; Academic Press: London, UK, 2000; pp. 1816–1822.

Čanžek, M.A.; Mohar, L.P.; Rogelj, I. Characterization of the *Lactobacillus* community in traditional Karst ewe's cheese. *Int. J. Dairy Technol.* 2007, 60: 182–190.

De Garnica, M.L.; Santos, J.A.; Gonzalo, C. Influence of storage and preservation on microbiological quality of silo ovine milk. *J. Dairy Sci.* 2011, 94: 1922–1927.

De Garnica, M.L.; Linage, G.; Carriedo, J.A.; De La Fuente, L.F.; García-Jimeno, M.C.; Santos, J.A.; Gonzalo, G. Relationship among specific bacterial counts and total bacterial and somatic cell counts and factors influencing their variation in ovine bulk tank milk. *J. Dairy Sci.* 2013, 96: 1021–1029.



De Garnica, M.L.; Sáez-Nieto, J.; González, R.; Santos, J.A.; Gonzalo, C. Diversity of gram-positive catalase-negative cocci in sheep bulk tank milk by comparative 16S rDNA sequence analysis. *Int. Dairy J.* 2014, 34: 142–145.

de la Cruz, M.; Serrano, E.; Montoro, V.; Marco, J.; Romero, M.; Baselga, R.; Albizu, I.; Amorena, B. Etiology and prevalence of subclinical mastitis in the Manchega sheep at mid-late lactation. *Small Rumin. Res.* 1994, 14: 175–180.

Delavenne, E.; Mounier, J.; Asmani, K.; Jany, J.L.; Barbier, G.; Le Blay, G. Short communication: Fungal diversity in cow, goat and ewe milk. *Int. J. Food Microbiol.* 2011, 151: 247–251.

Delavenne, E.; Mounier, J.; Déniel, F.; Barbier, G.; Le Blay, G. Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period. *Int. J. Food Microbiol.* 2012, 155: 185–190.

del Pozo, B.F.; Gaya, P.; Medina, M.; Rodríguez-Marín, M.A.; Nuñez, M. Changes in the microflora of La Serena ewes' milk cheese during ripening. *J. Dairy Res.* 1988, 55: 449–455.

Donnelly, C.W. Factors associated with hygienic control and quality of cheeses prepared from raw-milk: A review. *Bull. Int. Dairy Fed.* 2001, 369: 16–27.

Driehuis, F.; Hoolwerf, J.; Rademaker, J.L.W. Concurrence of spores of *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium beijerinckii* and *Paenibacillus polymyxa* in silage, dairy cow faeces and raw milk. *Int. Dairy J.* 2016, 63: 70–77.

Dubie, T.; Sisay, T.; Gebru, M.; Muktar, Y. An Insight Review on the Role of Fungi in Mastitis of Dairy Animals and Its Economical Importance. *J. Vet. Sci. Photon.* 2015, 116: 440–445.

Dworecka-Kaszak, B.; Krutkiewicz, A.; Szopa, D.; Kleczkowski, M.; Biegańska, M. High Prevalence of *Candida* yeast in milk samples from cows suffering from mastitis in Poland. *Sci. World J.* 2012, 2012: 1–5.

ESROM. Memoria del Esquema de Selección de la Raza Ovina Manchega. 2018. Disponible online: <http://www.agrama.org/> (consultado el 19 julio 2019).



Esteban, O.J. Identificación y control de peligros microbiológicos que afectan a la calidad en la elaboración de queso. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, 2018.

Esteban-Blanco, C.; Gutiérrez-Gil, B.; Puente-Sánchez, F.; Marina, H.; Tamames, J.; Acedo, A.; Arranz, J.J. Microbiota characterization of sheep milk and its association with somatic cell count using 16s rRNA gene sequencing. *J. Anim. Breed Genet.* 2019, 137: 73–83.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United. 2019. Disponible online: <http://faostat.fao.org/beta/en/#home>. (consultado el 10 febrero 2020).

FEGA. Fondo Español de Garantía Agraria. 2019. Disponible online: <https://www.fega.es/>. (consultado el 11 enero 2020).

Fernández-Pacheco Rodríguez, P.; Arévalo-Villena, M.; Zapparoli Rosa, I.; Briones Pérez, A. Selection of potential non-*Sacharomyces* probiotic yeasts from food origin by a step-by-step approach. *Food Res. Int.* 2018, 112: 143–151.

Fischer, W.J.; Schilter, B.; Tritscher, A.M.; Stadler, R.H. Contaminants of Milk and Dairy Products: Contamination Resulting from Farm and Dairy Practices. *Ref. Modul. Food Sci.* 2015, 1: 1–13.

Fox, P.F.; Guinee, T.P.; Cogan, T.M.; McSweeney, P.L.H. *Fundamentals of Cheese Science*, 2nd ed.; Springer: New York, NY, USA, 2016.

Fundación de Consejo Regulador de la Denominación de Origen Queso Manchego. 2021 Disponible online: <http://www.quesomanchego.es/> (consultado el 16 febrero 2021).

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

Garvie, E. Separation of Species of the Genus *Leuconostoc* and Differentiation of the *Leuconostocs* from Other Lactic Acid Bacteria. En *Methods in Microbiology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1984; Volume 16, pp. 147–178.



Referencias Bibliográficas

Gaya, P.; Babín, M.; Medina, M.; Nuñez, M. Diversity among lactococci isolated from ewe's raw milk and cheese. *J. Appl. Microbiol.* 1999, 87: 849–855.

Gómez, M.J.; Gallego, R.; Hernández, G.; Tavera, J.M.; Pérez-Guzmán, M.D.; Montoro, V. Primeros resultados de la aplicación del Programa de Control de Mamitis Subclínicas en ovino de raza Manchega. En *libro de actas de las VII Jornadas sobre Producción Animal ITEA*, Zaragoza, Spain, 1997; 18(2): 567–569.

Gonzalo, C.; Ariznabarreta, A.; Carriedo, J.A.; San Primitivo, F. Mammary pathogens and their relationship with somatic cell count and milk yield losses in dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 2002, 85: 1460–1467.

Gonzalo, C.; Carriedo, J.A.; Blanco, M.A.; Beneitez, E.; Juárez, M.T.; De La Fuente, L.F.; San Primitivo, F. Factors of variation influencing bulk tank somatic cell count in dairy sheep. *J. Dairy Sci.* 2005, 88: 969–974.

Gonzalo, C.; Carriedo, J.A.; Beneitez, E.; Juárez, M.T.; De La Fuente, L.F.; San Primitivo, F. Short Communication: Bulk Tank Total Bacterial Count in Dairy Sheep: Factors of Variation and Relationship with Somatic Cell Counts. *J. Dairy Sci.* 2006, 89: 549–552.

Gonzalo, C.; Juárez, M.T.; García-Jimeno, M.C.; De La Fuente, L.F. Bulk tank somatic cell count and total bacterial count are affected by target practices and milking machine features in dairy sheep flocks in Castilla y León region, Spain. *Small Rumin. Res.* 2019, 178: 22–29.

Gustafsson, G. Investigations of Factors Affecting Air Pollutants in Animal Houses. *Ann. Agric. Environ. Med.* 1997, 4: 203–215.

Herreros, M.A.; Fresno, J.M.; González-Prieto, M.J.; Tornadizo, M.E. Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese. *Int. Dairy J.* 2003, 13(6): 469–479.

ISO 4833:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of microorganisms-Colony-count technique at 30 degrees C.



ISO 11133:2014. Microbiology of food, animal feed and water - Preparation, production, storage and performance testing of culture media.

Iurlina, M.O.; Saiz, A.I.; Fuselli, S.R.; Fritz, R. Prevalence of *Bacillus* spp. in different food products collected in Argentina. *Food Sci. Technol.* 2006, 39: 105–110.

Jarvis, B. y Williams, A.P. Methods for detecting fungi in foods and beverages. En *Food and Beverage Mycology*. Beuchat, L.R., Ed.; Van Nostrand Reinhold, New York, 1987; pp. 599–636.

Jayarao, B.M.; Pillai, S.R.; Sawant, A.A.; Wolfgang, D.R.; Hegde, N.V. Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. *J. Dairy Sci.* 2004, 87: 3561–3573.

Jiménez, L. Evaluación de la Calidad Higiénico-Sanitaria y Tecnológica de la Leche de Raza Manchega Como Instrumento para la Mejora de la Viabilidad Socio-Económica y Ambiental de los Sistemas Productivos de Ovino Lechero. Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba, Spain, 2019.

Jiménez, L.; Oliete, B.; Pérez-Guzman, M.D.; Arias, R. Study of the differential microbiological quality of sheep milk relative to the standard plate counts. En *Technology creation and transfer in small ruminants: roles of research, development services and farmer associations*; Chentouf, M.; López-Francos A.; Bengoumi M.; Gabiña D., Eds.; CIHEAM/INRAM/FAO: Zaragoza, Spain, 2014; pp. 175–181.

Jiménez, L.; Oliete, B.; Pérez-Guzmán, M.D.; Arias, R. Influencia de la estación, tamaño de explotación y asociacionismo en el recuento de microorganismos en leche de tanque de oveja. En *Proceedings of the XVI Jornadas sobre Producción Animal AIDA*, Zaragoza, Spain, 19–21 May, 2015; pp. 585–587.

Jiménez, L.; Garzón-Sígler, A.; Pérez-Guzmán, M.D.; García-Martínez, A.; Arias-Sánchez, R. Calidad microbiológica diferencial de la leche de oveja procedente de tanque. *Universidad del Zulia. Revista Científica* 2018, 28(1): 11–18.

Jimeno, V. Diseño de alojamientos para vacas lecheras en estabulación libre. En *Curso Para Peritos Tasadores*; Agroseguro, S.A: Madrid, Spain, 2004.



Johnson, M. y Steele, J. Fermented dairy product. En: *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*; Doyle, M.P.; Buchanan, R.L., Eds.; ASM Press: Washington DC, EEUU, 2013; pp. 581–594.

Jørgensen, H.; Mørk, T.; Rørvik, L. The occurrence of *Staphylococcus aureus* on a farm with small-scale production of raw milk cheese. *J. Dairy Sci.* 2005, 88: 3810–3817.

Julien, M.C.; Dion, P.; Lafrenière, C.; Antoun, H.; Drouin, P. Sources of clostridia in raw milk on farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008, 74 (38): 6348–6357.

Kable, M.E.; Srisengfa, Y.; Laird, M.; Zaragoza, J.; McLeod, J.; Heidenreich, J.; Marco, M.L. The core and seasonal microbiota of raw bovine milk in tanker trucks and the impact of transfer to a milk processing facility. *mBio*, 2016, 7(4):e00836.

Knuth, R.M.; Stewart, W.C.; Taylor, J.B.; Yeoman, C.J.; Bisha, B.; Page, C.M.; Rowley, C.M.; Lindsey, B.C.; Van Emon, M.L.; Murphy, T.W. Subclinical mastitis in sheep: Etiology and association with milk somatic cell count and ewe productivity in three research flocks in the Western United States, *Transl. Anim. Sci.* 2019, 3: 1739–1743.

Kongo, J.M. Lactic acid bacteria as starter-cultures for cheese processing: Past, present and future developments. En *Lactic Acid Bacteria - R&D for Food, Health and Livestock purposes*; Kongo M., Ed.; InTechOpen: 2013; pp. 658.

Krukowski, H. y Saba, L. Bovine mycotic mastitis. *Folia Vet.* 2003, 47: 3–7.

Kure, C.F.; Skaar, I.; Brendehaug, J. Mould contamination in production of semi-hard cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 2004, 93: 41–49.

Laird, D.T.; Gambrel-Lenarz, A.; Scher, F.M.; Graham, T.E.; Reddy, R. Microbiological count methods. En *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*; Wehr, H.M.; Frank, J.F., Eds.; Animal Public Health Association: Washington DC, EEUU, 2004; pp. 153–186.

Lawrence, N.G. Beef cattle housing. En *Livestock Housing*; Wathes, C.M., Charles, D.R., Eds.; CAB International: Wallingford, UK, 1994; pp. 339–357.



Leitner, G.; Chaffer, M.; Shamay, A.; Shapiro, F.; Merin, U.; Ezra, E.; Saran, A.; Silakinove, N. Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in sheep. *J. Dairy Sci.* 2004, 87: 46–52.

López, C.E.; Ramos, L.L.; Ramadán, S.S.; Bulacio, L.C. Presence of aflatoxin M1 in milk for human consumption in Argentina. *Food Control* 2003, 14: 31–34.

Luigi, T.; Rojas, L.; Valbuena, Oscar. Evaluación de la calidad higiénico-sanitaria de leche cruda y pasteurizada expendida en el estado Carabobo, Venezuela. *Salus* 2013, 17: 25–33.

Machado, G.P. Mastitis in small ruminants. *Anim. Husb. Dairy Vet. Sci.* 2018, 2: 1–9.

Magnusson, M.; Christiansson, A.; Svensson, B. *Bacillus cereus* spores during housing of dairy cows: factors affecting contamination of raw milk. *J. Dairy Sci.* 2007, 90: 2745–2754.

Makovec, J.A. y Ruegg, P.L. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *J. Dairy Sci.* 2003, 86: 3466–3472.

MAPA. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 2019. Disponible online: <https://www.mapa.gob.es/es/> (consultado el 28 mayo 2019).

Marangoz, B.; Kahraman, S.; Bostan, K. *Bacillus* spp. Responsible for Spoilage of Dairy Products. *Int. J. Food Eng. Res.* 2018, 4(1): 43–46.

Marino, R.; Atzori, A.S.; D'Andrea, M.; Iovane, G.; Trabalza-Marinucci, M.; Rinaldi, L. Climate change: Production performance, health issues, greenhouse gas emissions and mitigation strategies in sheep and goat farming. *Small Rumin. Res.* 2016, 135: 50–59.

Marogna, M.; Rolesu, S.; Lollai, S.; Tola, S.; Leori, G. Clinical findings in sheep farms affected by recurrent bacterial mastitis. *Small Rumin. Res.* 2010, 88: 119–125.

Martin, N.H.; Kent, D.J.; Evanowski, R.L.; Zuber-Hrobuchak, T.J.; Wiedmann M. Bacterial spore levels in bulk tank raw milk are influenced by environmental and cow hygiene factors. *J Dairy Sci.* 2019, 102(11): 9689–9701.



McAuley, C.M.; McMillan, K.; Moore, S.C.; Fegan, N.; Fox, E.M. Prevalence and characterization of foodborne pathogens from Australian dairy farm environments. *J. Dairy Sci.* 2014, 97: 7402–7412.

McKinnon, C.H. y Pettipher, G.L. A survey of sources of heat-resistant bacteria in milk with particular reference to psychrotrophic spore-forming bacteria. *J. Dairy Res.* 1983, 50: 163–170.

Medina, R.; Katz, M.; Gonzalez, S.; Oliver, G. Characterization of the Lactic Acid Bacteria in Ewe's Milk and Cheese from Northwest Argentina. *J. Food Prot.* 2001, 64: 559–563.

Meulman, J.J. The integration of multidimensional scaling and multivariate analysis with optimal transformations. *Psychometrika*, 1992, 57(4): 539–565.

Meulman, J.J.; Van der Kooij, A.J.; Heiser, W.J. Principal components analysis with nonlinear optimal scaling transformations for ordinal and nominal data. En *Handbook of quantitative methodology for the social sciences*; Kaplan D., Ed.; Sage, London, 2004; pp. 49–70.

Michel, V.; Hauwuy, A.; Chamba, J.F. La flore microbienne de laits crus de vache: diversité et influence des conditions de production. *Lait*, 2001, 81: 575–592.

Moir, A. How do spores germinate? *J. Appl. Microbiol.* 2006, 101: 526–530.

Molina, L.; Angón, E.; García, A.; Caballero-Villalobos, J.; Giorgis, A.O.; Moralejo, R.H.; Perea, J. A retrospective epidemiological analysis of shared risk factors for bovine trichomoniasis and bovine genital campylobacteriosis in La Pampa province (Argentina). *Prev. Vet. Med.* 2018, 161: 109–114.

Montebello, K.; Spiteri, D.; Valdramidis, V.P. Identification and characterisation of aerobic spore-forming bacteria isolated from Maltese cows' milk. *Int. Dairy J.* 2018, 84: 54–61.

Montel, M.; Beuvier, E.; Hauwuy, A. Pratiques d'élevage, microflore du lait et qualités des produits laitiers. *Inra Prod. Anim.* 2003, 16: 279–282.



Montel, M.C.; Buchin, S.; Mallet, A.; Delbes-Paus, C.; Vuitton, D.A.; Desmasures, N.; Berthier, F. Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *Int. J. Food Microbiol.* 2014, 177: 136–154.

Morais, J. Estudio de Adecuación de Cepas Lácticas Autóctonas Aisladas de Leche Cruda de Oveja Guirra para la Elaboración de Queso. Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, 2004.

Morantes, M.; Dios-Palomares, R.; Peña, M.E.; Rivas, J.; Perea, J.; García, A. Management and productivity of dairy sheep production systems in Castilla-La Mancha, Spain. *Small Rumin. Res.* 2017, 149: 62–72.

Mortazavi, A.; Ghandi, A.; Barouei, J.; Moussavi, M. Diversity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Kurdish Ewes' Milk Cheese. *Aust. J. Dairy Technol.* 2007, 62: 185–190.

Núñez, N. y Callejo, A. Condiciones ambientales y bienestar. La ventilación. En *Frisona Española* 152; CONAFE: Madrid, Spain, 2006; pp. 84–91.

Ogawa, J.; Kishino, S.; Ando, A.; Sugimoto, S.; Mihara, K.; Shimizu, S. Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* 2005, 100: 355–364.

Ogunade, I.M.; Martínez-Tupia, C.; Queiroz, O.C.M.; Jiang, Y.; Drouin, P.; Wu, F.; Vyas, D.; Adesogan, A.T. Silage review: Mycotoxins in silage: Occurrence, effects, prevention, and mitigation. *J. Dairy Sci.* 2018, 101(5): 4034–4059.

Oliete, B.; Calatayud, M.; García, O.; Arias, C.; Gallego, R.; Arias, R.; Pérez-Guzmán, M.D. Efecto de las condiciones higiénico-sanitarias sobre el recuento de células somáticas y microorganismos totales de la leche de oveja Manchega. En *XXXV Congreso de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia*; SEOC: Valladolid, Spain, 2010; pp. 50–55.

Ortiz-Durán, E.; Pérez-Romero, R.; Orozco-Sanabria, C. Identificación de agentes micóticos en muestras de leche obtenidas de tanques de enfriamiento. *Ciencia y Agricultura*, 2017, 14(2): 99–106.



Padilla, B.; Belloch, C.; López-Díez, J.J.; Flores, M.; Manzanares, P. Potential impact of dairy yeasts on the typical flavour of traditional ewes' and goats' cheeses, *Int. Dairy J.* 2014a, 35(2):122–129.

Padilla, B.; Manzanares, P.; Belloch, C. Yeast species and genetic heterogeneity within *Debaryomyces hansenii* along the ripening process of traditional ewes' and goats' cheeses. *Food Microbiol.* 2014b, 38: 160–166.

Pangloli, P.; Dje, Y.; Ahmed, O.; Doane, C.A.; Oliver, S.P.; Draughon, F.A. Seasonal incidence and molecular characterization of *Salmonella* from dairy cows, calves, and farm environment. *Foodborne Pathog. Dis.* 2008, 5: 87–96.

Patil, A.; Disouza, J.; Pawar, S.H. Shelf life stability of encapsulated lactic acid bacteria isolated from sheep milk thrived in different milk as natural media. *Small Rumin. Res.* 2019, 170: 19–25.

Pérez-Elortondo, F.J.; Albisu, M.; Barcina, Y. Brining time effect on physicochemical and microbiological parameters in Idiazábal cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 1999, 49: 139–149.

Pérez-Martín, F.; Seseña, S.; Fernandez-Gonzalez, M.; Arevalo, M.; Palop, M.L. Microbial communities in air and wine of a winery at two consecutive vintages. *Int. J. Food Microbiol.* 2014, 190: 44–53.

Pilipčincová, I.; Bhide, M.; Dudriková, E.; Trávníček, M. Genotypic Characterization of Coagulase-negative *Staphylococci* Isolated from Sheep Milk in Slovakia. *Acta Veterinaria Brunensis*, 2010, 79: 269–275.

Pirisi, A.; Lauret, A.; Dubeuf, J.P. Basic and incentive payments for goat and sheep milk in relation to quality. *Small Rumin. Res.* 2007, 68: 167–178.

Pizarro, M.G.; Landi, V.; Navas, F.J.; León, J.M.; Martínez, A.; Fernández, J.; Delgado, J.V. Non-parametric analysis of casein complex genes epistasis and their effect on phenotypic expression of milk yield and composition in Murciano-Granadina goats. *J. Dairy Sci.* 2020, 103: 8274–8291.



Plomp, M.; Leighton, T.J.; Wheeler, K.E.; Hill, H.D.; Malkin, A.J. In vitro high-resolution structural dynamics of single germinating bacterial spores. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007, 104 (23): 9644–9649.

Popescu, S.; Borda, C.; Diugan, E.A. Microbiological air quality in tie-stall dairy barns and some factors that influence it. *Afr. J. Agric. Res.* 2011, 6: 6726–6734.

Poveda, J.M.; Cabezas, L.; McSweeney, P.L.H. Free amino acid content of Manchego cheese manufactured with different starter cultures and changes throughout ripening. *Food Chem.* 2004, 84: 213–218.

Quigley, L.; O' Sullivan, O.; Stanton, C.; Beresford, T.P.; Ross, R.P.; Fitzgerald, G.F.; Cotter, P.D. The complex microbiota of raw milk: review article. *FEMS Microbiol. Rev.* 2013, 37: 664–698.

Ramírez-Ramírez, J.C.; Rosas Ulloa, P.; Velázquez González, M.Y.; Ulloa, J.A.; Arce Romero, F. Bacterias ácido lácticas: Importancia en Alimentos y su Efectos en la Salud. *Revista Fuente*, 2011, 2(7): 1–16.

Ramón, M.; Diaz, C.; Pérez-Guzman, M.D.; Carabaño, M.J. Effect of exposure to adverse climatic conditions on production in Manchega dairy sheep. *J Dairy Sci.* 2016, 99: 5764–5779.

Reglamento (CE) n° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, modificado por el Reglamento (CE) n° 1662/2006, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. (DOUE-L, 139, 2004; pp. 55–205).

Reglamento (CE) n° 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (Texto pertinente a efectos del EEE). (DOUE-L, 343, 2012; pp. 29).

Reyes, E.; Linares, D.M.; González, L.; Fresno, J.M.; Tornadijo, M.E.; Stanton, C. Production of conjugated linoleic acid and gamma-aminobutyric acid by autochthonous lactic acid bacteria and detection of the genes involved. *J. Funct. Foods* 2017, 34: 340–346.



Rivas, J.; Perea, J.M.; Angón, E.; Barba, C.; Morantes, M.; Dios-Palomares, R.; García, A. Diversity in the dry land mixed system and viability of dairy sheep farming. *Ital. J. Anim. Sci.* 2015, 14: 179–186.

Rivas, J.; Perea, J.M.; De-Pablos-Heredero, C.; Angón, E.; Barba, C.; García, C. Canonical correlation of technological innovation and performance in sheep's dairy farms: Selection of a set of indicators. *Agric. Syst.*, 2019, 176:102665.

Rodas, A.M.; Ferrer, S.; Pardo, I. 16S-ARDRA, a Tool for Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Grape Must and Wine. *Syst. Appl. Microbiol.* 2003, 26: 412–422.

Rolesu, S.; Loi, F.; Cappai, S.; Coccocone, A.; Cataldi, M.; Usala, P.; Podda, A.; Deliperi, S.; Oppia, P.; Natale, A.; y cols. Description and typology of dairy sheep farm management profiles in Sardinia. *Small Rumin. Res.* 2018, 164: 39–47.

Ruiz, P.; Izquierdo, P.M.; Seseña, S.; Palop, M.L.; Ruiz, P. Intraspecific genetic diversity of lactic acid bacteria from malolactic fermentation of Cencibel wines as derived from combined analysis of RAPD-PCR and PFGE patterns. *Food Microbiol.* 2008, 25: 942–948.

