

## Leche producida en base a pastos y forrajes: control y caracterización sanitaria de las granjas y marcadores para su autenticación

La producción de leche de vaca en España supone el 4% de la producción europea. Al contrario que en el resto de países productores europeos, el consumo interno en España es mayor que su producción, lo que nos convierte en un país importador de lácteos.

**Sergio Forcada<sup>\*1</sup>, Loubna Abou el Qassim<sup>\*1</sup>, Mario Menéndez<sup>1</sup>, Ana Soldado<sup>2</sup>, Luis J. Royo<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Serida. Área de Nutrición, Pastos y Forrajes.

<sup>2</sup> Dpto. de Química-Física y Analítica. Facultad de Química. Universidad de Oviedo.

\* Ambos autores han contribuido al trabajo de igual manera y merecerían compartir la autoría principal de este artículo.

**E**l 53% de la producción se concentra en la cornisa cantábrica (Galicia, Asturias y Cantabria), siendo Asturias la cuarta Comunidad Autónoma productora a nivel nacional con un 8% del total. En Asturias, el subsector lácteo es el que genera la mayor cifra de negocio del sector regional. La partida de más peso de la industria láctea es la producción de leche fresca para el consumo directo, aunque dentro de los productos fabricados son la leche en polvo y evaporada y los quesos los que más contribuyen a la producción total. Además, es importante tener en cuenta que Asturias posee en su territorio una de las mayores manchas queseras de Europa, con más de veinte variedades oficializadas, cuatro cuentan con denominación de origen protegida (DOP) y una con indicación geográfica protegida (IGP). Junto a la industria quesera tradicional, existe una importante industria de derivados lácteos



Figura 1. Vacas en pastoreo en una granja ecológica en el Concejo de Castropol (Asturias).

(mantequilla, leche en polvo, yogur, postres y otros quesos de elaboración industrial).

En la Cornisa Cantábrica coexisten varios modelos de producción de leche que, si bien son diferentes, comparten determinados rasgos comunes como son, el carácter familiar de las explotaciones y la importancia de la base forrajera propia. Las explotaciones más pequeñas, que constituyen el 60% de las granjas, gestionan el 37% de la superficie agraria útil (SAU) y son responsables del 20% de la producción de leche de la zona norte. En estas explotaciones, el 80% de la SAU está destinada a hierba de prados y praderas siendo el resto cultivos anuales. De ellas más del 85% de las explotaciones utilizan la hierba fresca en la alimentación de las vacas en lactación, fundamentalmente como pastoreo, y algo menos del 75% dependen del ensilado de hierba como principal forraje conservado, con un consumo de concentrado por debajo del 30% de la materia seca (MS) de la ración. Lo más preocupante es la constatación de que estas explotaciones muestran una elevada intención de abandono, y que menos del 20% de las granjas que pretendían abandonar o cuyo titular tenía más de 55 años, tenían la sucesión asegurada (Flores-Calvete y col., 2017). De este hecho,

que abarca la importancia de impedir el abandono de estas tierras y de mantener estos ecosistemas plurianuales, surge el objetivo general de la línea de trabajo que estamos desarrollando en el grupo de investigación de Nutrición y Sanidad Animal (NySA) del Serida: la conservación y valorización de un sistema de producción de leche, basado en el uso de los recursos existentes en zonas con condiciones edafoclimáticas favorables para el crecimiento de hierba y forraje, como es el caso de la Cornisa Cantábrica en general y de Asturias en particular.

En NySA, llevamos trabajando desde hace años en la caracterización y potenciación de la producción de leche en base a recursos propios, es decir en base a pastos y forrajes producidos en la propia explotación, desde dos puntos de vista esenciales:

- a) sobre la granja: concretamente en el control y caracterización sanitaria y ambiental de las granjas
- b) Sobre el producto: buscando marcadores para su autenticación

### CONTROL SANITARIO DE LAS EXPLOTACIONES LECHERAS

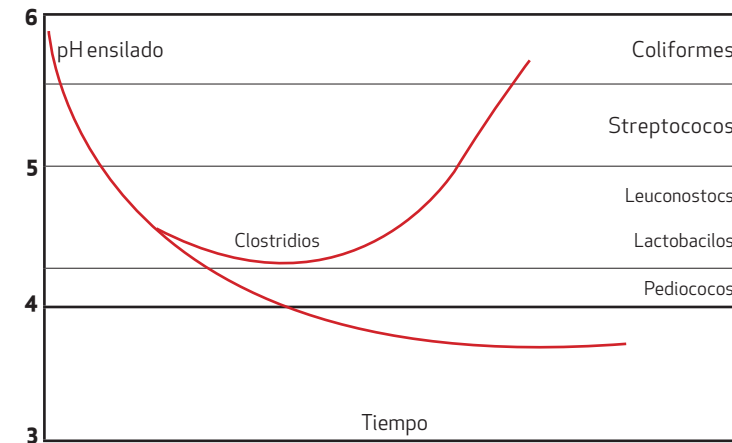
En las últimas dos décadas, la agricultura ha modificado el uso de los recursos naturales