Sahelices, C. Estudio de la Población de Levaduras en Quesos de Pasta Blanda de Extremadura. Tesis Doctoral, Universidad de Extremadura, Badajoz, Spain, 2018.

Salmerón, J.; de Vega, C.; Pérez-Elortondo, F.J.; Albisu, M.; Barrón, L.J.R. Effect of pasteurization and seasonal variations in the microflora of ewe's milk for cheesemaking. *Food Microbiol.* 2002, 19: 167–174.

Sampimon, O.C.; Vernooij, J.C.A.; Sol, J. Praktische aspecten rond droogzetten. *Tijdschrift Diergeneeskunde*, 2004, 129: 823–833.

Scheldeman, P.; Pil, A.; Herman, L.; De Vos, P.; Heyndrickx, M. Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71: 1480–1494.

Sen, B. y Asan, A. Fungal flora in indoor and outdoor air of different houses in Tekirdag City (Turkey): Seasonal distribution and relationship with climatic factors. *Environ. Monit. Assess.* 2009, 151: 209–219.



Seseña, S.; Sánchez, I.; Palop, L. Characterization of *Lactobacillus* strains and monitoring by RAPD-PCR in controlled fermentations of “Almagro” eggplants. *Int. J. Food Microbiol.* 2005, 104: 325–335.

Sevi, A.; Massa, S.; Muscio, A.; Dell’aquila, S.D.D.; Catalano, S. Litter treatment with bentonite or paraformaldehyde: Effects on air quality and on milk yield of Comisana ewes. *Zootec. Nutr. Anim.* 1998, 24: 213–224.

Sevi, A.; Massa, S.; Annicchiarico, G.; Aquila, S.D.; Muscio, A. Effect of stocking density on ewes’ milk yield, udder health and microenvironment. *J. Dairy Res.* 1999, 66: 489–499.

Sevi, A.; Annicchiarico, G.; Albenzio, M.; Taibi, L.; Muscio, A.; Dell’Aquila, S. Effects of solar radiation and feeding time on behavior, immune response and production of lactating ewes under high ambient temperature. *J. Dairy Sci.* 2001, 84: 629–640.

Sevi, A.; Taibi, L.; Albenzio, M.; Annicchiarico, G.; Marino, R.; Caroprese, M. Influence of ventilation régime on microenvironment and on ewe welfare and milk yield in summer. *Ital. J. Anim. Sci.* 2003a, 2: 197–212.

Sevi, A.; Taibi, L.; Albenzio, M.; Caroprese, M.; Marino, R.; Muscio, A. Ventilation effects on air quality and on the yield and quality of ewe milk in winter. *J. Dairy Sci.* 2003b, 86: 3881–3890.

Sevi, A.; Casamassima, D.V.; Pulina, G.; Pazzona, A. Factors of welfare reduction in dairy sheep and goats. *Ital. J. Anim. Sci.* 2009, 8: 81–101.

Smit, G.; Smit, B.A.; Engell, W.J.M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavor profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.* 2005, 29: 591–610.

Soto, T.; Sáiz, F.; Rodríguez, J.; Chena, C. Evaluation of Staphylococcal Food Contamination in Four Different Culture Media. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 1991, 33: 141–144.



Stewart, C.M. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. En *Foodborne microorganisms of public health significance*. Hocking, A.D., Ed.; Australian Institute of Food Science and Technology, Sydney, Australia, 2003; pp. 359–380.

te Giffel, M.C.; Beumer, R.R.; Slaghuis, B.; Rombouts, F.M. Occurrence and characterization of (psychrotrophic) *Bacillus cereus* on farms in the Netherlands. *Neth. Milk Dairy J.* 1995, 49: 125–138.

te Giffel, M.C.; Wagendorp, A.; Herreweg, A.; Driehuis, F. Bacterial spores in silage and raw milk. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2002, 81: 625–630.

Thomas, J.; Dalla Fontana, L.; Ramos, E.; Thomas, J.; Demaria, M.; Costamagna, D.; Faggiano, M.; Bonzi, E. Factores de riesgo de contaminación de la leche con bacterias esporuladas (*Clostridium*) en establecimientos lecheros de la provincia de Santa Fe. *FAVE Cienc. agrar.* 2012, 11(1): 19–28.

Tonamo, A.; Komlósi, I.; Varga, L.; Czeglédi, L.; Peles, F. Bacteriological Quality of Raw Ovine Milk from Different Sheep Farms. *Animals* 2020, 10: 1163.

Torkar, K.G. y Vengušt, A. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw milk and cheese in Slovenia. *Food Control* 2008, 19: 570–577.

Tormo, H. y Monsallier, F. Combinasion de pratiques et composition microbienne des laits. En *Microflore du Lait cru. Vers Une Meilleure Connaissance des Écosystèmes Microbiens du Lait de Leurs Facteurs de Variation*; Laithier, C., Ed.; CNAOL-RMT Fromages de Terroirs: Lyon, France, 2011; pp. 109–115.

Toro-Mujica, P.; García, A.; Gómez-Castro, G.; Acero, R.; Perea, J.; Rodríguez-Estévez, V.; Aguilar, C.; Vera, R. Technical efficiency and viability of organic farming dairy sheep in a traditional area for sheep production in Spain. *Small Rumin. Res.* 2011, 100: 89–95.

Toro-Mujica, P.; García, A.; Gómez-Castro, G.; Perea, J.; Rodríguez-Estévez, V.; Angón, E. Organic dairy sheep farms in southcentral Spain: Typologies according to livestock management and economic variables. *Small Rumin. Res.* 2012, 104: 28–36.



Torp, M.; Holstad, G.; Granum, P.E. *Bacillus cereus*—For og feces som kilde till hoye sporetall i melk i en stofebesetning. (*Bacillus cereus*—Feeds and feces as major contamination sources in milk in a dairy farm). *Norsk veterinær tidsskrift*, 2001, 113: 462–466.

Vacheyrou, M.; Normand, A.C.; Guyot, P.; Cassagne, C.; Piarroux, R.; Bouton, Y. Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *Int. J. Food Microbiol.* 2011, 146: 253–262.

Vauterin, L. y Vauterin, P. Computer-aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms. *Eur. Microbiol.* 1992, 1: 37–41.

Vautor, E.; Carsenti-Dellamonica, H.; Sabah, M.; Mancini, G.; Pépin, M.; Dellamonica, P. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from dairy sheep farms (*agr* group, adherence, slime, resistance to antibiotics). *Small Rumin. Res.* 2007, 72: 197–199.

Verdier-Metz, I.; Michel, V.; Delbès, C.; Montel, M.C. Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food Microbiol.* 2009, 26: 305–310.

Viljoen, B.C. y Greyling, T. Yeasts associated with Cheddar and Gouda making. *Int. J. Food Microbiol.* 1995, 28(1): 79–88.

Vissers, M.M.M.; Driehuis, F.; te Giffel, M.C.; De Jong, P.; Lankveld, J.M.G. Improving farm management by modeling the contamination of farm tank milk with butyric acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 2006, 89 (25): 850–858.

Vissers, M.M.M.; Driehuis, F.; te Giffel, M.C.; De Jong, P.; Lankveld, J.M.G. Minimizing the level of butyric bacteria spores in farm tank milk. *J. Dairy Sci.* 2007a, 90: 3278–3285.

Vissers, M.M.M.; Driehuis, F.; te Giffel, M.C.; De Jong, P.; Lankveld, J.M.G. Quantification of the transmission of microorganisms to milk via dirt attached to the exterior of teats. *J. Dairy Sci.*, 2007b, 90: 3579–3582.



Vissers, M.M.M.; te Giffel, M.C.; Driehuis, F.; De Jong, P.; Lankveld, J.M.G. Minimizing the level of *Bacillus cereus* spores in farm tank milk. *J. Dairy Sci.* 2007c, 90: 3286–3293.

Vissers, M.M.M.; Driehuis, F.; te Giffel, M.C.; De Jong, P.; Lankveld, J.M.G. Concentrations of Butyric Acid Bacteria Spores in Silage and Relationships with Aerobic Deterioration. *J. Dairy Sci.* 2007d, 90: 928–936.

Vissers, M.M.M. y Driehuis, F. On-farm hygienic milk production. En *Milk Processing and Quality Management*; Tamime, A.Y., Ed.; Wiley-Blackwell: West Sussex, UK, 2009, pp. 1–22.

Von Neubeck, M.; Baur, C.; Krewinkel, M.; Stoeckel, M.; Kranz, B.; Stressler, T.; Fischer, L.; Hinrichs, J.; Scherer, S.; Wenning, M. Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. *Int. J. Food Microbiol.* 2015, 211: 57–65.

Wanderley, L.; Bianchin, A.; Teo, C.R.P.A.; Fuentefría, A.M. Occurrence and pathogenicity of *Candida* spp. in unpasteurized cheese. *Rev. Bras. Biocienc.* 2013, 11: 145–148.

Wathes, C.M. Air and surface hygiene. En *Livestock Housing*; Wathes, C.M.; Charles, D.R., Eds.; CAB International: Wallingford, UK, 1994; pp. 123–148.

Wehr, H.M. y Frank, J.F. *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*, 17th ed.; American Public Health Association: Washington, DC, USA, 2004; pp. 153–186.

Welthagen, J.J. y Viljoen, B.C. Yeast profile in Gouda cheese during processing and ripening. *Int. J. Food Microbiol.* 1998, 41(3): 185–194.

Welthagen, J.J. y Viljoen, B.C. The isolation and identification of yeasts obtained during the manufacture and ripening of Cheddar cheese. *Food Microbiol.* 1999, 16(1): 63–73.

Xiong, Y.; Meng, Q.S.; Gao, J.; Tang, X.F.; Zhang, H.F. Effects of relative humidity on animal health and welfare. *J. Integr. Agric.* 2017, 16: 1653–1658.



Xu, W.; Hou, Y.; Hung, Y.S.; Zou, Y. A comparative analysis of Spearman's rho and Kendall's tau in normal and contaminated normal models. *Signal Process.* 2013, 93: 261–276.

Yildiz, M.; Turgut, T.; Cetin, B.; Kesmen, Z. Microbiological characteristics and identification of yeast microbiota of traditional mouldy civil cheese. *Int. Dairy J.* 2021, 116: 104955.

Yurkov, A.M.; Rohl, O.; Pontes, A.; Carvalho, C.; Maldonado, C.; Sampaio, J.P. Local climatic conditions constrain soil yeast diversity patterns in Mediterranean forests, woodlands and scrub biome. *FEMS Yeast Res.* 2016, 16: 1–11.

Zaragoza, C.S.; Olivares, R.A.C.; Watty, A.E.D.; Moctezuma, A.P.; Tanaca, L.V. Yeasts isolation from bovine mammary glands under different mastitis status in the Mexican High Plateau. *Rev. Iberoam. Micol.* 2011, 28(2): 79–82.

Zuljan, F.A.; Mortera, P.; Alarcón, S.H.; Blancato, V.S.; Espariz, M.; Magni, C. Review: Lactid acid bacteria decarboxylation reactions in cheese. *Int. Dairy J.* 2016, 62: 53–62.



ANEXOS

7. ANEXOS

7.1. Encuesta.

ESTUDIO DE GESTION DEL OVINO LECHERO EN CASTILLA LA MANCHA

1.-DATOS PRELIMINARES

Nombre propietario: _____

Dirección finca: _____

Municipio (cód. Postal) _____ Provincia: _____

Teléfono de contacto: _____ Correo electrónico: _____

Fecha encuesta: _____

2.- DATOS ESTRUCTURALES

2.1.- INSTALACIONES Y EQUIPAMIENTO

2.1.1. INFRAESTRUCTURAS OVEJAS DE ORDEÑO

Concepto	Número	Superficie (m ²)	h	Edad del bien (años)	Orientación	Vientos dominantes	Obstáculos
Aprisco							
Puertas							
Ventanas							
Sala ordeño							
Puertas							
Ventanas							
Henil							
Pajar							
Otros							

a. Impresión general instalaciones:

Construcción antigua: Buen estado Mal estado

Construcción nueva: Buen estado Mal estado



b. Características del alojamiento:

Superficie alojamiento de ordeño:

- Ventilación:** Suficiente Insuficiente
 Horizontal (Ver) Vertical (Inv)
 Caballete
- Tipo de solera:** Permeable (tierra) Impermeable (cemento, hormigón)
- Higiene Nave (*):** Deficiente Intermedia Buena
- Material camas:** Paja Serrín Otros
- Higiene camas:** Deficiente Intermedia Buena
- Frecuencia retirada de basura al mes:**

(*) Higiene Nave	Puntuación (1-3)	Multiplicador	Valor	Clasificación
Suciedad cama		x3		1-9 Buena
Polvo en alojamiento		x3		
Restos comida		x1		10-18 Intermedia
Insectos		x1		
Restos otros elementos		x1		19-27 Deficiente
Suma				

2.2.- GANADO

2.2.1. ESPECIES EXISTENTES EN LA EXPLOTACIÓN

Especie	Raza	Nº hembras totales	Nº hembras en ordeño	% Reposición
Oveja				

3.- ASPECTOS REPRODUCTIVOS

3.1. CUBRICIONES-PARIDERA

- a. Nº parideras/año: _____
- b. Lotes de producción: Alta Media Baja Sin lotes
- c. Nº partos/oveja/año: 3 cada 2 años Intermedio 1 al año
- d. Tipo de destete:

30-40 días	
Media leche	
Destete precoz-lact-artif	
Otro	



4.- PASTOREO OVEJAS DE ORDEÑO;

a. ¿Realiza pastoreo? Sí No

b. Tipo de pastoreo:

Conducido o guiado

En cercas

Otras

c. Lugar de pastoreo:

Pastos naturales

Rastrojos cereal

Praderas cultivadas

Otros

5.- ASPECTOS SANITARIOS

5.1. TRATAMIENTOS SANITARIOS

b. % Mamitis clínicas: _____

c. Vacunación de mamitis gangrenosa: Sí No

d. Vacunación de agalaxia contagiosa: Sí No

e. Tratamiento antibioterapia de secado: General a todas las ovejas

Selectivo a las ovejas RCS+ o CMT+ No

Intramuscular Intramamaria

6. ASPECTOS HIGIÉNICO-SANITARIOS DE LA LECHE

6.1. CARACTERÍSTICAS DEL ORDEÑO

6.1.2. CONDICIONES SALA ORDEÑO

Marca:	Año de instalación:
Puestos de ordeño:	Puntos de ordeño:
Tipo de línea: Alta <input type="checkbox"/>	Baja <input type="checkbox"/>
Cerrada en anillo <input type="checkbox"/>	Fondo ciego <input type="checkbox"/>

6.1.3. HIGIENE SALA ORDEÑO

Higiene Sala Ordeño (*):	Deficiente <input type="checkbox"/>	Intermedia <input type="checkbox"/>	Buena <input type="checkbox"/>
Ventilación:	Con ventilación forzada <input type="checkbox"/>	Sin ventilación forzada <input type="checkbox"/>	
Tipo de suelo:	Difícil limpieza <input type="checkbox"/>	Fácil limpieza <input type="checkbox"/>	
Uso de hidrolimpiadora:	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		
Tipo de detergentes:	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		
Frecuencia limpieza al día:			



(*) Higiene Sala Ordeño	Puntuación (1-3)	Multiplicador	Valor	Clasificación
Suciedad cama		x3		1-9 Buena
Polvo en alojamiento		x3		
Restos comida		x1		10-18 Intermedia
Insectos		x1		
Restos otros elementos		x1		19-27 Deficiente
Suma				

6.1.4. PERSONAL

Nº ordeñadores:				
Antigüedad:	<6 meses <input type="checkbox"/>	6 meses-1 año <input type="checkbox"/>	>1 año <input type="checkbox"/>	
Sexo:	Hombre <input type="checkbox"/>	Mujer <input type="checkbox"/>		
Edad:	<30 <input type="checkbox"/>	30-55 <input type="checkbox"/>	>55 <input type="checkbox"/>	
Relación:	Propietarios <input type="checkbox"/>	Familiares <input type="checkbox"/>	Empleados <input type="checkbox"/>	Mixto <input type="checkbox"/>

6.1.5. RUTINA DE ORDEÑO

Nº ordeños/día: _____		
Cierre de vacío previa retirada de pezoneras: Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		
Vacío (KPa):	Pulsaciones/min:	Relación succión/masaje:
Vacuómetro a la vista en la sala de ordeño: Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		
Periodicidad de cambio del filtro de leche por ordeño:		
Retirador automático de pezoneras: Sí-Por flujo <input type="checkbox"/> Sí-Por tiempo <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		
Contacto de pezoneras con el suelo: Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		
Desinfección postordeño: Sí <input type="checkbox"/> Esporádica <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		
Forma desinfección:	Pulverización <input type="checkbox"/>	Baño <input type="checkbox"/>
Tipo desinfectante:	Clorhexidina <input type="checkbox"/>	Yodóforos <input type="checkbox"/> Alternancia <input type="checkbox"/>
Tipo de detergente (marca):		
Frecuencia de uso de detergente ácido para limpiar máquina de ordeño:		
Agua caliente: Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		Capacidad del termo:



6.2. CARACTERÍSTICAS DE LA LECHERÍA

6.2.1. LOCAL:

Local estanco: Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Comunicación directa con la sala de ordeño: Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Tipo de suelo, paredes y techo: Fácil limpieza <input type="checkbox"/> Difícil limpieza <input type="checkbox"/>
Higiene lechería (*): Deficiente <input type="checkbox"/> Intermedia <input type="checkbox"/> Buena <input type="checkbox"/>
Presencia de polvo: Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>

(*) Higiene Lechería	Puntuación (1-3)	Multiplicador	Valor	Clasificación
Suciedad cama		x3		1-9 Buena
Polvo en alojamiento		x3		
Restos comida		x1		10-18 Intermedia
Insectos		x1		
Restos otros elementos		x1		19-27 Deficiente
Suma				

6.2.2. TANQUES DE REFRIGERACIÓN:

Número de tanque.	1	2
Marca		
Año de instalación		
Capacidad (L)		
Potencia (nº ordeños)	2 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 6 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 6 <input type="checkbox"/>
Temperatura		
Abierto/Cerrado	Abierto <input type="checkbox"/> Cerrado <input type="checkbox"/>	Abierto <input type="checkbox"/> Cerrado <input type="checkbox"/>
Periodicidad limpieza/día		
Tipo de detergente	Gral <input type="checkbox"/> Específico <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Gral <input type="checkbox"/> Específico <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Periodicidad revisión/año		
Fácil mantenimiento	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Localización compresores	Fuera <input type="checkbox"/> Dentro <input type="checkbox"/>	Fuera <input type="checkbox"/> Dentro <input type="checkbox"/>

6.2.3. SISTEMAS DE CONTROL DE CALIDAD DE LA LECHE

Destino de la leche: Frecuencia de recogida de la leche (días):
--



7.- ALIMENTACIÓN

7.1. COMERCIALIZACIÓN DE LA LECHE

Canal comercial	Leche (litros/año)
Industria	
Quesería propia	

a. Nº ovejas en ordeño:

b. Nivel productivo (litros vendidos/oveja/año):

7.2. ALIMENTACIÓN OVEJAS ORDEÑO:

- Número de ovejas en ordeño exclusivo:

- Periodo lactación (meses):

- Lotes por nivel Productivo:

Sí No

Lotes: 2 3

- Tipo de alimentación:

1. Unifeed comercial:

Nombre empresa/s:

Frecuencia de recepción (días):

cantidad/oveja/lote:

2. Unifeed elaborado en la propia ganadería:

3. Forraje y concentrado:

- Almacén materias primas:

- Nave: Superficie

- Abierto: Superficie

- Separación neta entre materias primas: Sí No

- Higiene: Deficiente Intermedia Buena

- Carro mezclador: Marca / años

- Dispensación:

- Comederos: Metálicos Obra

- Cintas de alimentación: Número y longitud

- Pasillos: Número y longitud.



7.3. MATERIAS PRIMAS (Tipo, cantidad por oveja según el lote de ordeño-kg)

- **Concentrado: Empresa.**

- **Cereal:** Avena Cebada Maíz Otros

- **Leguminosas:** Guisantes Habas Lentejas Altramuz Otros

- **Otros:** Pipa de girasol Algodón Otros

- **Pellet:** Remolacha Girasol Otros

- **Forraje:**

- **Henificado: Tipo/s:** Alfalfa, veza/avena, etc.

- **Ensilado: - Tipo/s:** Alfalfa, veza/avena, etc.

- **Conservación:**

-Trinchera, rulo, saco.

- Periodo de uso una vez abierto.

- Presencia de mohos, tierra, etc.

- Correctamente tapado: S/N

- **Origen:**

- Propio.

- Externo.

- **Subproductos:**

- **Tipo:** Cebadilla, pulpa de naranja/limón, otros.

- **Conservación:**

- Periodo de uso.

- Presencia de mohos, tierra, etc.

- Correctamente tapados: S/N.

- **Paja:**

- **Cereal:** avena, trigo, cebada.

- **Leguminosas:** tipo

- **Pastoreo/pradera:**

- Periodo del año.

- **Tipo:** Rastrojo de cereal o leguminosas, tipo de pradera.

OBSERVACIONES DE LA EXPLOTACIÓN.



7.2. Artículo 1.



animals



Review

Factors Affecting Levels of Airborne Bacteria in Dairy Farms: A Review

Álvaro Rafael Quintana ^{1,*}, Susana Seseña ², Ana Garzón ³ and Ramón Arias ¹

¹ Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Forestal de Castilla La Mancha (IRIAF), 13300 CERSYRA de Valdepeñas (Ciudad Real), Spain; rarias@jccm.es

² Departamento de Química Analítica y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias Ambientales y Bioquímica, Universidad de Castilla-La Mancha, 45071 Toledo, Spain; Susana.SPrieto@uclm.es

³ Departamento de Producción Animal, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba, Spain; paIgasia@uco.es

* Correspondence: alvaroq@jccm.es

Received: 16 January 2020; Accepted: 19 March 2020; Published: 21 March 2020



Simple Summary: The environmental quality of farms plays an important role in the food safety of the dairy industry because it may influence the microbial communities in milk. The microorganisms present in the different areas of a farm have an influence on this environmental quality, using the air as a vehicle of dissemination. However, the ability of this airborne microbial community to contaminate the milk, like the sources of origin of these microorganisms, has not been well studied in dairy farms until now. This review examines the importance of different factors that affect the environmental quality of dairy farms, and must, therefore, be taken into account when considering the importance of environmental microbiology as a tool in the improvement of the quality of milk and dairy products.

Abstract: This review attempts to reflect the importance of different factors that affect the environmental quality of dairy farms and must, therefore, be taken into account when considering the importance of environmental microbiology as a tool in the improvement of the quality of milk and dairy products. The effect of a factor such as temperature is vital for the dairy farm environment, especially when the temperatures are extreme, because a proper choice of temperature range improves the quality of the air and, thus, animal welfare. Similarly, the appropriate level of relative humidity in the environment should be taken into consideration to avoid the proliferation of microorganisms on the farm. Air quality, well-designed livestock housing, proper hygienic practices on the farm, stocking density, and the materials used in the livestock houses are all important factors in the concentration of microorganisms in the environment, promoting better welfare for the animals. In addition, a ventilation system is required to prevent the pollution of the farm environment. It is demonstrated that proper ventilation reduces the microbial load of the environment of dairy farms, enhancing the quality of the air and, therefore, the wellbeing of the animals. All this information is very useful to establish certain standards on dairy farms to improve the quality of the environment and, thereby, achieve better quality milk and dairy products.

Keywords: dairy farm environment; air quality; airborne microorganism; milk

1. Introduction

Due to the beneficial properties of milk and the wide range of essential nutrients it provides, there are more than 6 billion consumers of milk and milk products throughout the world, the majority of them in developing countries [1]. Throughout the twentieth century, milk became a raw material of an important industry and was made available to consumers in a comfortable, safe, and economic way. Nowadays, milk production is a dynamic and growing industry that is essential to the economies



of many countries. Approximately 150 million family farms around the globe are engaged in milk production [2]. The farmgate milk price depends on the milk's compositional quality, but the hygienic quality of the milk is also very important.

The control of milk quality is one of the most important problems in the dairy sector. Although traditionally the quality of the milk was evaluated according to its composition, due to the high levels of milk production at the end of the last century, quality control systems are now based on health and hygienic parameters too, specifically on the total mesophilic bacteria and the somatic cell count in milk from bulk tanks [3]. Laws on food security and nutrition, such as Regulation EC n° 853/2004 [4] in Europe, usually establish the boundaries for these parameters.

The presence of microorganisms in milk can have their origin in intramammary infections (affecting somatic cell count) and/or environmental contamination (affecting total aerobic microbial count), such as udder hygiene, milking parlor, milk houses, etc. [5]. Gonzalo et al. [6] pointed out that the total bacteria counts allow the evaluation of the level of adequacy of cleaning practices on the dairy farm, in addition to ensuring the correct quality of the milk and milk products that derive from it. However, this count is less representative for the evaluation of the microbial quality of milk, and that is why several studies have assessed other bacterial groups of milk in cattle [7], in goats [8], and in sheep [9].

Milk microbiota has a great influence on the safety and quality of dairy products, carrying out various functions such as facilitating dairy fermentations or causing spoilage or disease, among others [10]. For this reason, it becomes very important to know the variety of routes that these microorganisms could use to reach the milk. Good veterinary practices can be implemented, as well as good management and hygiene of the milking parlor, which can avoid direct contamination of the milk [11]. However, it is not so easy to control the environmental quality of dairy farms.

In recent years, the dairy farm environment has become a focus of interest in the agro-food industry. This is due to the effects of the diversity of activities carried out on the farms, which could affect the final product, the milk, and, therefore, could have social and economic impacts on the production of both milk and dairy products (mainly cheese). Regarding the importance of environmental microbiology on dairy farms and on the quality of milk and dairy products, both airborne bacteria and the main factors that affect the microbial load of the dairy farm environment will be examined in this review to recommend adequate preventive measures on the farm.

2. Methodology

The review includes primarily references published in journals cited in the ScienceDirect database (<https://www.sciencedirect.com/>); papers published in these journals have been refereed. Various search terms have been employed to identify relevant publications (e.g., 'air quality', 'airborne microorganism', 'environment', 'dairy farm', 'air contamination', 'milk', 'factors', 'welfare', 'hygiene', 'humidity', 'temperature', 'ventilation effects', 'bedding materials', 'litter management'). Subsequently, the full papers have been retrieved through the websites of the respective journals. Citations of other materials are scarce; these include a few references to book chapters and conference material. After a search that has covered about 150 manuscripts, references cited appear at the end of the review.

3. Dairy Farm Environment

Dairy farms have a dynamic environment with associated microbial communities, which have natural reservoirs among components of this ecosystem [12]. This environment is very complex due to the microbial diversity present in the different areas of the farm (such as the milking parlor, the stables, and even the environment surrounding the farm), and it does not guarantee good application of the Hazard Analysis Critical Control Points system. For this reason, the health authorities recommend the application of good manufacturing practices on the farm, as the European legislation has done (Regulation EC n° 178/2002 [13] and Regulation EC n° 853/2004 [4]).

Adequate sanitary environmental conditions in food processing plants could reduce the level of the microbial communities on the farm. However, it is impossible to keep environmental contamination,



such as bacteria, yeasts, and molds, at a minimum level in the environment of food processing [14]. This is mainly due to the air present in the environment, which is the transport vehicle of matter particles and bioaerosols. For this reason, it is important to pay special attention to the quality of this air, as one of the main routes of contamination of dairy farms. The air is a hostile environment as a habitat for microorganisms because they are stressed by the lack of nutrients and dehydration, but it is an important vehicle for dissemination since we can find all kinds of bacteria in it [15]. The microorganisms could travel through the air adhered to dust particles or droplets, or even as single particles, until they fall and are deposited on the surrounding surfaces [16]. The air, as a source of contamination through dissemination, has been properly researched in numerous studies of food processing plants [14] as well as in the field of enology [17].

Several studies related to environmental contamination on dairy farms have focused on pathogens and decomposition bacteria. As far as is known, few studies have focused on environmental microbiology, from the point of view of contamination and its effect on milk and dairy products [18]. It is now clear that the microbiological load present in the environment of farms could have a positive influence on milk, inasmuch as the possible existence of some airborne microorganisms, such as lactic acid bacteria, would permit an enrichment of the nutritional and organoleptic qualities of the milk, as has been previously studied in wineries [17]. In addition, the microbiota naturally present in milk may have a protective effect against the growth of pathogens found in the air [19]. However, the ability of the airborne microbial community to contaminate milk remains an ongoing concern, and the sources of the origin of contamination of those microorganisms that might affect the natural microbiota of milk have not been studied in depth in dairy cattle [18], and not studied at all in sheep or goats. Thus, limited information is available on the microbiological quality of indoor air on dairy farms and the factors that influence it [20], where the management of different substrates used to feed the animals and change the bedding, along with herd size and udder hygiene, may contribute to the transfer between the microorganisms present in the environment and the milk.

As regards the milking practice, which depends on the hygienic practices of the farmer during the process, the environmental sources of contamination may play an important role in the transfer of microorganisms, but this issue has not yet been carefully examined [18]. During and after milking, microbial contamination may occur through the different environmental sources, such as feeds, feces, bedding material, and soil, which adhere to the udder and from there, are transferred to the milk [21]. In view of the diversity of microbiota, we cannot discard the hypothesis that certain microorganisms present in the environment could be later found in the raw milk because of the animals housed in the stables. This transfer from the environment to the milk could take place either directly by air or through the teat, which has been in contact with various media (litter, dust, etc.), or because of the milking practice.

As previously mentioned, housing hygiene could have great importance in the control of dairy farm contamination, because it is considered an important source of microorganisms that could affect the quality of the milk [5]. Vissers et al. [22] found that the level of spore-forming butyric acid bacteria contamination was higher in cows that lay down on dirty patches of the housing, which resulted in highly contaminated teats before milking. This teat hygiene is related to the amount of dirt transmitted to the milk by a factor of 100 difference between a well-managed farm and badly-managed farm [23]. In addition, the hygiene of livestock can have an influence on the transmission of diseases. Rolesu et al. [24] showed that correct hygiene, with continuous removal of mud and manure from the livestock housing, drastically reduces the possibility of any outbreak of disease that could affect the animals.

As is the case with the dairy sector, environmental contamination in the cheese industry is of vital importance in the cheese-making process. Air is an important source of contamination, with microorganisms being transported through it, affecting the properties of the final product [25]. In addition, the hygienic quality of milk is very important, especially for milk that will be used for the elaboration of unpasteurized cheese [26]. For this reason, it is important to pay attention to possible routes of contamination through the dairy farm environment.



4. Effect of Temperature on Air Quality

Temperature plays an important role in the environment of dairy farms because it is closely related to the welfare of the animals. In the coming years, due to climate change, the average global temperatures could rise by up to 4 °C in some parts of the world [27]. This increase will have an important impact on livestock farming systems, as well as on human and animal health [28].

The effect of temperature on dairy farms depends on both the location and the season. In general, the different microclimatic conditions in each locality play a crucial role in the microbiological population, given that these microbial communities are very complex and variable to seasonal changes [29]. In this context, some researchers observed differences in the concentration of microorganisms in the environment, depending on the season [30] or due to meteorological factors [31]. As Sanz et al. [15] observed in their research of a dairy cattle farm, there was a seasonal effect on the number of isolates of bacteria (*Escherichia coli*) in the air, with up to twice the amount in the hot season (summer) than in the cold season (winter). Even the time of day influences the concentration of microorganisms. Popescu et al. [20] found a positive correlation between the increase in temperature and the increase in the mesophilic bacteria count in the environment, both in the morning and in the evening. For this reason, it is clear that seasonal and daily variations exist that make the bacterial counts higher in the hottest seasons as well as in the hottest hours of the day.

Environmental microorganisms are positively correlated with air temperature, but negatively correlated with humidity and solar radiation [31]. Regarding this fact, [32], in his research, concluded that if the study had been carried out in summer, the number of microorganisms detected in the air would probably have been higher. Calamari et al. [33], according to their research, noted a greater content of spores in feces during summer. These spores colonize the skin and the hair of animals and can contaminate the dairy farm environment. However, Adhikari et al. [34] found a higher concentration of spores and microorganisms in the environment in winter, indicating that it may be due to microclimatic differences between countries in which studies of this type are carried out, or that differences in diet composition might interfere with seasonal effects.

Good building design provides protection against climatic conditions (especially in areas which are more susceptible to extreme weather conditions), alleviating stress in the animals and avoiding increases in respiration rate and exchanges between the animal's body surface and the environment, which contribute to air pollution [35]. The choice of the adequate interval of temperature depends on the farming system. In dairy cattle, it is important to keep the animals between −5 °C and 22 °C [36], although this thermal comfort zone varies depending on the physical condition of the animal, the resources available, and environmental factors. In the case of small ruminants, the optimum air temperature for efficient production should range between 5 °C and 20 °C [37].

In terms of animal welfare, some measures are strictly recommended depending on the season. During summer, sheep exposed to high temperatures and solar radiation show an increase in their respiration rate, an increase in their rectal temperature, and a metabolic alteration as opposed to those that stay in the shade (influencing the air quality), so the milk coagulating properties are diminished [38]. In addition, exposure to such radiation reduces the defensive capacity of the udder, which may allow contamination of the mammary gland by environmental pathogens [35]. Hence, providing shade in the barn during the hours of extreme heat minimizes the impact on the animal's body surface, improving the quality of the air and, thus, the quality of the milk [37]. During winter, the thermal comfort zone may vary depending on the physical and health conditions of the animal, the feeding, and other environmental factors. Therefore, the minimum thermal comfort value could be increased when the animals are wet or exposed to airflows or decreased when the relative humidity and solar radiation are high [39].

Airborne microbiota is also affected by the activities of the farm, and this could affect the environmental analysis developed. The best moment of the day to collect a sample or to measure certain parameters would be during the morning, before the aeration of the farm and before the beginning of farming activities, which contaminate the environment [20]. In addition, carrying out



these analyses in the morning avoids the bactericidal effect of the radiation and helps to collect a wide range of airborne microorganisms [40].

The climate conditions also have an effect on the milking equipment. Poor hygiene in the milking parlor contributes to the pollution of the dairy farm environment and results in the contamination of the milking equipment. This situation, combined with high temperatures in the period between milking, increases the growth rate of microorganisms that affect the level of contamination in the milk [21]. This aspect is important when the milk is destined for use in the cheese-making process because the quality of the final product may be compromised.

5. Effect of Humidity on Air Quality

A good livestock housing design is a fundamental factor to avoid the proliferation of microorganisms in the environment of dairy farms, and an essential aspect to be considered for the optimum project is humidity.

Relative humidity is important for health because it is one of the main factors that affect respiratory damage in both humans and animals. As Xiong et al. [41] said, the level of humidity is important for the welfare of animals because the infectivity of pathogens found in the environment depends on this level.

It is important to take into account that the main parameters on the farm are interrelated: without good air distribution, poor ventilation will occur, the temperature will fluctuate from its optimum range, and relative humidity will be affected, influencing the count of microorganisms and molds. Moreover, as all environmental parameters are related in dairy farms, Sevi et al. [42] and Jimeno [43] concluded that certain space in the stables is necessary for each animal to ensure the correct relative humidity. If that living space is diminished, the concentration of pathogenic microorganisms in the environment is increased.

Dairy animals tolerate moisture poorly. The recommended values of relative humidity in dairy farms are between 55% and 75% for dairy cattle [36] and $\leq 70\%$ for small ruminants [37]. However, these values overlap with the optimal level for the survival of most bacteria and fungi 55%–75% [41]. Moreover, Wilson et al. [40] found that low humidity negatively affects the collection of microorganisms from the environment, which may be due to their lower presence. For this reason, control of the humidity is necessary to minimize the risk.

Although Tang [44] found that the relationship between airborne bacteria with relative humidity is complicated, some researchers discovered that a positive correlation exists between the increased humidity of the air and fungi [20]. This indicates that fungi are the ones most affected by humidity. This is due to the fact that humid conditions induce the decomposition of organic materials in the livestock housing, which provides an excellent setting for the growth of fungi, and this contributes to an increase in the spore load in the farm environment [34]. In addition, it can be stated that there is a correlation between the concentrations of fungi in the environment and the different values of the relative humidity of indoor surfaces [45]. Therefore, it seems that there is a positive correlation between the humidity level of livestock housing and the fungi load in the environment.

6. Effect of Livestock Housing on Air Quality

The livestock housing has an important role in the dairy farm environment because a good design that promotes good health and welfare for the different species is a vital aspect of sustainable animal production, along with proper hygiene. The hygiene in the animal sheds of the farms includes air, bedding, and surface hygiene. Poor hygiene of surfaces is connected to intensive farming systems, and is aggravated by poor maintenance [46].

Microbial communities present in livestock housing are interrelated with those present in the milking parlor. Good milking practice is another factor in a proper dairy farm environment because the correct management of the milking parlor improves the quality of the milk [18]. Hence, good hygiene among the farm-workers during milking (cleaning of the machines, hygienic parlor, udder



disinfection, etc.) affects the concentration of microorganisms in the environment, both those bacteria which are favorable to the quality of the milk and those which are harmful to this quality [47]. Generally, increasing the times between two milking intervals provides the microorganism with more time to grow, increasing the microbial concentration in the environment that surrounds the milking equipment, and affecting the level of contamination in the milk [21]. In addition, poor hygiene has negative effects on milk yield, causing low concentrations of protein and fat; and an increase in somatic cells in the animals of the herd, which in turn decreases the quality of the milk [9].

It is required that the dairy farm be well designed. Proper air space for the animals is one of the most important factors for the quality of the air and the welfare of the animals in the livestock houses. Air quality in the livestock building is a source of contamination not only for the animals but also for the workers' health. The optimal volume to avoid an increase in the total mesophilic bacteria count and the relative humidity in the environment, as well as a decrease in the properties of the milk, is 35–40 m³/head for cattle [48] and 7 m³/head for sheep and goats [38].

Another factor that affects air quality in livestock is the stocking density. The concentration of microorganisms and particles in the environment in livestock housing is inversely related to space. Concentrations of total mesophilic bacteria in the livestock house is significantly lower when animals have a stocked density of 5 m²/head for cows [43] and 2 m²/head for sheep or goats, and the somatic cell count in small ruminants is up to four times lower than animals stocked at 1–1.5 m²/head [42].

Furthermore, the material used in livestock housing affects the concentration of microorganisms in the air. If there is hay on the floor of the housing, it may increase the propionic bacteria and *Lactobacillus* [49]; the use of sand increases the number of *Streptococcus*, and the use of sawdust increases the level of coliforms and *Klebsiella* in the animals [50]. However, Monsallier et al. [51] showed that the use of straw as a bedding material, as opposed to other materials, means an increase in the microbial levels of the herds, which implies a higher level of ripening bacteria in the milk.

The material that covers the floor of the house is a source of contamination. The concentration of microorganisms in the dairy farm environment tends to be higher in those farms where the bedding is not clean or is not changed frequently [20,52]. Therefore, it is necessary to change the bedding material daily or add another layer of material each day to reduce the microbial load significantly. It has been demonstrated that fresh bedding usually has much lower microbial concentrations than used bedding because the concentration of microorganisms tends to increase due to contamination from feces and microbial growth during the first day [53]. Treating the bedding with products that reduce microbial activity (such as bentonite) can be a good strategy to reduce contamination in the livestock environment [46]. Bentonite is a volcanic material composed mainly of clay minerals and has a great capacity for water absorption. The application of bentonite to the bedding achieves a significant reduction in the number of microorganisms in the environment, which improves the quality of the milk [52]. It can also partially alleviate the adverse effects of the stocking density in farms, improving the coagulation capacity and, thus, the quality of the milk [54]. Therefore, good maintenance of bedding on farms is a critical point for livestock hygiene. It is clear that there is a transfer of microorganisms between the environment and the milk, and it is for this reason that good health and hygienic parameters are very important in the production of high-quality milk.

Apart from those factors already mentioned, another significant parameter is the feed. Diet may play an important role in the dairy farm environment because the air quality is influenced by the feces of the animals, which is an important contamination factor. It is well known that feed introduces a large variety of microorganisms and spores into the environment and, therefore, into the milk [21]. This can be seen in the results of Calamari et al. [33], where the concentration of spores in feces, and consequently, the contamination of the environment, is strictly related to the content of spores in the feed. It is important to control the impact that the feed has on the dairy farm environment because it not only affects the quality of the milk but also acts as a disseminator of pathogens affecting the animals on the farm.



Despite the high number of microorganisms present in the air in the dairy farm environment, only a third of them are detected in the milk [18], which means that there is a partially efficient (but not impervious) barrier between the barn and the milk. The effectiveness of this barrier is influenced by the hygienic conditions of the farm. The better the hygiene in livestock house, the lower the count of total mesophilic bacteria and the higher the quality of the milk. In this regard, Oliete et al. [55] demonstrated with ovine that the quality of the milk is related to good hygienic practices on the farm. In a similar case studied by Bergonier et al. [56], a relation was found between the poor hygiene of the milking parlor and the livestock house and the increase in total mesophilic bacteria, and, thus, poor milk quality.

As previously mentioned, the environment of livestock housing has important effects on the quality of milk. This implies that the quality of dairy products, particularly in the cheese-making industry, could be affected too. It is essential to consider the correct parameters in animal welfare, which have an influence on dairy products. As Sevi et al. [42] demonstrated, the milk from ewes stocked at 2 m²/head showed a significant increase in milk coagulating properties, avoiding harmful bacteria in the environment and enhancing cheese-making bacteria crucial for the manufacturing process. In addition, Albenzio et al. [57] discovered that the control of housing sanitation and milking procedures is critical to obtain good quality milk and its products. Meanwhile, Monsallier et al. [51] demonstrated the importance of bedding material as a source of beneficial bacteria in ripening for cheese making, with the type of bedding material used for the stables acquiring major significance.

7. Effect of Ventilation on Air Quality

The different ventilation regimens in animal houses have the main objective of maintaining optimum air quality to control environmental contamination. Certain environmental pathogens may be under control to obtain an acceptable quality of the air that the animals breathe [58]. For this reason, a proper ventilation regimen should provide the necessary oxygen for animals, eliminate harmful gases, eliminate excess water vapor, decrease the temperature of the animal houses, eliminate dust and odors, and decrease the concentration of microorganisms. It is important to note that the magnitude of these objectives, in each particular case, depends on the climate, the time of year, the age of the animals, and other factors, such as the surrounding buildings or the breeding shed orientation. Orientation is one of the most influential factors, mainly due to greater or lesser exposure to wind and solar radiation, which affect the exchange of air between the exterior and the interior of the building [39].

On dairy farms, the best ventilation system in animal houses is natural ventilation, which occurs due to the natural phenomena of pressure and differences of temperature between different spaces and between indoor/outdoor farm locations. However, a dynamic ventilation system can sometimes be used, where the air is introduced into or extracted from the livestock houses by fans with a fixed flow rate, although this is not the most suitable system for dairy farms [58]. In the case of dairy farms, it is preferable to use the natural ventilation systems, and even better to keep animals in outdoor enclosures during the day, because it is beneficial for the air quality and animal welfare and, consequently, for the quality of the milk [59].

It has been demonstrated that the wind and its speed, have a great influence on the transport of microorganisms. There are some research projects which focus on the dispersion of bacteria due to wind in different environments [17,20], while other authors describe how the wind influences the dissemination of fungi [60].

The livestock houses are the basis of the health of the farmed animals and must act as the respiratory system of the farm. Ventilation rates and the quality of air delivery and exchange in animal houses are significant factors in animal health and disease protection [61] because adequate ventilation will prevent the accumulation of pathogens, airborne contaminants, and dust inside the building, thus avoiding the transmission of infections in the livestock and their environment. Poor ventilation is responsible for an increase in environmental pollution and exchanges between the animal's body surface and the environment in the livestock houses [35]. In this sense, it is very important to



maintain adequate ventilation rates on the farms, due to the contamination present in this environment. The microbial contamination in the air sometimes reaches concentrations higher than 10^4 ufc/m³ [62], and Sevi et al. [37] recommend less than 250 ufc/m³ to improve animal welfare. In addition, ventilation is essential to maintain the health and production of dairy cattle [63], so it plays a very important role in animal welfare, since it prevents an excessive increase in relative humidity and keeps the levels of harmful gases, dust and particles from the environment under control [64].

As previously mentioned, an important factor that significantly affects the microbial load is the ventilation rate of the installations. There are numerous studies that recommend ventilation rates for each type of farm, such as cattle [65] or sheep [26]. In general, these studies show that a low ventilation regime accompanied by few ventilation cycles results in a lower hygienic–sanitary quality of the milk.

Seasonality is a factor to take into account in the air quality due to the ventilation rates of livestock. During summer, it is necessary to have an average ventilation of around 1700 m³/h per head in dairy cattle [58] and around 65 m³/h per head in dairy sheep or goats [66]. However, in winter, it is better to have a moderate ventilation rate of around 85 m³/h per head for cattle [58] and around 45 m³/h per head for sheep or goats [37]. The importance of ventilation during winter is often underestimated [67]. It has been observed that poor ventilation results in an increase in gasses from the respiratory activity of the animals and an increase in humidity; however, high ventilation results in a high concentration of dust, probably due to a turbulent air regime caused by the high rate of ventilation that keeps the particles suspended in the air for a long time. Inadequate ventilation regimes deteriorate milk quality, and higher levels of somatic cell and mesophilic bacteria are counted [68]. Moreover, it is advisable to use a fan speed of 0.5 m/s in the case of dairy cattle [36], and 2 m/s in the case of small ruminants to sustain the air quality [26,67], and, therefore, improve the quality of the milk.

An increase in the rate of ventilation between the different areas of the farm is negatively correlated with the concentration of microorganisms in the environment. For this reason, the location of the entrances and exits of air in the areas where the animals are resting has a great influence on the concentration and propagation of the microbial contamination of indoor air, as Gustaffson explained [69]. The effects of stocking density are also important in air quality. Hartung [70] claimed that the less volume of air the animals have, the more an appropriate ventilation system is needed in the animal housing.

The wind and the rate of ventilation on the farm is a source of pollution for the dairy industry and its products because it is a determining factor in the dispersion of bacteria [15]. For that reason, the cheese industry may also be affected by poor ventilation on the dairy farm. It is demonstrated that wind is a factor to be taken into account in the cheese-making process, because the renneting properties of milk may be improved by increasing the ventilation rate to 70 m³/h or by increasing the length of ventilation cycles to 60 min in goat farms [26]. In addition, the ventilation rate per head could improve the quality of the milk and, consequently, the cheese-making process.

Adequate preventive measures in the dairy farm environment are the best guarantee to ameliorate the welfare of the animals and to control the influence that the microbial communities have on indoor air quality. Poor air quality on the farm could affect milk hygiene, so there could be important economic and health consequences for farmers, animals, and consumers. For this reason, it is important to establish a series of recommendations to control the parameters in the dairy farm environment, with the objective of maintaining the correct air quality (Table 1).



Table 1. Recommendations in some parameters of the dairy farm environment to proper sanitary environmental conditions and, consequently, improve the quality of the final product.

Air Quality Recommendations	Cow Dairy Farm	Sheep Dairy Farm	Goat Dairy Farm
Ventilation Rate (Winter-Summer)	85–1700 m ³ /h/head [58]	47–65 m ³ /h/head [66,67]	
Stocking density	5 m ² /head [43]	2 m ² /head [42]	
Air space	35–40 m ³ /head [48]	7 m ³ /head [38,71]	
Air velocity	<0.5 m/s [36]	2 m/s [26,66]	
Humidity	55–75% [36]	≤70% [37]	
T ^a (min-max)	−5 °C–22 °C [36]	5 °C–20 °C [37]	
Dust	1.7–3.4 mg/m ³ air [46]	<1.6 mg/m ³ air [37]	
NH ₃	<20 ppm [46]	<10 ppm [37,64]	
CO ₂	<3000 ppm [46]	<2500 ppm [37,64]	
H ₂ S	<0.5 ppm [46]	<2.5 ppm [37,64]	
Bedding material		Straw [51]	

8. Conclusions

Two interrelated factors, such as temperature and humidity, influence environmental contamination and animal welfare, and this effect is more pronounced where the climatology is extreme. The proper choice of a temperature and humidity range for the animals avoids a higher concentration of microorganisms in the dairy environment as well as an exchange of microorganisms between the environment and the animals housed. In areas with extreme weather, several precautions must be taken in the farm design to maintain animal welfare.

Nowadays, it is well known that the design of buildings on a farm is a critical point to avoid pathologies in the animals housed on it because these pathogens could appear in a contaminated environment. The concentration of microorganisms in the environment depends on the space available to the livestock, so it is necessary to establish a series of acceptable values that allow keeping the animals in healthy conditions. In addition, the proper selection of bedding material and the frequent changing of this material helps to maintain the air quality.

Similarly, the environmental conditions in the animals' housing and the milking parlor are some of the main criteria in the design of a farm. Depending on the weather, it is necessary to provide the correct ventilation rate for each type of dairy livestock, as well as the appropriate air velocity within the spaces. Combined with the control of dangerous gases (NH₃, CO₂, and H₂S), dust and particles, these parameters ensure a better air quality on the dairy farm and, thus, improved wellbeing among the livestock.

Taking all the above into consideration, it is necessary to study the dairy farm environment in-depth to investigate the influence that microorganisms have on the health of animals depending on environmental conditions, as well as to establish preventive measures to avoid economic and health consequences.

Author Contributions: Design, Á.R.Q. and R.A.; writing—original draft preparation, Á.R.Q.; revision, S.S. and A.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by project RTA2011-00057-C02-01 of the National Institute of Research and Agrarian and Food Technology (INIA), Government of Spain.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. FAO. Food Outlook. Available online: <http://www.fao.org> (accessed on 15 January 2020).
2. Kapaj, A.; Deci, E. World Milk Production and Socio-Economic Factors Effecting Its Consumption. In *Dairy in Human Health and Disease Across the Lifespan*; Watson, R.R., Collier, R.J., Preedy, V.R., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2017; pp. 107–115.



3. Arias, R.; Jiménez, L.; Oliete, B. Calidad y seguridad de la leche en la producción primaria. Programas de autocontrol en las ganaderías. In *Gestión Sustentable de Empresas Agroalimentarias. Factores Clave de Estrategias Competitivas*; Murillo, G., García, A., Lara, M., Plaza, L., Rodríguez, D., Eds.; Universidad de Quevedo: Quevedo, Ecuador, 2015; pp. 419–436.
4. Regulation, E.C. Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. *Off. J. Eur. Union* **2004**, *30*, 151.
5. Jiménez, L.; Oliete, B.; Pérez-Guzmán, M.D.; Arias, R. Influencia de la estación, tamaño de explotación y asociacionismo en el recuento de microorganismos en leche de tanque de oveja. In Proceedings of the XVI Jornadas sobre Producción Animal AIDA, Zaragoza, Spain, 19–21 May 2015; pp. 585–587.
6. Gonzalo, C.; Carriedo, J.A.; Beneitez, E.; Juárez, M.T.; De La Fuente, L.F.; San Primitivo, F. Short communication: Bulk tank total bacterial count in dairy sheep: Factors of variation and relationship with somatic cell count. *J. Dairy Sci.* **2006**, *89*, 549–552. [[CrossRef](#)]
7. Quigley, L.; O’Sullivan, O.; Beresford, T.P.; Ross, R.P.; Fitzgerald, G.F.; Cotter, P.D. Molecular Approaches to Analysing the Microbial Composition of Raw Milk and Raw Milk Cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *150*, 81–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Kyozaire, J.K.; Veary, C.M.; Petzer, I.M.; Donkin, E.F. Microbiological quality of goat’s milk obtained under different production systems. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* **2005**, *76*, 69–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Arias, C.; Oliete, B.; Seseña, S.; Jiménez, L.; Pérez-Guzmán, M.; Arias, R. Importance of on-farm management practices on lactate-fermenting Clostridium spp. spore contamination of Manchega ewe milk: Determination of risk factors and characterization of Clostridium population. *Small Rumin. Res.* **2013**, *111*, 120–128. [[CrossRef](#)]
10. Quigley, L.; O’Sullivan, O.; Stanton, C.; Beresford, T.P.; Ross, R.P.; Fitzgerald, G.F.; Cotter, P.D. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol. Rev.* **2013**, *37*, 664–698. [[CrossRef](#)]
11. Fischer, W.J.; Schilter, B.; Tritscher, A.M.; Stadler, R.H. Contaminants of Milk and Dairy Products: Contamination Resulting from Farm and Dairy Practices. *Ref. Modul. Food Sci.* **2015**, *1*, 1–13.
12. McAuley, C.M.; McMillan, K.; Moore, S.C.; Fegan, N.; Fox, E.M. Prevalence and characterization of foodborne pathogens from Australian dairy farm environments. *J. Dairy Sci.* **2014**, *97*, 7402–7412. [[CrossRef](#)]
13. Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. *Off. J. Eur. Comm.* **2002**, *L31*, 1–24.
14. Brandl, H.; Fricker-Feer, C.; Ziegler, D.; Mandal, J.; Stephan, R.; Lehner, A. Distribution and identification of culturable airborne microorganisms in a Swiss milk processing facility. *J. Dairy Sci.* **2014**, *97*, 240–246. [[CrossRef](#)]
15. Sanz, S.; Olarte, C.; Martínez-Olarte, R.; Navajas-Benito, E.V.; Alonso, C.A.; Hidalgo-Sanz, S.; Somalo, S.; Torres, C. Airborne dissemination of Escherichia coli in a dairy cattle farm and its environment. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *197*, 40–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Curiel, G.J.; Van Eijk, H.M.J.; Lelieveld, H.L.M. Risk and control of airborne contamination. In *Encyclopedia of Food Microbiology*; Robinson, R.K., Batt, C.A., Patel, P.D., Eds.; Academic Press: London, UK, 2000; pp. 1816–1822.
17. Perez-Martín, F.; Seseña, S.; Fernandez-Gonzalez, M.; Arevalo, M.; Palop, M.L. Microbial communities in air and wine of a winery at two consecutive vintages. *Int. J. Food Microbiol.* **2014**, *190*, 44–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Vacheyrou, M.; Normand, A.C.; Guyot, P.; Cassagne, C.; Piarroux, R.; Bouton, Y. Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *146*, 253–262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Donnelly, C.W. Factors associated with hygienic control and quality of cheeses prepared from raw-milk: A review. *Bull. Int. Dairy Fed.* **2001**, *369*, 16–27.
20. Popescu, S.; Borda, C.; Diugan, E.A. Microbiological air quality in tie-stall dairy barns and some factors that influence it. *Afr. J. Agric. Res.* **2011**, *6*, 6726–6734.
21. Vissers, M.M.M.; Driehuis, F. On-farm hygienic milk production. In *Milk Processing and Quality Management*; Tamime, A.Y., Ed.; Wiley-Blackwell: West Sussex, UK, 2009; pp. 1–22.



22. Vissers, M.M.M.; Driehuis, F.; Te Giffel, M.C.; De Jong, P.; Lankveld, J.M.G. Improving farm management by modeling the contamination of farm tank milk with butyric acid bacteria. *J. Dairy Sci.* **2006**, *89*, 850–858. [[CrossRef](#)]
23. Vissers, M.M.M.; Driehuis, F.; Te Giffel, M.C.; De Jong, P.; Lankveld, J.M.G. Short communication: Quantification of the transmission of microorganisms to milk via dirt attached to the exterior of teats. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90*, 3579–3582. [[CrossRef](#)]
24. Rolesu, S.; Loi, F.; Cappai, S.; Coccollone, A.; Cataldi, M.; Usala, P.; Podda, A.; Deliperi, S.; Oppia, P.; Natale, A.; et al. Description and typology of dairy sheep farm management profiles in Sardinia. *Small Rumin. Res.* **2018**, *164*, 39–47. [[CrossRef](#)]
25. Kure, C.F.; Skaar, I.; Brendehaug, J. Mould contamination in production of semi-hard cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *93*, 41–49. [[CrossRef](#)]
26. Albenzio, M.; Santillo, A.; Caroprese, M.; Marino, R.; Centoducati, P.; Sevi, A. Effect of different ventilation regimens on ewes' milk and Canestrato Pugliese cheese quality in summer. *J. Dairy Res.* **2005**, *72*, 447–455. [[CrossRef](#)]
27. Yattoo, M.I.; Kumar, P.; Dimri, U.; Sharma, M.C. Effects of climate change on animal health and diseases. *Int. J. Livest. Res.* **2012**, *2*, 15–24. [[CrossRef](#)]
28. Marino, R.; Atzori, A.S.; D'Andrea, M.; Iovane, G.; Tralbalza-Marinucci, M.; Rinaldi, L. Climate change: Production performance, health issues, greenhouse gas emissions and mitigation strategies in sheep and goat farming. *Small Rumin. Res.* **2016**, *135*, 50–59. [[CrossRef](#)]
29. Pangloli, P.; Dje, Y.; Ahmed, O.; Doane, C.A.; Oliver, S.P.; Draughon, F.A. Seasonal incidence and molecular characterization of Salmonella from dairy cows, calves, and farm environment. *Foodborne Pathog. Dis.* **2008**, *5*, 87–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Vissers, M.M.M.; Te Giffel, M.C.; Driehuis, F.; De Jong, P.; Lankveld, J.M.G. Minimizing the level of *Bacillus cereus* spores in farm tank milk. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90*, 3286–3293. [[CrossRef](#)]
31. Dungan, R.S.; Leytem, A.B.; Bjorneberg, D.L. Concentrations of airborne endotoxin and microorganisms at a 10,000-cow open-freestall dairy. *J. Anim. Sci.* **2011**, *89*, 3300–3309. [[CrossRef](#)]
32. Karwowska, E. Microbiological air contamination in farming environment. *Pol. J. Environ. Stud.* **2005**, *14*, 445–449.
33. Calamari, L.; Morera, P.; Bani, P.; Minuti, A.; Basiricò, L.; Vitali, A.; Bernabucci, U. Effect of hot season on blood parameters, fecal fermentative parameters, and occurrence of *Clostridium tyrobutyricum* spores in feces of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **2018**, *101*, 4437–4447. [[CrossRef](#)]
34. Adhikari, A.; Sen, M.M.; Gupta-Bhattacharya, S.; Chanda, S. Volumetric assessment of airborne fungi in two sections of a rural indoor dairy cattle shed. *Environ. Int.* **2004**, *29*, 1071–1078. [[CrossRef](#)]
35. Caroprese, M. Sheep housing and welfare. *Small Rumin. Res.* **2008**, *76*, 21–25. [[CrossRef](#)]
36. Bureau, B.T.P.L. *Technique de Promotion Laitière; Le logement du troupeau laitère*; Editions France Agricole: Paris, France, 2001; p. 189.
37. Sevi, A.; Casamassima, D.V.; Pulina, G.; Pazzona, A. Factors of welfare reduction in dairy sheep and goats. *Ital. J. Anim. Sci.* **2009**, *8*, 81–101. [[CrossRef](#)]
38. Sevi, A.; Annicchiarico, G.; Albenzio, M.; Taibi, L.; Muscio, A.; Dell'Aquila, S. Effects of solar radiation and feeding time on behavior, immune response and production of lactating ewes under high ambient temperature. *J. Dairy Sci.* **2001**, *84*, 629–640. [[CrossRef](#)]
39. Núñez, N.; Callejo, A. Condiciones ambientales y bienestar. La ventilación. In *Frisona Española*; CONAFE: Madrid, Spain, 2006; pp. 84–91.
40. Wilson, S.C.; Morrow-Tesch, J.; Straus, D.C.; Cooley, J.D.; Wong, W.C.; Mitlöhner, F.M.; McGlone, J.J. Airborne microbial flora in a cattle feedlot. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 3238–3242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Xiong, Y.; Meng, Q.S.; Gao, J.; Tang, X.F.; Zhang, H.F. Effects of relative humidity on animal health and welfare. *J. Integr. Agric.* **2017**, *16*, 1653–1658. [[CrossRef](#)]
42. Sevi, A.; Massa, S.; Annicchiarico, G.; Aquila, S.D.; Muscio, A. Effect of stocking density on ewes' milk yield, udder health and microenvironment. *J. Dairy Res.* **1999**, *66*, 489–499. [[CrossRef](#)]
43. Jimeno, V. Diseño de alojamientos para vacas lecheras en estabulación libre. In *Curso Para Peritos Tasadores; Agroseguro, S.A.*: Madrid, Spain, 2004.
44. Tang, J.W. The effect of environmental parameters on the survival of airborne infectious agents. *J. R. Soc. Interface* **2009**, *6*, 737–746. [[CrossRef](#)]



45. Pasanen, A.L.; Rautiala, S.; Kasanen, J.P.; Raunio, P.; Rantamäki, J.; Kalliokoski, P. The relationship between measured moisture conditions and fungal concentration in water-damaged building materials. *Indoor Air* **2000**, *10*, 111–120. [[CrossRef](#)]
46. Wathes, C.M. Air and surface hygiene. In *Livestock Housing*; Wathes, C.M., Charles, D.R., Eds.; CAB International: Wallingford, UK, 1994; pp. 123–148.
47. Verdier-Metz, I.; Michel, V.; Delbès, C.; Montel, M.C. Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food Microbiol.* **2009**, *26*, 305–310. [[CrossRef](#)]
48. Callejo, A. Alojamiento para vacas lecheras. In *Alojamientos e Instalaciones (II)*; Buxadé, C., Ed.; Mundi-Prensa: Madrid, Spain, 1998; pp. 115–159.
49. Bouton, Y.; Guyot, P.; Vacheyrou, M.; Normand, A.C.; Piarroux, R.; Beuvier, E. Etude des flux bactériens dans les étables de production laitière de Franche-Comté. Exemple des LHF. In Proceedings of the 15ème colloque du Club des Bactéries Lactiques, Rennes, France, 13–15 November 2007.
50. Zdanowicz, M.; Shelford, J.A.; Tucker, C.B.; Weary, D.M.; von Keyserlingk, M.A. Bacterial populations on teat ends of dairy cows housed in free stalls and bedded with either sand or sawdust. *J. Dairy Sci.* **2004**, *87*, 1694–1701. [[CrossRef](#)]
51. Monsallier, F.; Feutry, F.; Bouton, Y.; Convert, T.; Verdier-Metz, I.; Montel, M.C. Are bedding materials a source of useful microorganisms for dairy cow and ewe milk? In Proceedings of the Joint Meeting FAO CIHEAM “Mountain Pastures, Mediterranean Forage Resources and Mountain Cheese” networks, Clermont-Ferrand, France, 24 June 2014.
52. Sevi, A.; Massa, S.; Muscio, A.; Dell’Aquila, S.D.D.; Catalano, S. Litter treatment with bentonite or paraformaldehyde: Effects on air quality and on milk yield of Comisana ewes. *Zootec. Nutr. Anim.* **1998**, *24*, 213–224.
53. Hogan, J.S.; Bogacz, V.L.; Thompson, L.M.; Romig, S.; Schoenberger, P.S.; Weiss, W.P.; Smith, K.L. Bacterial counts associated with sawdust and recycled manure bedding treated with commercial conditioners. *J. Dairy Sci.* **1999**, *82*, 1690–1695. [[CrossRef](#)]
54. Sevi, A.; Taibi, L.; Muscio, A.; Albenzio, M.; Dantone, D.; Dell’Aquila, S. Quality of ewe milk as affected by stocking density and litter treatment with bentonite. *Ital. J. Food Sci.* **2001**, *13*, 77–86.
55. Oliete, B.; Calatayud, M.; García, O.; Arias, C.; Gallego, R.; Arias, R.; Pérez-Guzmán, M.D. Efecto de las condiciones higiénico-sanitarias sobre el recuento de células somáticas y microorganismos totales de la leche de oveja Manchega. In *XXXV Congreso de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia*; SEOC: Valladolid, Spain, 2010; pp. 50–55.
56. Bergonier, D.; De Crémoux, R.; Rupp, R.; Lagriffoul, G.; Berthelot, X. Mastitis of dairy small ruminants. *Vet. Res.* **2003**, *34*, 689–716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Albenzio, M.; Caroprese, M.; Marino, R.; Muscio, A.; Santillo, A.; Sevi, A. Characteristics of Garganica goat milk and Caciocotta cheese. *Small Rumin. Res.* **2006**, *64*, 35–44. [[CrossRef](#)]
58. Callejo, A. Ventilación de alojamientos de vacas de leche. Funciones y diseño. In *Frisona Española 197*; CONAFE: Madrid, Spain, 2013; pp. 106–116.
59. Casamassima, D.; Sevi, A.; Palazzo, M.; Ramacciato, R.; Colella, G.E.; Bellitti, A. Effects of two different housing systems on behaviour, physiology and milk yield of Comisana ewes. *Small Rumin. Res.* **2001**, *41*, 151–161. [[CrossRef](#)]
60. Sen, B.; Asan, A. Fungal flora in indoor and outdoor air of different houses in Tekirdag City (Turkey): Seasonal distribution and relationship with climatic factors. *Environ. Monit. Assess.* **2009**, *151*, 209–219. [[CrossRef](#)]
61. Murphy, D.; Ricci, A.; Auce, Z.; Beechinor, J.G.; Bergendahl, H.; Breathnach, R.; Bureš, J.; Duarte Da Silva, J.P.; Hederová, J.; Hekman, P.; et al. EMA and EFSA Joint Scientific Opinion on measures to reduce the need to use antimicrobial agents in animal husbandry in the European Union, and the resulting impacts on food safety (RONAFA). *EFSA J.* **2017**, *15*, e04666.
62. Bouton, Y. L’environnement des animaux. In *Microflore du Lait cru. Vers Une Meilleure Connaissance des Écosystèmes Microbiens du Lait de Leurs Facteurs de Variation*; Laithier, C., Ed.; CNAOL-RMT Fromages de Terroirs: Lyon, France, 2011; pp. 101–107.
63. Lange, J.L.; Thorne, P.S.; Kullman, G.J. Determinants of Culturable Bioaerosol Concentrations in Dairy Barns. *Ann. Agric. Environ. Med.* **1997**, *4*, 187–194.



64. Sevi, A. Influence of sunlight, temperature and environment on the fatty acid composition and coagulative properties of sheep milk. In *The Future of the Sheep and Goat Dairy Sectors*; Gabina, D., Le Jaouen, J.C., Pirisi, A., Ayerbe, A., Soustre, Y., Eds.; International Dairy Federation: Brussels, Belgium, 2005; pp. 305–311.
65. Lawrence, N.G. Beef cattle housing. In *Livestock Housing*; Wathes, C.M., Charles, D.R., Eds.; CAB International: Wallingford, UK, 1994; pp. 339–357.
66. Sevi, A.; Taibi, L.; Albenzio, M.; Annicchiarico, G.; Marino, R.; Caroprese, M. Influence of ventilation regimen on microenvironment and on ewe welfare and milk yield in summer. *Ital. J. Anim. Sci.* **2003**, *2*, 197–212. [[CrossRef](#)]
67. Sevi, A.; Taibi, L.; Albenzio, M.; Caroprese, M.; Marino, R.; Muscio, A. Ventilation effects on air quality and on the yield and quality of ewe milk in winter. *J. Dairy Sci.* **2003**, *86*, 3881–3890. [[CrossRef](#)]
68. Albenzio, M.; Marino, R.; Caroprese, M.; Santillo, A.; Annicchiarico, G.; Sevi, A. Quality of milk and of Canestrato pugliese cheese from ewes exposed to different ventilation regimens. *J. Dairy Res.* **2004**, *71*, 434–443. [[CrossRef](#)]
69. Gustafsson, G. Investigations of factors Affecting Air Pollutants in Animal Houses. *Ann. Agric. Environ. Med.* **1997**, *4*, 203–215.
70. Hartung, J. Environment and animal health. In *Livestock Housing*; Wathes, C.M., Charles, D.R., Eds.; CAB International: Wallingford, UK, 1994; pp. 25–48.
71. Sevi, A.; Taibi, L.; Albenzio, M.; Annicchiarico, G.; Muscio, A. Airspace effects on the yield and quality of ewe milk. *J. Dairy Sci.* **2001**, *84*, 2632–2640. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



7.3. Artículo 2.



Article

Influence of Environmental and Productive Factors on the Biodiversity of Lactic Acid Bacteria Population from Sheep Milk

Álvaro Rafael Quintana ^{1,*}, José Manuel Perea ², María Llanos Palop ³ and Ramón Arias ¹

¹ Regional Institute of Agrifood and Forestry Research and Development of Castilla-La Mancha (IRIAF), CERSYRA Valdepeñas, 13300 Ciudad Real, Spain; rarias@jccm.es

² Department of Animal Production, University of Córdoba, 14071 Córdoba, Spain; pa2pemuj@uco.es (J.M.P.); pa1gasia@uco.es (A.G.)

³ Department of Analytical Chemistry and Food Technology, Faculty of Environmental Sciences and Biochemistry, University of Castilla-La Mancha, 45071 Toledo, Spain; MariaLlanos.palop@uclm.es

* Correspondence: alvaroq@jccm.es

Received: 11 September 2020; Accepted: 20 November 2020; Published: 22 November 2020



Simple Summary: The dairy sheep sector in Spain is of great importance in the socioeconomic field. For this reason, obtaining quality milk has become a priority objective in the sector. In this context, the environment of dairy farms could affect the microbial communities present in milk, and therefore, the study of lactic acid bacteria (LAB) in this environment could be fundamental for the quality of milk and its dairy products. The objective of this study was to investigate the LAB population present in dairy sheep milk and the possible routes of contamination between the livestock environment and the milk on 12 sheep farms with different livestock practices in Castilla-La Mancha. The results showed that certain agricultural practices favour the presence of LAB in milk in addition to the fact that a significant transference between the livestock environment and bulk tank milk could exist.

Abstract: Milk is a typical and satisfactory medium for the growth of lactic acid bacteria (LAB). These microorganisms are of vital importance in the quality of the milk since they contribute to its preservation and give differential organoleptic properties to the final product. Furthermore, LABs can act as biocontrol agents in the dairy industry by inhibiting the growth of undesirable bacteria present in milk and by improving the quality of dairy products such as cheese. In this context, knowing the transfer routes used by LABs from the livestock environment to the milk is of great importance within the dairy industry. Therefore, the objectives of the present study were to expand the knowledge of the LAB population present in the milk of Manchego ewe by means of DNA sequencing techniques and to evaluate the possible transfers of LAB species based on the management of each dairy farm. Samples of bulk tank milk, air (from the milking parlour and from the livestock housing), animal feed and teat surface (taken from 10 sheep per farm) were collected in 12 traditional livestock farms in Castilla-La Mancha (Spain), where each farm presented differences regarding their farming practices. A mixed-effects model was used to evaluate the effects of livestock practices on the distribution of LAB species. Results showed that the vast majority of species identified in the milk had an isolate that was also found in other matrices, which could indicate a microbial transference via the livestock environment to the milk. In addition, the mixed model showed that the factors that positively influence the LAB count were the low-line milking system and the daily use of acid detergent in cleaning the milking machine.

Keywords: lactic acid bacteria; LAB; dairy farm environment; ewe's milk; farming practices



1. Introduction

The dairy sector in Spain is particularly important, both in the agri-food sector and in the country's social sphere, contributing to the sustenance and development of the rural population. In this sector, 87.7% of the total milk produced comes from cows, 6.3% comes from sheep and 5.9% comes from goats [1]. Despite the fact that sheep milk represents a low percentage in our country, the contribution of Spain to the total European production of this type of milk is relevant. Currently, Spain is the third largest producer of sheep milk in Europe [2], representing 18% of total production. Castilla-La Mancha is an autonomous community in Spain where dairy sheep farming, with the Manchega breed being predominant, has traditionally been defined as a mixed cereal-sheep system, generally with semi-extensive family farms that evolve towards greater development and for which the main objective is the production of milk for the manufacture of cheese with the protected designation of origin "Queso Manchego" [3,4]. A detailed description of the sheep milk production system in this region can be found in Rivas et al. [5]. The most recently published data indicates that, in 2018, there were 547,737 Manchega sheep distributed throughout 665 farms [6].

In that sense, one of the main objectives of the dairy sector is to obtain high-quality milk, thus protecting food safety and providing the industry with milk with the best characteristics for processing [7]. Factors related to the microbiological characteristics in the environment of dairy farms as well as those with an influence on the quality of bulk tank milk could affect the microbial communities in milk [8,9], playing a decisive role in the quality of the milk and that of its dairy products. The routes of transmission of microorganisms from the air to contaminate the milk remain a target in research on dairy farms. The routes of contamination used by microorganisms to alter the microbiota of milk have not been deeply studied in cattle [10], and little is known about small ruminants [11]. In addition, the importance of different factors that affect bulk tank milk quality and environmental quality of dairy farms must be taken into account when considering the existing microbiota in the environment as a tool for improving the quality of milk and its products [12,13]. Adequate environmental hygienic-sanitary conditions could positively influence the microbiological quality of milk by reducing the populations of undesirable bacteria present in the livestock. This is mainly due to the air present in the environment, which is a hostile environment as a habitat for the growth of microorganisms, but it is an important vehicle that contributes to its dispersion in which all kinds of microorganisms and their metabolites can be found [14]. Because of that, it is important to focus on the air quality of livestock facilities as this may be one of the main routes of milk contamination on dairy farms.

The microbiological quality of milk has relevant influence on processed dairy products, particularly in the cheese making process [15]. The microbiota frequently found in milk is made up of a wide variety of bacteria, including lactic acid bacteria (LAB) and other undesirable ones that can pose a health risk, and fungi, capable of interacting, playing a decisive role during the manufacture and maturation of cheese [16,17].

LABs are responsible for the initial fermentation of milk lactose-producing lactic acid, leading to a drop of around 5 in pH which prevents the growth of pathogens in cheese maturation, contributing to food safety [18]. In addition, they carry out another essential function which is the formation of amino acid and ammoniacal nitrogen through the degradation of peptides and the subsequent metabolism of amino acids, playing an important role in degradation of the lactic protein during the manufacturing process. LABs, in addition to contributing to food preservation, improve their sensory characteristics such as taste, smell and texture and increase their nutritional quality [19]. It has even been claimed that they can exert some antimicrobial activity by inhibiting the growth of undesirable bacteria such as staphylococci [15,20]. Additionally, several LAB strains are potential conjugated linoleic acid (CLA) and gamma-aminobutyric acid (GABA) producers and therefore candidate for starter cultures with the capacity to generate bioactive compounds, offering new possibilities for manufacturing functional dairy products [21,22]. For the above reasons, it is essential to know about the LAB population present in the livestock environment and their influence on milk and derived products.



In this context, the objectives of this work are to characterise the population of the dominant LAB species in Manchega sheep's milk and to determine the influence of environmental and productive factors on them. The data collected in this study will provide useful and critical information on the distribution of the dominant species of LAB in the dairy sheep farms of the Manchega breed. Therefore, they should serve as a basis for future decisions on the control of these populations in relation to milk quality.

2. Material and Methods

2.1. Study Design

Twelve herds of this traditional dairy system from Castilla-la Mancha were selected from among those belonging to the National Association of Selected Breeding of Manchego Sheep (AGRAMA), which represents 10% of the AGRAMA Breeding Program farms with different milking and feeding practices. Another criterion applied to the selection of livestock was that they were within a radius of 200 km away from the CERSYRA Lactology Laboratory in Valdepeñas (Ciudad Real) because this would allow for rapid analysis of the samples and would avoid their deterioration. The differences between farms were mainly based on infrastructure, hygienic conditions and type of diet.

The farms were visited 4 times in 2018, during the months of February, May, August and November, and samples of milk; air from the livestock housing; and air from the milking parlour, animal feed and teat surface were taken. During each visit, an air sample was also taken from the room during milking. Another air sample was collected in the livestock housing where the milking sheep rest before milking. During sampling, the orientation and size of the milking parlour and the livestock housing of the milking sheep, the number of openings in each of these buildings, the handling and characteristics of the milking machine, and the environmental conditions were recorded.

Air samples were obtained using the AirPort MD8 sampler (Sartorius Stedim Biotech, Sartorius, Goettingen, Germany), which operates through the filtration and impact method. The sampler was placed at a minimum distance of 1 m above the floor and from the walls or any existing obstacle in the room [23]. In the milking parlour, the sampler was also located near the teat cups. A defined volume of air, 1000 L, was passed through a gelatin membrane filter (Sartorius Stedim Biotech) where airborne bacteria are retained. The filters were then placed directly on the surface of a culture medium suitable for the growth of the LABs in a Petri dish in order to carry out the counts of these bacteria. Two samplings were performed on each occasion, and the gelatin membrane filters were placed in duplicate directly onto Man, Rogosa and Sharpe (MRS) plates and incubated as described later.

In the milking parlour, 10 sheep were randomly selected to take samples from the teat surface (the area that can come in contact with the teat cup) before milking, following the protocol described by Vacheyrou et al. [10]. A sterile wipe moistened with sterile saline solution (NaCl 0.9% *w/v*) was used for the surface for each sheep and was placed in a sterile plastic bag after sampling.

The milk sample was taken from the bulk tank after milking, having stirred and homogenised it for 5 min, using two sterile 50-mL containers.

Finally, during each visit to the farm, a sample of the sheep feed was taken directly from the feeders immediately after dispensing and was placed in a sterile plastic bag.

All samples were transferred to a polystyrene box for transfer to the laboratory under refrigerated conditions at 4 °C. A total of 240 samples (20 per farm) were taken, 48 samples (4 per farm) from each of the following matrices: air from the milking parlour, air from the livestock housing, bulk tank milk, teat surface and animal feed.

Additionally, a survey was conducted with the farmers to collect information about their livestock practices, the estimated number of sheep, milk production, the sanitary conditions of the livestock, general maintenance practices and the feed given to the animals.



2.2. Sample Handling and Microbial Counts

To carry out the LAB analysis on all samples, the Man, Rogosa and Sharpe (MRS) medium (Oxoid) supplemented with 50 mg/L sodium azide and 100 mg/L cycloheximide (Sigma, St. Louis, MO, USA) was used to avoid growth of acetic bacteria and yeasts, respectively [24]. The plates were incubated at 30 °C for 5 days under anaerobic conditions (Thermo Scientific™, Oxoid AnaeroGen™, Basingstoke, UK).

The sterile wipes used for sampling the teat surfaces were placed in 50 mL of saline and mixed in a Stomacher (Masticator, IUL S.A., Barcelona, Spain) for one minute at 1.400 rpm. Serial dilutions in buffered peptone water (1 g/L) (Panreac, Barcelona, Spain) were made from this suspension and plated on the surface of MRS agar plates in duplicate. Ten grams of the animal feed samples were homogenised in 90 mL of sterile saline in a Stomacher for 1 min, and the procedure was the same as that for the teat surface analysis. Milk samples were diluted in sterile saline and plated in duplicate on the surface of MRS agar plates.

After incubation, colonies present on the plates were counted. LAB counts were normalised by transformation into \log_{10} , and the results were expressed as the average number of those counted on each of the plates in the units indicated by Wehr and Frank [25]: \log_{10} CFU per mL in the case of milk samples, \log_{10} CFU per g for animal feed samples, \log_{10} CFU per wipe for teat surface samples and \log_{10} CFU per 1000 L air for air samples.

A representative number (10%) of colonies grown on all the sample plates were randomly picked and propagated until purification on MRS plates. Pure cultures were stored at –80 °C in MRS broth containing 20% (v/v) glycerol (Panreac).

2.3. RAPD-PCR Analysis and Identification of Isolates

Pure cultures were analysed by Randomly Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) according to the procedure described by Ruiz et al. [26]. Genomic DNA extraction was carried out as described by Rodas et al. [27]. The primer M13 (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3'), purchased from Bonsai Technologies Group (Madrid, Spain), was used. Amplification was carried out using a 2400 Perkin Elmer thermal cycler (Perkin Elmer Co., Waltham, MA, USA). Amplified products were resolved by electrophoresis (50 A for 3 h, without cooling) on 1.5% (w/v) agarose in 1 × Tris Borate EDTA (TBE, Tris 89 mM; Boric acid 89 mM; EDTA 2 mM) buffer gels, stained with ethidium bromide and photographed with a Kodak DC290 Digital Camera. A 100-bp ladder (Biotools, Madrid, Spain) was used as a DNA molecular weight marker and as a normalization reference. RAPD-PCR gels were visualized by UV trans-illumination at 254 nm and photographed with a KODAK DC290 Zoom Digital Camera. The patterns were normalized and further processed using the GelCompar version 4.0 pattern analysis software package (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

A reproducibility study to determine the minimum percentage of similarity necessary for pattern discrimination was carried out as reported by Seseña et al. [28] on six isolates and with four iterations of the entire procedure beginning with culture inoculation. Each isolate was grown in four separate cultures from which DNAs were extracted and amplified. The amplification products obtained for two replicates of each isolate were run on one gel, and those for the other two replicates were run on another different gel to estimate gel effects. The level of similarity obtained between repeats, when included within the dendrogram for all isolates, established a discrimination threshold below which patterns were considered different.

The similarity of patterns was expressed by the Pearson correlation coefficient (r), and clustering was performed by the unweighted pair group method using average linkage (UPGMA; Gel Compar, Comparative Analysis of Electrophoresis Patterns, Version 4.0, Applied Maths/Kortrijk) as described by Vauterin and Vauterin [29].

Ten percent of the isolates included in each RAPD-PCR cluster and those with a unique pattern were analysed by MALDI-TOF mass spectrometry by Probisearch S.L. (Fundación Parque Científico de



Madrid, Spain). Identification was defined with 99–100% agreement with species-specific m/z profiles in the database.

2.4. LAB Biodiversity Study

To determine the species richness in each livestock herd, the Simpson biodiversity index was calculated, which takes into account both the number of species present and the relative abundance of each of the LABs found. As species richness and uniformity increases, so does diversity. The following equation was used:

$$D = 1 - \left(\frac{\sum n(n-1)}{N(N-1)} \right), \quad (1)$$

where D is the Simpson diversity index, n is the total number of organisms of a species and N is the total number of organisms of all species in the same environment. The D value ranges from 0 (no diversity) to 1 (infinite diversity).

In addition, the percentage of biodiversity of the species was calculated as the rate between the number of different RAPD-PCR patterns obtained for the isolates of a species and the total number of isolates of the species, where the higher values indicate greater diversity.

2.5. Statistical Analysis

A mixed model (MIXED procedure in SAS version 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was used to examine the factors influencing the variation of \log_{10} LAB in milk (LAB-M) [9]. The model could be expressed as follows:

$$LAB - M = \sum_{i=1}^n \beta_i f_i + \delta, \quad (2)$$

where LAB-M is the \log_{10} of the LAB count in milk, β_i is the unknown parameters to be estimated, f_i is the explanatory variables and δ is the error term. The model was developed following the methodology described in detail by Quintana et al. [11].

The factors evaluated were the following: season (spring, summer, autumn or winter), hygiene of the milking parlour (HygMP: adequate or not), hygiene of the livestock housing (HygLH: adequate or not), milking parlour orientation (OriMP: north–south, east–west, northeast–southwest, northwest–southeast or other), livestock housing orientation (OriLH: north–south, east–west, northeast–southwest, northwest–southeast or other), ventilation of the livestock housing (VentLH: adequate or not), milking parlour cleaning frequency (CleanMP: twice a day, daily or less frequent), milk filter change frequency (filter: for each milking, daily or every other day), milk pipeline height (milkline: mid-line or low-line), contact of the teat cups with the ground (cluster: yes or no), frequency of use of acid to clean the milking machine (acid: daily, every 2–3 days or less frequent), use of silage in sheep feed (silage: yes or no) and use of grain during milking (grain: yes or no). LAB-A1 and LAB-A2 showed a strongly nonnormal distribution, so it was decided to scale them into a categorical variable with two levels (0 = absence of the microorganism; 1 = presence), while LAB-F and LAB-T were analysed as continuous factors. The conditions used to determine adequate ventilation and adequate hygiene have been described in Quintana et al. [11].

3. Results

3.1. Microbial Counts and Identification of LAB Isolates

The presence of microorganisms of special technological interest, such as LAB, was detected in all the matrices analysed. The LAB counts were higher in animal feed samples, followed by milk and teat surface samples, and the matrices with the lowest counts were those of the air from the milking parlour and from the livestock house (Table 1), which indicated facilities with a slightly contaminated environment.



Table 1. Average counts (\log_{10} LAB) in the different samples analysed. Legend: LAB-M = counts of LAB in milk (CFU/mL), LAB-A1 = counts of LAB in the air from the milking parlour (CFU/1000 L), LAB-A2 = counts of LAB in the air from the livestock housing (CFU/1000 L), LAB-F = counts of LAB in the feed (CFU/g) and LAB-T = counts of LAB on the surface of teats (CFU/wipe).

Variable	Mean	Standard Deviation	Coefficient Variation
\log_{10} LAB-M	4.21	0.67	15.84
\log_{10} LAB-A1	0.64	0.84	132.27
\log_{10} LAB-A2	0.84	1.04	123.78
\log_{10} LAB-F	4.50	1.36	30.13
\log_{10} LAB-T	2.91	0.59	20.19

A total number of 703 isolates were obtained from MRS plates from all samples. RAPD-PCR with M13 primer displayed 304 different patterns at an r value $\geq 86\%$, obtained in the reproducibility study (data not shown). MALDI-TOF analysis of isolates from these clusters allowed identification of species of the genera *Lactobacillus* (*Lb.*), *Pediococcus* (*P.*), *Streptococcus* (*S.*), *Lactococcus* (*Lc.*), *Leuconostoc* (*L.*), *Weissella* (*W.*) and *Enterococcus* (*E.*), with an identification probability of 99.9%. In all samples, at least one species from each of these genera was found, with the exception of the genera *Streptococcus* and *Lactococcus*, for which the species were only found in the milk samples and in the milk and air samples of the milking parlour, respectively.

The predominant genus was *Lactobacillus*, with a percentage of 74% of all identified species, while the genus *Pediococcus* accounted for only 8%. *Lb. pentosus/plantarum/paraplantarum* was the most important species identified in the study, representing a total of 32.4% of all species, followed by *Lb. curvatus*, which represented 25% of the total. Other minority species of the *Lactobacillus* genus were *Lb. casei/paracasei/rhannosus* (7.5%), *Lb. brevis* (4%), *Lb. fermentum* (3.6%) and *Lb. coryniformis subspp coryniformis* (1.5%). The species of the genus *Pediococcus* found were *P. acidilactici* (4.7%) and *P. pentosaceus* (3.3%).

The *Enterococcus* genus represented 8.8% of all identified species. Within this genus, we found the following species: *E. hirae* (6.7%), *E. faecalis* (0.9%), *E. faecium* (0.7%), *E. casseliflavus* (0.4%) and *E. mundtii* (0.1%).

The *Weissella* genus represented 6.4% of the total with two species identified, *W. confusa* (5.8%) and *W. paramesenteroides* (0.6%), while the *Leuconostoc* genus only represented 1.8% of the total with three identified species: *L. citreum* (1.3%), *L. mesenteroides* (0.4%) and *L. pseudomesenteroides* (0.1%).

Finally, the *Lactococcus* genus represented 0.6% with a species identified only in the milk and air samples from the milking parlour, namely *Lc. Lactis*, while the genus *Streptococcus* with 0.4% is represented by two species, *S. gallolyticus ssp. gallolyticus* (0.3%) and *S. infantarius subspp infantarius* (0.1%), only identified in the milk samples.

The species *Lb. pentosus/plantarum/paraplantarum* was the most representative in 4 of the samples analysed, followed by *Lb. curvatus*, and together always represented more than 50% of the total species present in each sample. *Lb. curvatus* was at the top in terms of percentage of *Lb. pentosus/plantarum/paraplantarum* only in the case of the sample of the teat surfaces. The other species presented high variability in terms of percentages in the different samples. Figure 1 shows percentages of the species of each of the genera identified for each of the matrices analysed.



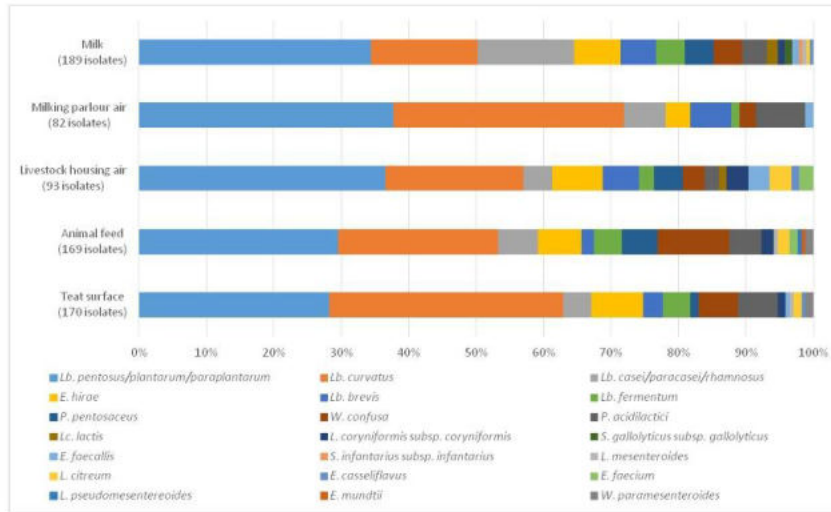


Figure 1. Percentage of each of the species present in the different samples analysed.

From each of the identified species, between 1 and 46 different isolates were found. In spite of RAPD-PCR analysis carried out in this study being considered insufficient to assign isolates to different genotypes, it is interesting to mention that clusters obtained from the UPGMA analysis of the patterns grouped isolates from different matrices, with a high percent similarity, which might support the idea that cross-contamination occurs.

3.2. LAB Biodiversity Study

The biodiversity of species in each livestock, calculated as the Simpson index (D), is shown in Table 2 with values that ranged between 0.71 and 0.85.

Table 2. Simpson index of biodiversity of species on each dairy farm and in each of the matrices: the value ranges from 0 to 1, where 1 represents infinite diversity and 0 represents no diversity.

Simpson's Index	D Value
Farms	
F1	0.827
F2	0.819
F3	0.775
F4	0.714
F5	0.729
F6	0.748
F7	0.852
F8	0.778
F9	0.829
F10	0.759
F11	0.728
F12	0.804
Matrix	
Milk	0.826
Milking parlour air	0.734
Livestock housing air	0.815
Animal feed	0.834
Teat surface	0.787



The highest species richness was found on dairy farm F7 (0.852) with 12 identified species, followed by farms F9 (0.829), F1 (0.827), F2 (0.819) and F12 (0.804) which presented between 11 and 9 species. The other farms showed a D index ranging from 0.700 to 0.800, with F8 (0.778), F3 (0.775), F10 (0.759), F6 (0.748), F5 (0.729), F11 (0.728) and F4 (0.714) being those that presented a smaller number of identified species. Existence of a predominant species, as occurred with *Lb. curvatus* in F4 farm or *Lb. pentosus/plantarum/paraplantarum* in F11 and F5 farms, could explain the lowest D values obtained for these farms. The D values obtained for each of the matrices are also shown in Table 2. The highest value corresponded to animal feed (0.834), followed by milk (0.826). In contrast, the lowest D value was that corresponding to the air in the milking parlour, which in turn corresponded to the least contaminated matrix (0.734).

The percentage of biodiversity of the species ranged between 4% and 100% (Figure 2). The species with the highest biodiversity values were *S. infantarius subsp infantarius*, *L. pseudomesenteroides* and *E. mundtii*, while those that were in the majority, as is the case of *Lb. pentosus/plantarum/paraplantarum* and *Lb. curvatus*, were the ones that presented the lowest percentages (20% and 4% respectively) due to the fact that some isolates were predominant in most of the samples analysed. In general, those species with five or more isolates presented a percentage of biodiversity lower than 50%.

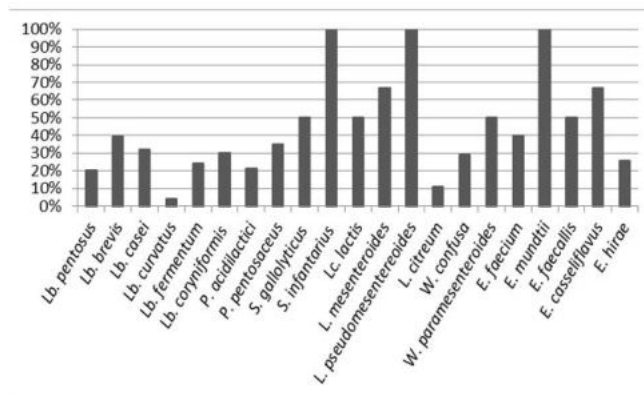


Figure 2. Percentage of biodiversity of the species identified in the analysed samples.

3.3. Factors Related to the Concentration of LAB in Milk

The main characteristics of the farms as collected from the farmers' responses to the questionnaire are shown in Table 3.

Six categorical variables were significantly associated with the concentration LAB in milk ($p < 0.05$): orientation of the milking parlour ($p = 0.026$), frequency of cleaning of the milking parlour ($p = 0.001$), milk pipeline height ($p < 0.001$), frequency of use of acid for cleaning the milking machine ($p < 0.001$), use of silage ($p = 0.041$) and use of grain during milking ($p = 0.030$). The E–W orientation of the milking parlour, cleaning the milking parlour after each milking, the low milking configuration of the milking machine and the daily use of acid for cleaning the milking machine tend to increase the concentration of LAB in the milk, while the use of grain during milking and the use of silage tends to decrease the concentration of LAB in the milk. The bivariate association of LAB-M with LAB-F and LAB-T was explored using Pearson's correlation coefficient, with LAB-T being weakly and positively correlated with LAB-M ($r = 0.417$, $p = 0.003$).



Table 3. Distribution of frequencies obtained by the farmers in the applied questionnaire and bivariate association (ANOVA or *t*-Student test) between the concentration of lactic microbiota in the milk (\log_{10} CFU/mL) and the considered categorical factors. Legend: LAB-A1 = presence of LAB in the air from the milking parlour, LAB-A2 = presence of LAB in the air from the livestock housing, Season = season of the year, HygMP = hygiene of the milking parlour, HygLH = hygiene of the livestock housing, OriMP = orientation of the milking parlour, OriLH = orientation of the livestock housing, VentLH = ventilation of the livestock housing, CleanMP = frequency of cleaning of the milking parlour, Filter = frequency of changing of milk filters, Milkline = milk pipeline height, Cluster = possibility of contact between the teat cups and the ground, Acid = frequency of use of acid for cleaning the milking machine, Silage = use of silage and Grain = use of grain during milking.

Variable	Levels	n (%)	Log ₁₀ LAB-M (Mean ± EE)	p Value
LAB-A1	No	30 (62.5)	4.14 ± 0.12	0.431
	Yes	18 (37.5)	4.31 ± 0.16	
LAB-A2	No	28 (58.3)	4.24 ± 0.14	0.735
	Yes	20 (41.7)	4.17 ± 0.14	
LAB-F	No	0 (0.0)	-	-
	Yes	48 (100.0)	4.21 ± 0.67	
LAB-T	No	0 (0.0)	-	-
	Yes	48 (100.0)	4.21 ± 0.67	
Season	Spring	12 (25.0)	4.47 ± 0.22	0.394
	Summer	12 (25.0)	4.22 ± 0.20	
	Autumn	12 (25.0)	4.01 ± 0.16	
	Winter	12 (25.0)	4.14 ± 0.19	
HygMP	Adequate	35 (72.9)	4.27 ± 0.12	0.380
	Not	13 (27.1)	4.07 ± 0.16	
HygLH	Adequate	35 (72.9)	4.23 ± 0.12	0.787
	Not	13 (27.1)	4.17 ± 0.17	
OriMP	N-S	24 (50.0)	4.16 ± 0.12	0.026
	E-W	8 (16.7)	4.79 ± 0.36	
	NE-SW	8 (16.7)	3.83 ± 0.06	
	NW-SE	8 (16.7)	4.18 ± 0.19	
	Other	4 (8.3)	3.99 ± 0.30	
OriLH	N-S	12 (25.0)	4.13 ± 0.19	0.127
	E-W	16 (33.3)	4.54 ± 0.20	
	NE-SW	8 (16.7)	3.83 ± 0.06	
	NW-SE	8 (16.7)	4.17 ± 0.19	
	Other	4 (8.3)	3.99 ± 0.30	
VentLH	Adequate	24 (50.0)	4.29 ± 0.15	0.414
	Not	24 (50.0)	4.13 ± 0.12	
CleanMP	After each milking	25 (50.0)	4.03 ± 0.11	0.001
	Daily	12 (25.0)	4.79 ± 0.22	
	Less frequently	12 (25.0)	3.98 ± 0.15	
Filter	After each milking	20 (41.7)	4.37 ± 0.18	0.365
	Daily	24 (50.0)	4.11 ± 0.11	
	Every two days	4 (8.3)	4.04 ± 0.10	
Milkline	Mid-level	32 (66.7)	3.99 ± 0.09	< 0.001
	Low-level	16 (33.3)	4.65 ± 0.18	
Cluster	Yes	24 (50.0)	4.18 ± 0.16	0.711
	No	24 (50.0)	4.25 ± 0.10	
Acid	Daily	8 (16.7)	5.06 ± 0.27	< 0.001
	Each 2–3 days	36 (75.0)	4.06 ± 0.09	
	Less frequently	4 (8.3)	3.88 ± 0.08	
Silage	Yes	16 (33.3)	4.49 ± 0.21	0.041
	No	32 (66.7)	4.07 ± 0.09	
Grain	Yes	24 (50.0)	4.42 ± 0.16	0.030
	No	24 (50.0)	4.00 ± 0.08	



Two factors were included in the best fitting model for the concentration of lactic microbiota in milk from Manchega sheep dairy farms (Table 4). Significant factors were the milk pipeline height ($p = 0.001$) and the frequency of use of acid for cleaning the milking machine ($p < 0.001$). The concentration of lactic microbiota in milk increases significantly with the low milkline configuration of the milking machine and the daily use of acid for cleaning the milking machine.

Table 4. Least squares means of the counts of lactic microbiota in milk (\log_{10} CFU/mL) from Manchega dairy sheep farms for factors included in the best fitting mixed model.

Factors	Mean	EE	F Value	p Value
Milkline			11.76	0.001
Mid-level	4.18 ^b	0.11		
Low-level	4.73 ^a	0.15		
Acid			10.68	<0.001
Daily	5.06 ^a	0.18		
Each 2–3 days	4.15 ^b	0.09		
Less frequent	4.15 ^b	0.26		

Means within factors with different letters differ ($p < 0.05$).

The adjusted determination coefficient and the average absolute percentage error reached values of 47.4% and 0.39, respectively. In addition, the variance inflation factor (VIF) of the regression coefficients fluctuated between 1.01 and 1.37, so there is not a multicollinearity problem.

4. Discussion

In this study, the characterisation and study of the transmission between environments of the LAB population in dairy sheep farms was carried out. To do so, innovative bacterial identification techniques such as the MALDI-TOF were used, and appropriate statistical models were applied and parameters were analysed to calculate the biodiversity of the identified species. The presence of LAB in the livestock environment had not been studied in depth until now, especially in the case of dairy sheep. This study not only provides new information on the presence of LAB in dairy sheep farms but also establishes an association between the different matrices studied and the analysed farms.

The results obtained from LAB in milk, with mean counts of 78,187 CFU/mL, were practically the same as those obtained in the study carried out by Jiménez [30] in Manchega sheep and were in agreement with those obtained in other studies in bulk tank sheep's milk [31–33]. Likewise, in the set of matrices analysed, the presence of a total of 21 species belonging to the genera *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* and *Weissella* was revealed, being the most frequently identified in the dairy products, according to the taxonomic criteria of Fox et al. [34]. *Lactobacillus* was the predominant genus in Manchega sheep farming, in accordance with the results of studies carried out on bulk tank milk of other species [35,36]. The genera *Pediococcus*, *Weissella* and *Enterococcus* were important in livestock environments, with the presence of species of the *Enterococcus* genus being notable since they are indicative of milking with hygienic deficiencies [37]. The low percentage of the *Leuconostoc* genus may be a consequence of the nutritional requirements that bacteria of this genus rely on for their growth [38]. Finally, the fact that the *Lactococcus* and *Streptococcus* genera have such a minority representation is surprising and may be due to the fact that the MRS medium used for the counts and/or the incubation conditions used were not the most suitable for their growth and/or due to the PCR biases encountered in such molecular fingerprinting techniques.

The calculation of the Simpson Index allowed for evaluating the richness of the dominant species present in each flock and in each of the studied matrices. The results showed a wide diversity of LAB species in the environment of dairy sheep farms; however, only 5 identified species represented more than 70% of all those found. Nonetheless, it was observed that there is a loss of biodiversity when a species is predominant in the analysed samples, which may be due to the climatic conditions during sampling and to the fact that there are some environments that present unfavourable conditions for



some LAB species. In contrast, a high species richness was observed in the milk and feed samples, which may be due to the fact that they are nutrient-rich environments, favoured by the fact that air and animals are natural transport vehicles for LAB dispersion.

Despite the fact that 57% of the isolates identified belonged to the species *Lb. pentosus/plantarum/paraplantarum* and *Lb. curvatus*, their genetic variability turned out to be quite poor due to the presence of a predominant isolate that seems to present greater dispersal and resistance capacity. The same behaviour was observed for *Lb. casei/paracasei/rhamnosus*, *E. hirae* and *W. confusa* with the presence of a dominant isolate in all the matrices studied. These species seem to be common in the environment of dairy sheep farms, since both *Lb. pentosus/plantarum/paraplantarum* and *Lb. casei/paracasei/rhamnosus* have been detected in sheep's milk [39] and have also been identified in cheeses made from sheep's milk, with the predominance of *Lb. pentosus/plantarum/paraplantarum* determining the characteristics of artisan cheeses due to their high proteolytic and lipolytic activity [37]. In addition, *Lb. pentosus/plantarum/paraplantarum* and *Lb. casei/paracasei/rhamnosus* are possible CLA-producer isolates and *Lb. brevis* is a possible GABA-producer isolate, being potential candidates for the design of starter cultures [22]. *Lb. curvatus*, *E. hirae* and *W. confusa* have also been identified in various studies of cheeses made from sheep's milk [40,41]. It should be noted that a coincidence of isolates has been found both in the matrices analysed and in the different dairy sheep farms studied, which could demonstrate the dispersal capacity of these predominant isolates, linked to the studied geographical area. An extensive use of RAPD PCR (more than one primer) in future research could help to trace the contamination routes of the LAB population in the dairy farm environment. Finally, some species identified in this work such as *E. faecalis*, *Lc. lactis*, *S. gallolyticus* ssp. *gallolyticus* and *S. infantarius* ssp. *infantarius* were also reported in sheep bulk tank milk by other authors using 16S rDNA sequencing [42]; thus, a comparison of molecular approaches can be of help to dairy industry in getting a more accurate view of LAB population in sheep milk regarding quality control programs, food safety and new product development.

The statistical model concluded that the factors influencing the presence of LAB in sheep's milk were milk pipeline height and frequency of use of acid in cleaning of the milking machine. In our study, the low-line milking system contributes to the presence of LAB in bulk tank milk; however, in another similar study of Manchega sheep carried out by Jiménez [30], no significant differences were observed in the LAB levels between low-level milkline and mid-level milkline milking parlours. This could be due to the differences in the air LAB contamination in function of building or parlour height, as probably LAB values will be higher near the floor (most contaminated environment) than at the highest points. This fact would increase milk contamination in low-level milk pipelines, particularly in milking machines with deficient maintenance or with high air consumption in the milk system, both aspects recently evidenced in Spanish milking facilities [9].

In the same way, the daily use of acid in the cleaning routine of the milking machine favours the presence of LAB in the bulk tank milk because intensive cleaning practices in the flocks probably selects for specific more resistant organisms and, at the same time, deteriorates the integrity of milk liners and tubes, favouring bacterial contamination. Maintaining correct hygiene of the milking facilities improves the eradication of undesirable bacteria [30] and preserves a greater bacterial diversity in the milk, obtaining a more balanced profile between desirable and undesirable bacteria [43]. The frequency of the use of acid in washing of the milking machine has recently been studied as a factor that influences the variation of the total mesophilic count [9] and of yeasts [11] in bulk tank sheep's milk. Daily use of acidic detergent could cause further deterioration of the liner material and milk tubes, which could facilitate the proliferation and transmission of LAB.

Besides the main effects, the interaction of the significant factors with season was evaluated, finding no significant effects. However, it is possible that significant interactions exist with other factors but, due to the lack of data in some combinations, they could not be analysed. It could be of interest in future researches to expand the experimental design in order to better evaluate the interactions between factors. However, this type of study is highly conditioned by the economic factor.



5. Conclusions

In this research, the LAB population and the possible routes used by the LAB species present in livestock environments to reach the bulk tank sheep's milk have been investigated in relation to the livestock practices carried out in these environments. Positive relationships have been found between the presence of LAB in milk and in different samples from the dairy farms (air in the milking parlour, air in the livestock housing, animal feed and teat surface) due to the fact that common isolates have been found in them. The predominant genus was *Lactobacillus*, with the species *Lb. pentosus/plantarum/paraplantarum* and *Lb. curvatus* representing more than 50% of all the species found. In addition, a relationship has been found between certain farm practices and the presence of LAB in milk, with the population of LAB being increased when the milking system installed on the dairy farm is low line and when acid detergent is used daily in cleaning the milking machine. This investigation should be completed with another in-depth study that would make it possible to know the potential transfers of LAB from other livestock samples to the milk as well as the transfers of these bacterial populations to cheese and the possible role as a biocontrol agent that some species may have, especially those of the genus *Lactobacillus*. Finally, this study shows that the monitoring/surveillance of the air quality of the milking parlour and the livestock housing by means of air samplers can be a very effective tool in quality control programs for sheep's milk.

Author Contributions: Formal analysis, Á.R.Q. and J.M.P.; investigation, Á.R.Q. and R.A.; methodology, Á.R.Q. and J.M.P.; supervision, M.L.P. and R.A.; writing—original draft, Á.R.Q.; writing—review and editing, Á.R.Q., J.M.P., M.L.P., A.G. and R.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by project RTA2011-00057-C02-01 of the National Institute of Research and Agrarian and Food Technology (INIA), Government of Spain.

Acknowledgments: The authors thank the National Manchega Breeders Association (AGRAMA) for its valuable collaboration in this work.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. FEAGA. Available online: <https://www.fega.es/> (accessed on 11 January 2020).
2. FAOSTAT. Available online: <http://faostat.fao.org/beta/en/#home> (accessed on 10 February 2020).
3. Morantes, M.; Dios-Palomares, R.; Peña, M.E.; Rivas, J.; Perea, J.; García, A. Management and productivity of dairy sheep production systems in Castilla-La Mancha, Spain. *Small Rumin. Res.* **2017**, *149*, 62–72. [CrossRef]
4. Rivas, J.; Perea, J.M.; De-Pablos-Heredero, C.; Angón, E.; Barba, C.; García, A. Canonical correlation of technological innovation and performance in sheep's dairy farms: Selection of a set of indicators. *Agric. Syst.* **2019**, *176*. [CrossRef]
5. Rivas-Rangel, J.; Perea, J.; Angón, E.; Barba, C.; Morantes, M.; Dios-Palomares, R.; García, A. Diversity in the Dry Land Mixed System and Viability of Dairy Sheep Farming. *Ital. J. Anim. Sci.* **2015**, *14*, 179–186. [CrossRef]
6. ESROM. Memoria del Esquema de Selección de la Raza Ovina Manchega. 2018. Available online: <http://www.agrama.org/> (accessed on 19 July 2020).
7. Jiménez-Sobrino, L.; Garzón-Sigler, A.; Pérez-Guzmán, M.D.; García-Martínez, A.; Arias-Sánchez, R. Calidad microbiológica diferencial de la leche de oveja procedente de tanque. *Rev. Científica* **2018**, *28*, 11–18.
8. Montel, M.; Beuvier, E.; Hauwuy, A. Pratiques d'élevage, microflore du lait et qualités des produits laitiers. *INRA Prod. Anim.* **2003**, *16*, 279–282. [CrossRef]
9. Gonzalo, C.; Juárez, M.; García-Jimeno, M.; De La Fuente, L. Bulk tank somatic cell count and total bacterial count are affected by target practices and milking machine features in dairy sheep flocks in Castilla y León region, Spain. *Small Rumin. Res.* **2019**, *178*, 22–29. [CrossRef]
10. Vacheyrou, M.; Normand, A.-C.; Guyot, P.; Cassagne, C.; Piarroux, R.; Bouton, Y. Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *146*, 253–262. [CrossRef] [PubMed]



11. Quintana, Á.R.; Muñoz, J.M.P.; García-Béjar, B.; Sobrino, L.J.; Sigler, A.I.G.; Arias, R. Dominant Yeast Community in Raw Sheep's Milk and Potential Transfers of Yeast Species in Relation to Farming Practices. *Animals* **2020**, *10*, 906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. De Garnica, M.; Linage, B.; Carriedo, J.; De La Fuente, L.; García-Jimeno, M.; Santos, J.A.; Gonzalo, C. Relationship among specific bacterial counts and total bacterial and somatic cell counts and factors influencing their variation in ovine bulk tank milk. *J. Dairy Sci.* **2013**, *96*, 1021–1029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Quintana, Á.R.; Seseña, S.; Sigler, A.I.G.; Arias, R. Factors Affecting Levels of Airborne Bacteria in Dairy Farms: A Review. *Animals* **2020**, *10*, 526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Sanz, S.; Olarte, C.; Martínez-Olarte, R.; Navajas-Benito, E.V.; Alonso, C.A.; Hidalgo-Sanz, S.; Somalo, S.; Torres, C. Airborne dissemination of *Escherichia coli* in a dairy cattle farm and its environment. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *197*, 40–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Montel, M.-C.; Buchin, S.; Mallet, A.; Delbes-Paus, C.; Vuitton, D.A.; Desmasures, N.; Berthier, F. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *Int. J. Food Microbiol.* **2014**, *177*, 136–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Ndoye, B.; Rasolofo, E.A.; Lapointe, G.; Roy, D. A review of the molecular approaches to investigate the diversity and activity of cheese microbiota. *Dairy Sci. Technol.* **2011**, *91*, 495–524. [[CrossRef](#)]
17. Pereira, C.I.; Graça, J.A.; Ogando, N.S.; Gomes, A.M.; Malcata, F.X. Influence of bacterial dynamics upon the final characteristics of model Portuguese traditional cheeses. *Food Microbiol.* **2010**, *27*, 339–346. [[CrossRef](#)]
18. Kongo, J.M. Lactic Acid Bacteria as Starter-Cultures for Cheese Processing: Past, Present and Future Developments. In *Lactic Acid Bacteria—R&D for Food, Health and Livestock Purposes*; InTechOpen: London, UK, 2013; p. 658.
19. Ramírez-Ramírez, J.C.; Rosas Ulloa, P.; Velázquez González, M.Y.; Ulloa, J.A.; Arce Romero, F. Bacterias ácido lácticas: Importancia en Alimentos y su Efectos en la Salud. *Rev. Fuente* **2011**, *2*, 1–16.
20. Carafa, I.; Clementi, F.; Tuohy, K.; Franciosi, E. Microbial evolution of traditional mountain cheese and characterization of early fermentation cocci for selection of autochthonous dairy starter strains. *Food Microbiol.* **2016**, *53*, 94–103. [[CrossRef](#)]
21. Ogawa, J.; Kishino, S.; Ando, A.; Sugimoto, S.; Mihara, K.; Shimizu, S. Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* **2005**, *100*, 355–364. [[CrossRef](#)]
22. Renes, E.; Linares, D.M.; González, L.; Fresno, J.M.; Tomadijo, M.E.; Stanton, C. Production of conjugated linoleic acid and gamma-aminobutyric acid by autochthonous lactic acid bacteria and detection of the genes involved. *J. Funct. Foods* **2017**, *34*, 340–346. [[CrossRef](#)]
23. Napoli, C.; Marcotrigiano, V.; Montagna, M.T. Air sampling procedures to evaluate microbial contamination: A comparison between active and passive methods in operating theatres. *BMC Public Health* **2012**, *12*, 594. [[CrossRef](#)]
24. Pérez-Martín, F.; Seseña, S.; Fernández-González, M.; Arévalo, M.; Palop, M.L. Microbial communities in air and wine of a winery at two consecutive vintages. *Int. J. Food Microbiol.* **2014**, *190*, 44–53. [[CrossRef](#)]
25. Wehr, H.M.; Frank, J.F. *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*, 17th ed.; American Public Health Association: Washington, DC, USA, 2004; pp. 153–186.
26. Ruiz, P.; Izquierdo, P.M.; Seseña, S.; Palop, M.L.; Ruiz, P. Intraspecific genetic diversity of lactic acid bacteria from malolactic fermentation of Cencibel wines as derived from combined analysis of RAPD-PCR and PFGE patterns. *Food Microbiol.* **2008**, *25*, 942–948. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Rodas, A.M.; Ferrer, S.; Pardo, I. 16S-ARDRA, a Tool for Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Grape Must and Wine. *Syst. Appl. Microbiol.* **2003**, *26*, 412–422. [[CrossRef](#)]
28. Seseña, S.; Sánchez, I.; Palop, L. Characterization of *Lactobacillus* strains and monitoring by RAPD-PCR in controlled fermentations of “Almagro” eggplants. *Int. J. Food Microbiol.* **2005**, *104*, 325–335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Vauterin, L.; Vauterin, P. Computer-aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms. *Eur. Microbiol.* **1992**, *1*, 37–41.
30. Jiménez, L. Evaluación de la Calidad Higiénico-Sanitaria y Tecnológica de la Leche de Raza Manchega Como Instrumento para la Mejora de la Viabilidad Socio-Económica y Ambiental de los Sistemas Productivos de Ovino Lechero. Ph.D. Thesis, Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain, 2020.
31. Centi, V.; Matteucci, F.; Lepidi, A.; Del Gallo, M.; Ercole, C. Microbiological and biochemical aspects of inland Pecorino Abruzzese cheese. *Heliyon* **2017**, *3*, e00258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



32. Delavenne, E.; Mounier, J.; Déniel, F.; Barbier, G.; Le Blay, G. Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *155*, 185–190. [[CrossRef](#)]
33. Pérez-Elortondo, F.J.; Albisu, M.; Barcina, Y. Brining time effect on physicochemical and microbiological parameters in Idiazábal cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **1999**, *49*, 139–149. [[CrossRef](#)]
34. Fox, P.F.; Guinee, T.P.; Cogan, T.M.; McSweeney, P.L.H. *Fundamentals of Cheese Science*, 2nd ed.; Springer: New York, NY, USA, 2016; ISBN 9781489976819.
35. Morais, J. Estudio de Adecuación de Cepas Lácticas Autóctonas Aisladas de Leche Cruda de Oveja Guirra para la Elaboración de Queso. Ph.D. Thesis, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, 2004.
36. Del Pozo, B.F.; Gaya, P.; Medina, M.; Rodríguez-Marín, M.A.; Nuñez, M. Changes in the microflora of La Serena ewes' milk cheese during ripening. *J. Dairy Res.* **1988**, *55*, 449–455. [[CrossRef](#)]
37. Medina, R.; Katz, M.; Gonzalez, S.; Oliver, G. Characterization of the Lactic Acid Bacteria in Ewe's Milk and Cheese from Northwest Argentina. *J. Food Prot.* **2001**, *64*, 559–563. [[CrossRef](#)]
38. Garvie, E. Separation of Species of the Genus *Leuconostoc* and Differentiation of the *Leuconostocs* from Other Lactic Acid Bacteria. In *Methods in Microbiology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1984; Volume 16, pp. 147–178.
39. Patil, A.; DiSouza, J.; Pawar, S.H. Shelf life stability of encapsulated lactic acid bacteria isolated from sheep milk thrived in different milk as natural media. *Small Rumin. Res.* **2019**, *170*, 19–25. [[CrossRef](#)]
40. Čanžek, M.A.; Mohar, L.P.; Rogelj, I. Characterization of the *Lactobacillus* community in traditional Karst ewe's cheese. *Int. J. Dairy Technol.* **2007**, *60*, 182–190. [[CrossRef](#)]
41. Mortazavi, A.; Ghandi, A.; Barouei, J.; Moussavi, M. Diversity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Kurdish Ewes' Milk Cheese. *Aust. J. Dairy Technol.* **2007**, *62*, 185–190.
42. De Garnica, M.; Sáez-Nieto, J.; González, R.; Santos, J.A.; Gonzalo, C. Diversity of gram-positive catalase-negative cocci in sheep bulk tank milk by comparative 16S rDNA sequence analysis. *Int. Dairy J.* **2014**, *34*, 142–145. [[CrossRef](#)]
43. Verdier-Metz, L.; Michel, V.; Delbès, C.; Montel, M.-C. Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food Microbiol.* **2009**, *26*, 305–310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



7.4. Artículo 3.



Article

Dominant Yeast Community in Raw Sheep's Milk and Potential Transfers of Yeast Species in Relation to Farming Practices

Álvaro Rafael Quintana ^{1,*}, José Manuel Perea ², Beatriz García-Béjar ³, Lorena Jiménez ¹, Ana Garzón ² and Ramón Arias ¹

¹ Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Forestal de Castilla La Mancha (IRIAF), CERSYRA de Valdepeñas, 13300 Ciudad Real, Spain; ljimenez@quesomancheo.es (L.J.); rarias@jccm.es (R.A.)

² Departamento de Producción Animal, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba, Spain; pa2permuj@uco.es (J.M.P.); pa1gasia@uco.es (A.G.)

³ Departamento de Química Analítica y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias y Tecnologías Químicas, Universidad de Castilla-La Mancha, 13071 Ciudad Real, Spain; Beatriz.GBermejo@uclm.es

* Correspondence: alvaroq@jccm.es

Received: 24 April 2020; Accepted: 20 May 2020; Published: 22 May 2020

Simple Summary: Achieving high-quality milk is a major objective of the dairy sector in Spain, and is particularly important for the agricultural economy of the country. The dairy farm environment can affect the microbial communities in milk, and for this reason the yeast community present in this environment could have an important role in the quality of the milk and in dairy products. The focus of this study was Castilla-La Mancha, Spain. The results showed that milk contamination from the yeast species present in the dairy farm environment is reasonable, and certain farming practices favour the presence of desirable microbiota in milk.

Abstract: Yeasts are always present in any type of cheese, as well as in the factories where it is produced. However, the role of the yeast community in the cheese making process, as well as the routes of contamination used by yeast species to contaminate milk from the dairy farm environment, are not well known. The objectives of this study were to broaden the knowledge of the dominant yeast community in Manchega sheep's milk and to assess the contamination routes of the yeast species depending on the farm practices. Milk, teat surface (collected from ten ewes per farm), feed, and air (collected in milking parlours and livestock housing) samples were collected from 12 typical farms in Castilla-La Mancha, Spain with differences in farming practices, and the yeast species were identified using DNA sequencing methods. To evaluate whether certain farming practices have an effect on the distribution of species of yeast in the milk samples, a mixed model was used. The results showed that most of the dominant yeast species (mainly belonging to the genus *Candida*) found in milk were also found in the other samples, indicating a microbial transfer from the farm environment to the milk. Furthermore, the statistical model showed that factors influencing yeast counts in milk were the presence of yeasts in the milking parlour, the use of silage, and the frequency of acid treatment for cleaning the milking machines. In conclusion, milk contamination from the yeast species present in the dairy farm environment is related to certain farming practices such as the use of silage and the daily use of acid in the cleaning of the milking machines, which favours the presence of desirable microbiota in milk.

Keywords: fungi; dairy farm environment; ewe's milk; farming practices; Manchega breed



1. Introduction

The dairy sheep industry in Spain is particularly important for the agricultural economy of the country, producing around 400,000 tons of milk, which represents 5.7% of the total national milk production. Despite its low national percentage, sheep's milk from Spain accounts for 18% of the total European production. Currently, Spain is the third largest producer of sheep's milk in Europe [1]. Castilla-La Mancha is a Spanish region where sheep farming is traditionally pasture-based [2]. There, a mixed sheep-cereal system has been developed based on the Manchega breed, whose main objective is the production of milk for the manufacture of cheese under the Protected Designation of Origin "Manchego Cheese". An in-depth description of the production system can be found in Rivas et al. [3]. In 2018, there were 547,737 Manchega ewes in milking, distributed among 665 farms [4].

In this context, achieving high-quality milk has become one of the main objectives of the dairy sector, in order to protect food safety, as well as providing the industry with milk in adequate conditions for processing [5]. The dairy farm environment should affect the microbial communities in the milk [6], and for this reason the microorganisms present in this environment and the factors influencing bulk tank milk quality [7] could have an important role in the quality of the milk and in milk products. However, the ability of the airborne microbial community to contaminate the milk remains an ongoing concern, and the sources of contamination for those microorganisms that might affect the natural microbiota of milk have not been studied adequately in dairy cattle [8], and have not been studied at all in small ruminants. Adequately healthy environmental conditions could reduce the level of the microbial communities on the farm. This is mainly due to the air present in the environment, which is the transport vehicle of matter particles and bioaerosols [9]. Although the air is a hostile environment as a habitat for microorganisms, it is important to pay special attention to the quality of this air as one important vehicle for dissemination [10].

The microbiological quality of milk has important repercussions on processed dairy products, in particular in the cheese making process. This microbiota is characterised by the presence of a wide variety of bacteria, yeasts and moulds, which interact to play a decisive role during its manufacture and ripening, improving the final flavour of the cheese and contributing to aroma development [11,12]. However, other undesirable microorganisms could also be present in the milk, increasing the risk for public health [13]. Fungal diversity in the dairy farm environment is relatively unknown compared to bacterial biodiversity [14]. Yeasts are present in any type of cheese as well as in cheese making factories, and while they contribute significantly to ripening, their role in elaboration is not well understood [15]. Certain studies have shown that the dominant yeast species of artisan cheeses mainly belong to the genus *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Pichia* and *Yarrowia* [16–19], although the prevalence of certain species could be influenced by certain cheese varieties [20]. In another similar study of the yeast population in Torta del Casar cheese P.D.O. (Protected Denomination of Origin) [21], it was discovered that the dominant genera were *Pichia*, *Candida* and *Yarrowia*, which play an important role in cheese ripening. It has been demonstrated that the presence of yeasts could have a positive influence on the cheese properties. However, high concentrations of yeast could lead to cheese deterioration and the production of unpleasant odours and flavours [15]. For these reasons, it is important to improve our knowledge about the yeast community present in the dairy farm environment, which could affect the milk and dairy products.

Therefore, the aims of the present work were to study the dominant yeast communities in Manchega ewes' milk and to explore the contamination routes used by those microorganisms in relation to farm facilities and farming practices. The data compiled under this study provide reliable, essential information regarding the distribution and transmission of the dominant species of yeasts on sheep dairy farms. They should, therefore, serve as the basis for decisions regarding the prevention and control of these populations in relation to animal health and milk quality.

2. Materials and Methods

2.1. Population and Study Design



Twelve typical farms with dairy systems representative of the main milking and feeding practices in Castilla-La Mancha were selected from among those belonging to the National Association of Selected Sheep Breeders of the Manchega Breed (AGRAMA). Due to the fact that environmental microorganisms are very labile, the farms had to be less than two hours away from the Dairy Laboratory of CERSYRA in Valdepeñas (Ciudad Real, Spain) for the sampling analysis.

Farmers were asked questions about their milking practices, estimated number of milking ewes, milk production, sanitary conditions of the flock, general management, and animal feeding. In addition, the orientation and size of the milking parlour and the livestock housing, the number of openings in these buildings, the handling and characteristics of the milking machines, and the environmental conditions during milking were referenced during sampling. The differences among farms were mainly in the dairy infrastructure, milking and cleaning protocols, as well as silage use and use of grain during milking.

The farms were visited once every three months during 2018 to take samples of milk, teat surface, feed and air from the livestock housing and the milking parlour. In each sampling, an air sample was collected during milking in the milking parlour. Another air sample was collected in the livestock housing, where the milking ewes were resting before milking. Air samples were collected using the AirPort MD8 air sampler (Sartorius Stedim Biotech, Sartorius, Goettingen, Germany), which operates according to the filtration and impact methods. A defined air volume, 1000 L, was passed through a gelatin membrane filter (Sartorius Stedim Biotech, Sartorius, Goettingen, Germany) where yeasts are retained. Then, the filters were placed directly on a suitable culture medium in a Petri dish to carry out the counts. The air sampler was placed at a distance of at least 1 m above the floor and 1 m away from walls or obstacles [22], and in the case of the milking parlour, the sampler was also placed near the clusters.

During milking, ten ewes were randomly selected and the surface of both their teat was sampled before coming into contact with the cluster, according to the research carried out by Vacheyrou et al. [8]. A sterile wipe was used per ewe, moistened with sterile saline solution (0.9%) and collected in a sterile plastic bag.

Milk was sampled in the bulk tank after milking in two sterile 50 mL containers after at least 5 min of milk homogenization, and transferred into a sterile plastic box stored in a polystyrene refrigerated box for conservation. Lastly, around 150 g of the animal feed was also collected in a sterile plastic bag during each visit to the farm.

A total of 240 samples (48 milking parlour air samples, 48 livestock housing air samples, 48 bulk tank milk samples, 48 teat surface samples and 48 animal feed samples) were taken in order to analyse the yeast community on the farms.

2.2. Sample Handling and Microbial Count

For all the samples analysed, Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) plates (Pronadisa) were selected for yeast counts which were incubated at 25 °C for 48 h. Following Pérez-Martin et al. [23], some biphenyl crystals (approximately 100 mg per plate) (Sigma) were added to the cover plates to avoid the development of moulds. In the case of air samples, the gelatin membrane filters were directly placed in duplicate on YPD plates and incubated.

The sterile wipes used for the teat samples were added to 50 mL of sterile saline solution (0.9%) and were mixed vigorously in a Stomacher (IUL S.A.) for one minute. After that, serial dilutions were carried out and samples were inoculated on agar plates in duplicate. The animal feed samples (10 g) were homogenised with 90 mL of sterile saline solution (0.9%) in a Stomacher, and milk samples did not require any special handling. For sampling inoculation, the same procedure as described for teat samples was carried out.

Milk samples were stored at 4 °C during the 2 h after sampling until analysis, and did not require any special handling. Dilutions were done and 100 microlitres of the liquid was inoculated on the agar medium.

After incubation, colonies were counted and the results were expressed as colony forming units (CFU), given by the average of the numbers obtained in the two repeat samples. Depending on the



samples, the results were expressed in different ways following the indications of Wehr and Frank [24]: in \log_{10} CFU per mL of milk, in \log_{10} CFU per g of animal feed, in \log_{10} CFU per wipe for teat surface and in \log_{10} CFU per 1000 L of air for the air samples.

2.3. Isolation of Yeasts and Typing of Yeast Isolates by RAPD-PCR

A representative number (10%) of colonies grown on all the sample plates were randomly picked and propagated until purification on YPD plates. Pure cultures were stored at -80 °C in YPD broth containing 20% (v/v) glycerol (Panreac).

The cells were harvested by centrifugation (5000 rpm for 5 min) and were washed with sterile 0.9% saline solution. Recovered pellet was immediately treated with a zymolyase solution (10 mg/mL zymolyase 20 T in 1.2 M sorbitol buffer, 40 mM sodium phosphate buffer, pH = 7), as described by Fernandez-Pacheco et al. [25]. After incubation at 37 °C/30 min and 95 °C/5 min, a cell lysate was obtained. RAPD-PCR reaction was accomplished using the M13 primer (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3') performed as described in Fadda et al. [26] with minor modifications using a PCR (Thermal Cyder, Applied Biosystems). The final volume reaction, 20 μ L, contained 0.3 μ L rTaq (5U) DNA polymerase, 0.4 μ L dNTP mix (0.2 mM) (Bioline), 2 μ L buffer (Bioline), 1.2 μ L MgCl₂ (3 mM) (Bioline), 2.5 μ L M13 primer (Metabion International) and 1 μ L of genomic DNA. PCR amplification conditions were as follows: 2 cycles at 94 °C for 1 min, 45 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 40 s, 52 °C for 1 min and 72 °C for 3 min with a final extension step at 72 °C for 10 min. The PCR products were resolved by electrophoresis on 2% agarose gel for 3 h, stained with RedSafe (INtRON Biotech, Seoul, Republic of Korea) and visualised using a gel documentation system (Gel Doc™ XR 170-8171, BioRad, Marnes-la-Coquette, France), where DNA fragment sizes were determined in comparison to the 100-bp DNA ladder (Biotools).

The similarity of patterns was expressed by the Pearson correlation coefficient (*r*), and clustering was performed by the unweighted pair group method using average linkage (UPGMA; Gel Compar, Comparative Analysis of Electrophoresis Patterns, Version 4.0, Applied Maths, Kortrijk, Belgium) as Vauterin and Vauterin [27] described.

A reproducibility study to determine the minimum percentage of similarity necessary for strain discrimination was carried out on six isolates and with four iterations of the entire procedure beginning with culture inoculation. Each isolate was grown in four separate cultures from which DNAs were extracted and amplified. The amplification products obtained for two replicates of each isolate were run on one gel, and those for the other two replicates were run on another different gel to estimate gel effects. The level of similarity (*r*) obtained between repeats, when included within the dendrogram for all strains, established a discrimination threshold below which patterns were considered to be different.

2.4. Identification of Isolates

Based on pattern similarity, 10% of the isolates included in each RAPD group as well as those which had a unique pattern were analysed. A total of 88 representative isolates from the 633 total yeasts were identified by MALDI-TOF using a VITEK MS instrument (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) in the facilities of ProbiSearch (Tres Cantos, Madrid, Spain). Identification was defined as a 99%–100% match to the species-specific *m/z* profiles in the database.

2.5. Biodiversity Study of Yeasts

Simpson's Diversity Index was calculated in order ascertain the richness of species on each farm. This coefficient is calculated based on the number of species present and the relative abundance of each among the total yeasts found. As richness of species and evenness increase, so diversity increases. The following equation was used:

$$D=1 - \left(\frac{\sum n(n-1)}{N(N-1)} \right) \quad (1)$$



where D is the Simpson's Diversity Index; n is the total number of organisms of a species; and N is the total number of organisms of all species in the same environment. The calculated value of D ranges between 0 (no diversity) and 1 (infinite diversity).

Moreover, the biodiversity percentage was calculated with the aim of evaluating the genetic diversity in the species found by comparing the number of strains identified with the number of yeast isolates per species, where higher values indicate higher strain biodiversity.

2.6. Statistical Analysis

Prior to carrying out statistical analyses, yeast counts (YM) were normalised by \log_{10} -transformation. A mixed model (MIXED procedure in SAS version 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC) was used to examine the factors that influence log YM variation [7]. The model could be expressed as:

$$YM = \sum_{i=1}^n \beta_i f_i + \delta \quad (2)$$

Where YM is the \log_{10} of yeast count in milk, β_i are the unknown parameters to be estimated, f_i are the explanatory variables and δ is the error term.

The factors evaluated were the following: presence of yeasts in the air from the milking parlour (YA1: yes or no), presence of yeasts in the air from the livestock housing (YA2: yes or no), presence of yeast on the surface of teat (YT: yes or no), presence of yeast in the feed (YF: yes or no), season (spring, summer, autumn or winter), hygiene of the milking parlour (HygMP: adequate or not), hygiene of the livestock housing (HygLH: adequate or not), orientation of the milking parlour (OriMP: north-south, east-west, northeast-southwest, northwest-southeast, among others) orientation of the livestock housing (OriLH: north-south, east-west, northeast-southwest, northwest-southeast, among others), ventilation of the livestock housing (VentLH: adequate or not), milkline of the milking machine (Milkline: low-level or mid-level system), frequency of cleaning of the milking parlour (CleanMP: daily, twice per day or more), frequency of changing of milk filters (Filter: after each milking, daily or every two days), possibility of contact between the clusters and the ground (Cluster: yes or no), frequency of use of acid for cleaning the milking machine (Acid: daily, each 2–3 days, or less frequently), use of silage (Silage: yes or no) and use of grain during milking (Grain: yes or no). The conditions used to determine the inadequate hygiene of the milking parlour were the presence of airborne dust particles, the presence of litter on the floor and the accumulation of waste; the conditions used to determine a inadequate hygiene in the livestock housing were bad litter management, presence of airborne dust particles and leftover in the feeders; and the conditions used to determine inadequate ventilation in the livestock housing were the presence of ammonia odour and the absence of sufficient windows and doors for providing a good ventilation.

To avoid problems derived from the small sample size (48 complete cases), we used the following analytical sequence [28]. Firstly, the strength of the bivariate association between factors and log YM was quantified performing ANOVA (factors with three or more levels) or Student's t -tests (factors with two levels). Factors significantly associated with log YM ($p < 0.20$) were considered candidate variables to include in the mixed model. Secondly, a manual model-building selection was conducted for the development of the mixed model. All main effects were evaluated as potential predictors. A p -value of <0.05 was used as the retention criterion [29]. As a first step, we compared all the possible models with just one variable using the Akaike Information Criteria (AIC) value. To the model with the lowest AIC value and one predictor, we added all the remaining factors one by one and compared them based on the AIC value. This process was repeated until the model with the lowest AIC was obtained [30]. This was considered the most plausible one, and was selected as the final model. Once the model was defined, the degree of collinearity was analysed using the variance inflation factor (VIF) of the regression coefficients. It was considered that there was a serious multicollinearity problem if any of the VIFs was greater than 10 [31]. The Kolmogorov-Smirnov test was used to verify normality in the distribution of the residues, the Durbin-Watson test to detect the absence of autocorrelation of the residues, and heteroscedasticity was evaluated by the White test.



The model fit was determined by the adjusted coefficient of determination, the mean absolute error and the mean absolute percentage error [32,33].

3. Results

3.1. Identification of Yeasts

A total of 633 isolates from the samples were typed. With a reproducibility between different RAPD-PCR patterns for the same isolate of >86%, 88 representative isolates from all the samples were obtained and identified by MALDI-TOF. With a probability of identification of >99%, these representative isolates belonged to 11 species of genus *Candida*, which was present in all the areas sampled. A representative isolate was identified as *Rhodotorula mucilaginosa* in only one case, having appeared on the teat surface. Several yeast species may not have been detected because of their low counts in samples and/or the PCR biases encountered in such molecular fingerprinting techniques.

The predominant species was *C. parapsilosis*, with a percentage of 57%. This species was identified, and the same genotypes were found in the different areas sampled. The species *C. famata*, *C. krusei* and *C. guilliermondii* were also important, with percentages of 13%, 12% and 6%, respectively, and the same genotypes were found in milk, animal feed and teat surface. Despite the lowest percentage of the other species, *C. kefyr* (3%) established a relationship between the milking parlour, livestock housing and animal feed, because the same genotypes were found in both air and feed. The species identified and the relationships found between the areas are presented in Table 1.

Table 1. Presence (+) or absence (–) of the different species of genetically equal yeasts identified in each kind of sample.

Species	Milk	Milking Parlour Air	Livestock Housing Air	Animal Feed	Teat Surface
<i>Candida inconspicua</i>					
<i>Candida krusei</i>	+	+	–	–	–
<i>Candida guilliermondii</i>	+	–	–	+	+
<i>Candida parapsilosis</i>	+	+	+	+	+
<i>Candida lambica</i>	–	–	–	+	–
<i>Candida holmii</i>	–	–	–	+	–
<i>Candida famata</i>	+	–	+	+	+
<i>Candida catenulata</i>	+	–	–	–	+
<i>Candida rugosa</i>	–	–	–	+	–
<i>Candida zeylanoides</i>	–	–	–	–	+
<i>Candida kefyr</i>	–	+	+	+	–
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	–	–	–	–	+

Overall, the air in the milking parlour and the livestock housing was less contaminated than in other places (Table 2). Air is an important vehicle of dissemination, but it is also a hostile environment as a habitat for microorganisms because they are stressed by the lack of nutrients and by dehydration. However, *C. kefyr* showed a relationship between the air in both buildings on the farm, and *C. inconspicua* established a relationship between the milk and the air in the milking parlour.

Table 2. Average concentration of yeasts in the different samples analysed.

Variable	Mean	Standard Deviation	Coefficient Variation
YM	2147.86	4791.61	223.09
YA1	6.56	27.04	412.00
YA2	8.12	43.64	537.17
YF	79,716.5	104,667	131.30



YT	21.15	57.02	269.55
----	-------	-------	--------

Legend: YM = Yeast in milk (CFU/mL), YA1 = yeasts in the air from the milking parlour (CFU/1000 L), YA2 = yeasts in the air from the livestock housing (CFU/1000 L), YF = yeast in the feed (CFU/g), YT = yeast on the surface of teat (CFU/wipe).

Most of the yeast species in milk, such as *C. famata*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* and *C. krusei*, were also identified in the animal feed and the teat surface, suggesting a link between the feed, teat hygiene and the milk. In addition, *C. catenulata* showed that there is a connection between the milk and the teat surface, a relationship that was already shown by Vissers et al. [34], who claimed that correct management of the farm could reduce the transmission of contamination to the milk.

Finally, the other species only appeared in one sampled area: *C. lambica*, *C. holmii* and *C. rugose* in the feed, and *C. zeylanoides* and *Rh. mucilaginoso* on the teat surface, as indicated in Table 1.

3.2. Biodiversity Study of Yeasts

The biodiversity on each farm was evaluated by calculating Simpson's index (D, between 0 and 1) (Figure 1). D values in the range between 0.5 and 1 were obtained for 8 of the 12 environments studied.

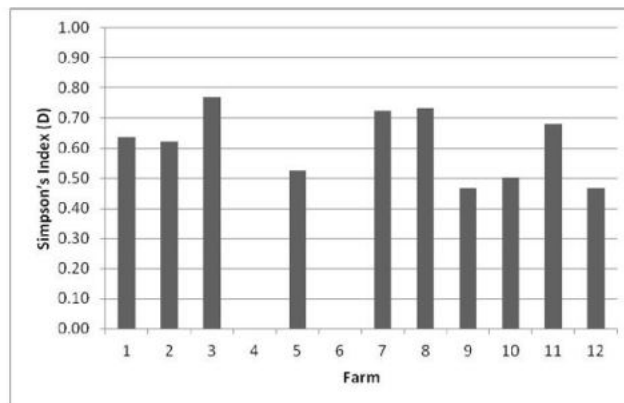


Figure 1. Simpson's Index (D) biodiversity of species present on each farm. The value ranges between 0 and 1, where 1 represents infinite diversity and 0 no diversity.

The greatest richness of species was found on farm F3 (0.769), with seven species identified, followed by farms F8 (0.733) and F7 (0.725), which presented seven and four species, respectively. The other farms which showed a good D index, ranging between 0.500 and 0.700, were F11 (0.682), F1 (0.636) and F2 (0.621), but they presented a smaller number of identified species. However, it was observed that two farms had non-existent diversity owing to the fact that there was a predominant species, i.e., on farms F6 and F4, only *Candida parapsilosis* was isolated from the samples.

Regarding the richness of species per sample (Figure 2), the D index was higher than 0.500 in all of them. The sample that presented the highest value was the teat surface (0.719), followed by the animal feed (0.679). In contrast, the air in the livestock housing showed the lowest D index (0.524). Since transmission of species is easier between samples from the same environment, better biodiversity results were found in the studied samples than on the farms.



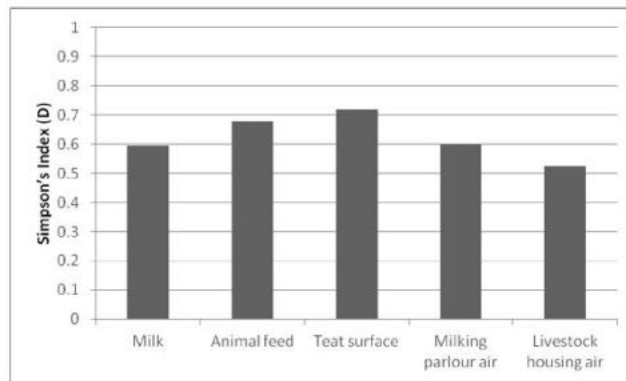


Figure 2. Simpson's Index (D) biodiversity of species present in each sample.

Additionally, an analysis of genetic diversity was carried out by computing the biodiversity percentage of each species. The results are outlined in Figure 3, with values ranging between 0% and 100%.

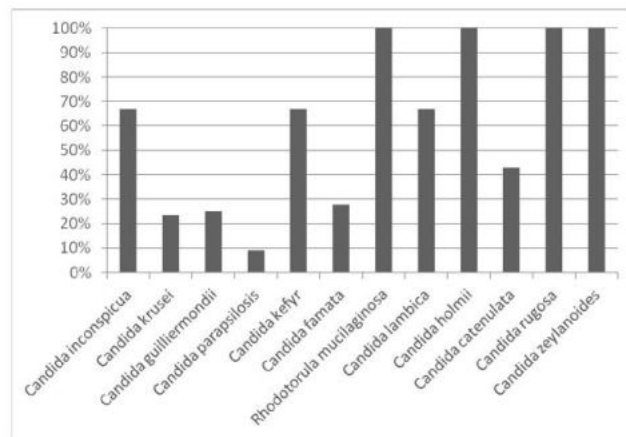


Figure 3. Genetic diversity of each species isolated from Manchega dairy farms environments.

The highest biodiversity was identified in four species (*C. holmii*, *C. rugosa*, *C. zeylanoides* and *Rh. mucilaginosa*). In contrast, the species which presented the greatest number of isolates (*C. parapsilosis*) also showed the smallest genetic diversity (9%) due to the fact that one strain was predominant in most of the samples analysed. In general, those species with five or more isolates exhibited a biodiversity percentage lower than 50%.

3.3. Factors Related to The Concentration of Yeasts in Milk

The main characteristics of the farms as collected from the farmers' responses to the questionnaire are presented in Table 3.



Table 3. Distribution of frequencies obtained by the farmers in the applied questionnaire

Variable	Levels	Frequency (%)
YA1	Yes	44 (91.7)
	No	4 (8.3)
YA2	Yes	44 (91.7)
	No	4 (8.3)
YF	Yes	31 (64.6)
	No	17 (35.4)
YT	Yes	3 (6.3)
	No	45 (93.7)
Season	Spring	12 (25.0)
	Summer	12 (25.0)
	Autumn	12 (25.0)
	Winter	12 (25.0)
HygMP	Adequate	35 (72.9)
	Not	13 (27.1)
HygLH	Adequate	35 (72.9)
	Not	13 (27.1)
OriMP	N-S	24 (50.0)
	E-W	8 (16.7)
	NE-SW	8 (16.7)
	NW-SE	8 (16.7)
OriLH	N-S	12 (25.0)
	E-W	16 (33.3)
	NE-SW	8 (16.7)
	NW-SE	8 (16.7)
VentLH	Adequate	24 (50.0)
	Not	24 (50.0)
Milkline	High	32 (66.7)
	Low	16 (33.3)
CleanMP	After each milking	25 (50.0)
	Daily	12 (25.0)
	Less frequently	12 (25.0)
Filter	After each milking	20 (41.7)
	Daily	24 (50.0)
	Every two days	4 (8.3)
Cluster	Yes	24 (50.0)
	No	24 (50.0)
Acid	Daily	8 (16.7)
	Each 2–3 days	36 (75.0)
	Less frequently	4 (8.3)
Silage	Yes	16 (33.3)
	No	32 (66.7)
Grain	Yes	24 (50.0)
	No	24 (50.0)

Legend: YA1 = presence of yeasts in the air from the milking parlour, YA 2 = presence of yeasts in the air from the livestock housing, YF = presence of yeast in the feed, YT = presence of yeast on the surface of teat, Season = season of the year, HygMP = hygiene of the milking parlour, HygLH = hygiene of the



livestock housing, OriMP = orientation of the milking parlour, OriLH = orientation of the livestock housing, VentLH = ventilation of the livestock housing, Milkline = milkline of the milking machine, CleanMP = frequency of cleaning of the milking parlour, Filter = frequency of changing of milk filters, Cluster = possibility of contact between the clusters and the ground, Acid = frequency of use of acid for cleaning the milking machine, Silage = use of silage, Grain = use of grain during milking.

Factors included in the bivariate analysis are presented in Figure 4. Nine variables (marked in black in Figure 4) were associated with the concentration of yeasts with a P value below 0.20, and were therefore candidate variables for inclusion in the mixed model. Four of them were significantly associated with YM in the bivariate analysis ($p < 0.05$): the milkline of the milking machine ($p = 0.045$), the frequency of cleaning of the milking parlour ($p = 0.016$), the use of silage ($p = 0.035$) and the use of grain during milking ($p = 0.018$). The use of grain, the use of silage, the low milkline configuration and more frequent cleaning of the milking parlour tend to increase the concentration of yeasts in the milk.

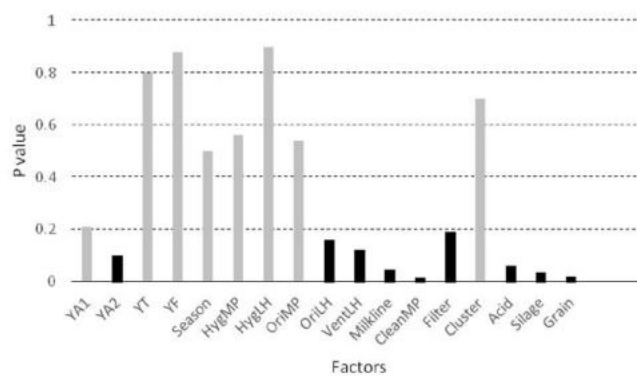


Figure 4. Bivariate association (ANOVA or Student’s t-test) between the concentration of yeasts in the milk (\log_{10} CFU/mL) and the considered factors. Legend: YA1 = presence of yeasts in the air from the milking parlour, YA 2 = presence of yeasts in the air from the livestock housing, YT = presence of yeast on the surface of teat, YF = presence of yeast in the feed, Season = season of the year, HygMP = hygiene of the milking parlour, HygLH = hygiene of the livestock housing, OriMP = orientation of the milking parlour, OriLH = orientation of the livestock housing, VentLH = ventilation of the livestock housing, Milkline = milkline of the milking machine, CleanMP = frequency of cleaning of the milking parlour, Filter = frequency of changing of milk filters, Cluster = possibility of contact between the clusters and the ground, Acid = frequency of use of acid for cleaning the milking machine, Silage = use of silage, Grain = use of grain during milking.

Table 4 shows the results obtained by the best fitting model for YM in milk from Manchega sheep dairy farms. The adjusted determination coefficient and the average absolute percentage error reached values of 40.0% and 0.94, respectively. In addition, the variance inflation factor (VIF) of the regression coefficients fluctuated between 1.03 and 1.33, so there is not a multicollinearity problem.

Table 4. Factors associated with the concentration of yeasts in milk (\log_{10} CFU/mL) from Manchega dairy sheep farms using a mixed model.

Variable	Coefficient	SD	f Value	p Value	VIF
Yeast in livestock housing air (YA2)	-	-	8.63	0.005	1.06
No	-0.94	0.32			



Yes	0.94	0.32			
Silage	-	-	13.30	<0.001	1.33
No	-0.77	0.21			
Yes	0.77	0.21			
Acid	-	-	5.90	0.005	1.03
Daily	1.19	0.35			
Each 2–3 days	0.17	0.31			
Less frequent	-1.36	0.33			

Legend: SD = Standard Error, VIF = Variance Inflation Factor.

Three factors were included in the model: the presence of yeasts in the air in the livestock housing ($p = 0.005$), the frequency of use of acid for cleaning the milking machine ($p = 0.005$) and the use of silage ($p < 0.001$). The concentration of yeasts in the milk increases significantly with the frequency of use of acid for cleaning the milking machine, the use of silage and the presence of yeasts in the air in the livestock housing (Figure 5).

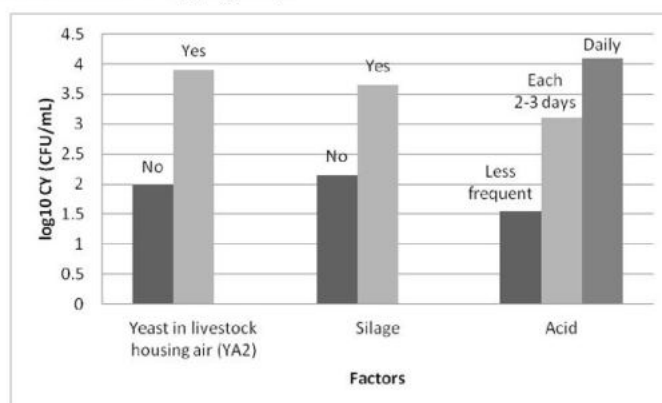


Figure 5. Least square means of the concentration of yeast in milk (\log_{10} CFU/mL) from Manchega sheep dairy farms for factors included in the best fitting mixed model. Means within factors with different colours vary (Student–Newman–Keuls, SNK $p < 0.05$).

4. Discussion

Characterisation and dispersion of yeast communities from sheep farms were carried out in this study using innovative technologies such as MALDI-TOF and by applying statistical models and analysing biodiversity parameters. Yeast presence in farm environments has not been studied as thoroughly as bacterial communities have, especially on sheep farms. This study not only provides new information about yeast contamination on sheep farms, but also establishes a relationship between the different samples and the farms analysed.

The achieved results of yeasts in milk, mean counts of 2155.9 CFU/mL, were in accordance with other previous research [15,35]. The MALDI-TOF technique allowed the determination of a total of 12 species, which mainly belonged to the genus *Candida*. This genus is one of the most resistant in all environments and is normally detected in farm environments, as it can be associated either with the livestock animal microbiome (mucosal tissues, gastrointestinal tract, etc.) or the dairy products [14,36]. The genus *Candida* is present in a wide variety of artisan cheeses [37], being dominant in some, such as Torta del Casar [21]. In this research, *C. parapsilosis* was not only the main species isolated, but it was also associated with all kinds of samples. *C. parapsilosis* has previously been related with dairy products as well as farm animals, so its presence in the environments studied was not



surprising [14,38]. With regard to the other *Candida* species identified, these yeasts (usually opportunistic pathogens) are commonly found in raw milk from different animals and can be highly prevalent if the farm animal is suffering from mastitis [39,40]. They can even cause cases of mastitis in sheep [41], with *Candida* being the main genus involved in fungal mastitis in ruminants [42]. Nevertheless, these species can also carry out fermentation of dairy products or can be related with the ripening process of cheeses [39,43]. *Rh. mucilaginoso* was the only species that did not belong to the genus *Candida*, and other studies have pointed out its relationship with ewes' milk [14].

The Simpson's Index allowed the evaluation of the richness of species on each farm and in each sample studied. The results indicate that a loss of diversity is found when a predominant species exists. This could be due to the fact that some environments can be unfavourable for specific types of yeasts, but also that climatic conditions on the sampling may affect the richness of species [44]. In contrast, samples from different farms turned out to be rich environments not only because of the high nutrient content in certain samples (milk, feed, etc.), but also because other samples are a natural vehicle for yeast dispersion (air, animals, etc.). Despite the fact that *C. parapsilosis* was the most isolated species, its genetic variability proved to be poor due to the presence of a predominant genotype which seems to present the best dispersion and resistance capability. The same behaviour was noticed in *C. krusei*, *C. guillermondii*, *C. famata* and *C. catenulata*, where a prevailing strain was also identified in different examples. However, common genotypes have been isolated both in different samples as well as on different farms which proves the dispersion capability of these strains, linked to the geographical area studied. As is referenced above, these species are commonly associated with the farm animal microbiome, so their transfer from teat to milk can occur easily. Moreover, the presence of common strains on different farms can be explained due to the fact that these strains have also been identified in air, which is a vector of yeast transmission and may be involved in their dispersion [45].

The statistical model showed that the factors that influence the concentration of yeasts in milk are the presence of yeasts in the livestock housing environment, the use of silage and the frequency of acid treatment for cleaning the milking machine. These results suggest that the contamination of yeasts in milk can come mainly from the feed used on the farm, as also happens in the case of bacteria of the genus *Clostridium* [46], with the presence of yeasts in livestock housing playing a relevant role. Some authors have reported a higher number of yeasts when using silage for feeding the animals, usually in winter [47]. This could be due to bad management of the silage, starting the activity of aerobic microorganisms (usually initiated by yeasts), which could produce deterioration in the feed [48]. Similar to the connection from silage to milk, in our research different strains from different species were found in both the air in the livestock housing and in the milk (*C. parapsilosis* and *C. famata*), which reinforces the idea that there is a link between this environment and milk, promoting yeast contamination.

In the same way, the results indicated that correct cleaning of the milking machine could enhance the proliferation of yeasts in the milk. It has been documented that yeasts occur in raw milk in low numbers, probably due to competition for the growth substrates by psychrotrophic bacteria of milk [49]. Maintaining correct hygiene in milking facilities improves the elimination of undesirable bacteria [50] and preserves a wider bacterial diversity in the milk, with a more balanced profile between desirable and undesirable bacteria [51]. Our results showed that the daily use of acid in the milking machines favours the presence of yeasts in milk. The frequency of acid washing was recently studied as a factor influencing bulk tank total bacterial count variation in Spanish dairy sheep flocks [7], and probably a daily use of acid detergent might eventually result in material deterioration of liners and short and long milk tubes, thus facilitating yeast proliferation and contamination, particularly when yeasts are present in the environment. For that reason, promoting good hygiene practices on dairy farms, like surveillance programs in milking equipment, could improve the organoleptic characteristics and the quality of the final product, avoiding high concentrations of undesirable bacteria which could cause unpleasant odours and flavours which are not favourable for dairy products. In addition, knowledge regarding yeast content in the air of the milking parlour is



very interesting, with a view to minimizing iatrogenic contamination of the mammary gland in the moment of antibiotic dry therapy practice.

5. Conclusions

In this study, the contamination routes used by the dominant yeast community to affect ewes' milk were researched in relation to farming practices. Relationships were found between the presence of yeasts in the bulk tank and in the dairy farm environment, because common genotypes were observed in the different areas (milk, milking parlour air, livestock housing air, animal feed and teat surface), with *C. parapsilosis* being the dominant species. In addition, an association between certain farming practices and the presence of yeasts in bulk tank milk were found, increasing the number of yeasts with the presence of yeasts in the livestock housing air, with the use of silage and with the daily use of acid detergents in the milking machines. An exhaustive study of the yeast communities on farms and the farm contamination routes could be recommended, as well as the microbial transfers of yeast community from milk to cheese, in particular the role of genus *Candida* in the quality of cheeses. Increasing the samples from other sources and other production systems may be taken for further studies on farm microbial transfers. Finally, the use of air samplers in analytical surveillance programs of dairy sheep flocks from the dairy industry should be taken into account, in order to monitor the air quality of the milking parlour and livestock housing, which would be very convenient in milk analytical surveillance programs.

Author Contributions: Formal analysis, A.R.Q., J.M.P. and B.G-B; Investigation, A.R.Q. and R.A.; Methodology, A.R.Q., J.M.P. and B.G-B; Supervision, R.A.; Writing—original draft, A.R.Q.; Writing—review & editing, A.R.Q., J.M.P., B.G-B, L.J., A.G and R.A.

Funding: This study was supported by project RTA2011-00057-C02-01 of the National Institute of Research and Agrarian and Food Technology (INIA), Government of Spain.

Acknowledgments: The authors thank the National Manchega Breeders Association (AGRAMA) for its valuable collaboration in this work.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. FAOSTAT. Available online: <http://faostat.fao.org/beta/en/#home> (accessed on 28 May 2019).
2. Rivas, J.; Perea, J.M.; De-Pablos-Heredero, C.; Angón, E.; Barba, C.; García, C. Canonical correlation of technological innovation and performance in sheep's dairy farms: Selection of a set of indicators. *Agric. Syst.*, **2019**, *176*, 102665.
3. Rivas, J.; Perea, J.; Angón, E.; Barba, C.; Morantes, M.; Dios-Palomares, R.; García, A. Diversity in the dry land mixed system and viability of dairy sheep farming. *Ital. J. Anim. Sci.* **2015**, *14*, 179–186.
4. ESROM 2019. Memoria del Esquema de Selección de la raza ovina Manchega. Año 2018. Available online: <http://www.agrama.org/> (accessed on 9 March 2020).
5. Jiménez-Sobrino, L.; Garzón-Sigler, A.; Pérez-Guzmán, M.D.; García-Martínez, A.; Arias-Sánchez, R. Calidad microbiológica diferencial de la leche de oveja procedente de tanque. *Univ. Del Zulia Rev. Cient.* **2018**, *28*, 11–18.
6. Montel, M.C.; Beuvier, E.; Hauwuy, A. Pratiques d'élevage, microflore du lait et qualités des produits laitiers. *Inra Prod. Anim.* **2003**, *16*, 279–282.
7. Gonzalo, C.; Juárez, M.T.; García-Jimeno, M.C.; De La Fuente, L.F. Bulk tank somatic cell count and total bacterial count are affected by target practices and milking machine features in dairy sheep flocks in Castilla y León region, Spain. *Small Rumin. Res.* **2019**, *178*, 22–29.
8. Vacheyrou, M.; Normand, A.C.; Guyot, P.; Cassagne, C.; Piarroux, R.; Bouton, Y. Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *146*, 253–262.
9. Quintana, Á.R.; Seseña, S.; Garzón, A.; Arias, R. Factors Affecting Levels of Airborne Bacteria in Dairy Farms: A Review. *Animals* **2020**, *10*, 526.



10. Sanz, S.; Olarte, C.; Martínez-Olarte, R.; Navajas-Benito, E.V.; Alonso, C.A.; Hidalgo-Sanz, S.; Somalo, S.; Torres, C. Airborne dissemination of *Escherichia coli* in a dairy cattle farm and its environment. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *197*, 40–44.
11. Ndoye, B.; Rasolofo, E.A.; Lapointe, G.; Roy, D. A review of the molecular approaches to investigate the diversity and activity of cheese microbiota. *Dairy Sci Technol.* **2011**, *91*, 495–524.
12. Padilla, B.; Belloch, C.; López-Diez, J.J.; Flores, M.; Manzanares, P. Potential impact of dairy yeasts on the typical flavour of traditional ewes' and goats' cheeses. *Int. Dairy J.* **2014**, *35*, 122–129.
13. Pereira, C.L.; Graça, J.A.; Ogando, N.S.; Gomes, A.M.; Malcata, F.X. Influence of bacterial dynamics upon the final characteristics of model Portuguese traditional cheeses. *Food Microbiol.* **2010**, *27*, 339–346.
14. Delavenne, E.; Mounier, J.; Asmani, K.; Jany, J.L.; Barbier, G.; Le Blay, G. Short communication: Fungal diversity in cow, goat and ewe milk. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *151*, 247–251.
15. Esteban, O.J. Identificación y control de peligros microbiológicos que afectan a la calidad en la elaboración de queso. Doctoral Thesis, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, 2018.
16. Binetti, A.; Carrasco, M.; Reinheimer, J.; Suárez, V. Yeast from autochthonal cheese starters: Technological and functional properties. *J. Appl. Microbiol.* **2013**, *115*, 434–444.
17. Padilla, B.; Manzanares, P.; Belloch, C. Yeast species and genetic heterogeneity within *Debaryomyces hansenii* along the ripening process of traditional ewes' and goats' cheeses. *Food Microbiol.* **2014**, *38*, 160–166.
18. Banjara, N.; Suhr, M.J.; Hallen-Adams, H.E. Diversity of yeast and mold species from a variety of cheese types. *Curr. Microbiol.* **2015**, *70*, 798–800.
19. Ceugniet, A.; Drider, D.; Jacques, P.; Coucheney, F. Yeast diversity in a traditional French cheese “Tomme d'orchies” reveals infrequent and frequent species with associated benefits. *Food Microbiol.* **2015**, *52*, 177–184.
20. Dugat-Bony, E.; Garnier, L.; Denonfoux, J.; Ferreira, S.; Sarthou, A.S.; Bonnarme, P.; Irlinger, F. Highlighting the microbial diversity of 12 French cheese varieties. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *238*, 265–273.
21. Sahelices, C. Estudio de la Población de Levaduras en Quesos de Pasta Blanda de Extremadura. Doctoral Thesis, Universidad de Extremadura, Badajoz, Spain, 2018.
22. Napoli, C.; Marcotrigiano, V.; Montagna, M. Air sampling procedures to evaluate microbial contamination: A comparison between active and passive methods in operating theatres. *BMC Public Health* **2012**, *12*, 594.
23. Perez-Martín, F.; Seseña, S.; Fernandez-Gonzalez, M.; Arevalo, M.; Palop, M.L. Microbial communities in air and wine of a winery at two consecutive vintages. *Int. J. Food Microbiol.* **2014**, *190*, 44–53.
24. Wehr, H.M.; Frank, J.F. *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*, 17th ed.; American Public Health Association: Washington, DC, USA, 2004; pp. 153–186.
25. Fernandez-Pacheco Rodríguez, P.; Arévalo-Villena, M.; Zapparoli Rosa, I.; Briones Pérez, A. Selection of potential non-Sacharomyces probiotic yeasts from food origin by a step-by-step approach. *Food Res. Int.* **2018**, *112*, 143–151.
26. Fadda, M.E.; Mossa, V.; Pisano, M.B.; Deplano, M.; Cosentino, S. Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *95*, 51–59.
27. Vauterin, L.; Vauterin, P. Computer-aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms. *Eur. Microbiol.* **1992**, *1*, 37–41.
28. Molina, L.; Angón, E.; García, A.; Caballero-Villalobos, J.; Giorgis, A.O.; Moralejo, R.H.; Perea, J. A retrospective epidemiological analysis of shared risk factors for bovine trichomoniasis and bovine genital campylobacteriosis in La Pampa province (Argentina). *Prev. Vet. Med.* **2018**, *161*, 109–114.
29. Bursac, Z.; Gauss, C.H.; Williams, D.K.; Hosmer, D.W. Purposeful selection of variables in logistic regression. *Source Code Biol. Med.* **2008**, *3*, 17.
30. Venables, W.N.; Ripley, B.D. *Modern Applied Statistics with S*, 4th ed.; Springer: New York, NY, USA, 2002; p. 498.
31. Alin, A. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics. *Multicollinearity* **2010**, *2*, 370–374.
32. Angón, E.; García, A.; Perea, J.; Acero, R.; Toro-Mújica, P.; Pacheco, H.; González, A. Technical efficiency and viability of grazing dairy cattle systems in La Pampa, Argentina. *Agrociencia* **2013**, *47*, 443–456.
33. Toro-Mújica, P.; García, A.; Gómez-Castro, G.; Acero, R.; Perea, J.; Rodríguez-Estévez, V.; Aguilar, C.; Vera, R. Technical efficiency and viability of organic farming dairy sheep in a traditional area for sheep production in Spain. *Small Rumin. Res.* **2011**, *100*, 89–95.



34. Vissers, M.M.M.; Driehuis, F.; Te Giffel, M.C.; De Jong, P.; Lankveld, J.M.G. Short communication: Quantification of the transmission of microorganisms to milk via dirt attached to the exterior of teats. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90*, 3579–3582.
35. Torkar, K.G.; Vengušt, A. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw milk and cheese in Slovenia. *Food Control*, **2008**, *19*, 570–577.
36. Cabañes, F.J. Yeast pathogens of domestic animals in Ashbee. In *Pathogenic Yeasts. The Yeast Handbook*; Ashbee, H.R.; Bignell, E.M. Eds.; Springer: Berlin, Germany, 2010; pp. 253–279.
37. Wanderley, L.; Bianchin, A.; Teo, C.R.P.A.; Fuentefria, A.M. Occurrence and pathogenicity of *Candida* spp. in unpasteurized cheese. *Rev. Bras. Biocienc.* **2013**, *11*, 145–148.
38. Buehler, A.J.; Evanowski, R.L.; Martin, N.H.; Boor, K.J.; Wiedmann, M. Internal transcribed spacer (ITS) sequencing reveals considerable fungal diversity in dairy products. *J. Dairy Sci.* **2017**, *100*, 8814–8825.
39. Buzzini, P.; Vaughan-Martini, A. Yeast Biodiversity and Biotechnology. In *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook*; Péter, G., Rosa, C. Eds.; Springer: Berlin, Germany, 2006; pp. 533–559.
40. Dworecka-Kaszak, B.; Krutkiewicz, A.; Szopa, D.; Kleczkowski, M.; Bieganska, M. High Prevalence of *Candida* yeast in milk samples from cows suffering from mastitis in Poland. *Sci. World J.* **2012**, *2012*, 1–5.
41. Knuth, R.M.; Stewart, W.C.; Taylor, J.B.; Yeoman, C.J.; Bisha, B.; Page, C.M.; Rowley, C.M.; Lindsey, B.C.; Van Emon, M.L.; Murphy, T.W. Subclinical mastitis in sheep: Etiology and association with milk somatic cell count and ewe productivity in three research flocks in the Western United States. *Transl. Anim. Sci.* **2019**, *3*, 1739–1743.
42. Machado, G.P. Mastitis in small ruminants. *Anim. Husb. Dairy Vet. Sci.* **2018**, *2*, 1–9.
43. Atanassova, M.; Fernández-Otero, C.; Rodríguez-Alonso, P.; Fernández-No, J.I.; Garabal, J.I.; Centeno, J.A. Characterization of yeasts isolated from artisanal short-ripened cows' cheeses produced in Galicia (NW Spain). *Food Microbiol.* **2016**, *53*, 172–181.
44. Yurkov, A.M.; Rohl, O.; Pontes, A.; Carvalho, C.; Maldonado, C.; Sampaio, J.P. Local climatic conditions constrain soil yeast diversity patterns in Mediterranean forests, woodlands and scrub biome. *FEMS Yeast Res.* **2016**, *16*, 1–11.
45. Buzzini, P.; Lachance, M.A.; Yurkov, A. *Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology*; Springer: Heidelberg, Germany, 2017.
46. Arias, C.; Oliete, B.; Sesena, S.; Jimenez, L.; Perez-Guzman, M.D.; Arias, R. Importance of on-farm management practices on lactate-fermenting *Clostridium* spp. spore contamination of Manchega ewe milk: Determination of risk factors and characterization of *Clostridium* population. *Small Rumin. Res.* **2013**, *111*, 120–128.
47. Lopez, C.E.; Ramos, L.L.; Ramadán, S.S.; Bulacio, L.C. Presence of aflatoxin M 1 in milk for human consumption in Argentina. *Food Control.* **2003**, *14*, 31–34.
48. Vissers, M.M.M.; Driehuis, F.; Te Giffel, M.C.; De Jong, P.; Lankveld, J.M.G. Concentrations of Butyric Acid Bacteria Spores in Silage and Relationships with Aerobic Deterioration. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90*, 928–936.
49. Von Neubeck, M.; Baur, C.; Krewinkel, M.; Stoeckel, M.; Kranz, B.; Stressler, T.; Fischer, L.; Hinrichs, J.; Scherer, S.; Wenning, M. Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *211*, 57–65.
50. Jiménez, L. Evaluación de la Calidad Higiénico-Sanitaria Y Tecnológica de la Leche de Raza Manchega Como Instrumento Para la Mejora de la Viabilidad Socio-Económica y Ambiental de Los Sistemas Productivos de Ovino Lechero. Ph.D. Thesis, Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain, 2019.
51. Verdier-Metz, I.; Michel, V.; Delbès, C.; Montel, M.C. Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food Microbiol.* **2009**, *26*, 305–310.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