y los factores ligados al medio ambiente. La intensificación del manejo de los suelos, el desarrollo de variedades de cultivos de alto rendimiento en detrimento de variedades locales, el uso de fertilizantes químicos y de pesticidas, han tenido un impacto negativo en los recursos naturales en cuanto al incremento de la erosión y disminución de la fertilidad del suelo, la reducción de la biodiversidad o la contaminación de recursos hídricos, entre otros. Por todo esto, la Unión Europea plantea una agricultura forrajera no agresiva, en la que en las ganaderías se minimice o desaparezca el exceso de excreción de nitrógeno a través de las deyecciones, con el fin último de proteger el medio ambiente.

Para dar respuesta a estos retos que se plantean, en materia de actividad agraria sostenible y seguridad alimentaria, promovidos por la nueva Política Agraria Común (PAC), surge la necesidad de desarrollar herramientas para el control higiénico sanitario de las explotaciones lecheras. En el sistema de gestión ganadero actual, las actuaciones relacionadas con el control de parámetros de contaminación sanitaria tanto de los forrajes como de los recursos orgánicos producidos son muy escasas. Más aún, sólo cuando se observan los efectos sobre la salud animal o humana, se incide en la búsqueda del foco de contaminación (micotoxinas, dioxinas, enterobacterias, etc.). En este sentido, es necesario disponer de procedimientos de análisis que permitan abaratar los costes mediante la realización de análisis más sencillos, rápidos y, si es posible, con sistemas portátiles que permitan el análisis *in situ* en la propia granja.

Una de las tareas en las que se viene trabajando en los últimos años en el grupo NySA es en el desarrollo de herramientas tecnológicas capaces de controlar la presencia de sustancias indeseables y patógenos en alimentos para animales y sus producciones.

Con relación a los patógenos, cabe señalar el riesgo existente de contaminación de las ganaderías a lo largo de la cadena de producción, por medio de microorganismos transmitidos a través de alimentos producidos en la propia granja. Este riesgo puede verse incrementado en función del



**Figura 2.** Cambios en la microflora durante el proceso fermentativo de ensilados (Woolford, 1984).

manejo en las explotaciones a diferentes niveles, desde el tratamiento de los suelos, ensilados mal procesados, pasando por la renovación de las camas y el cuidado de los animales. Como particularidad de las granjas sostenibles de vacuno de leche, el empleo de los residuos orgánicos como el estiércol y purines como fertilizantes de los suelos agrícolas destinados a cultivos forrajeros, acapara la atención como posible foco de contaminación en estas ganaderías.

En lo que respecta a la seguridad alimentaria de los forrajes, existen distintos métodos de conservación como la deshidratación (henificación), congelación y fermentación. Este último, el ensilado, destaca por ser el más eficiente en zonas húmedas como la Cornisa Cantábrica. El objetivo de la conservación de forrajes es la paralización de la vida del vegetal y la de los diversos microorganismos que se desarrollan a costa de sus tejidos, lo que permite obtener un alimento estable y seguro durante largo tiempo (Martínez-Fernández, Argamenteira, & De La Roza, 2014). Esto se consigue mediante una serie fermentaciones acéticas y lácticas en las que están implicados microorganismos como *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus* spp. o *Pediococcus* spp., que consiguen reducir el pH impidiendo la proliferación de otros microorganismos indeseados (**figura 2**).

Los tres principales objetivos que se persiguen con la elaboración de ensilados de hierba y cultivos forrajeros herbáceos son los siguientes (Martínez-Fernández y col., 2014):

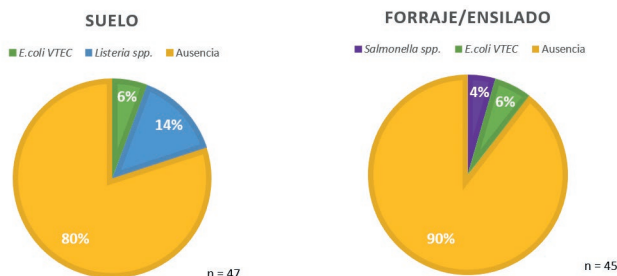
- Extraer el exceso de forraje que se

produce en primavera, debido al rápido crecimiento de este, antes de que éste se embastezca o se comprometa la siembra del cultivo de verano.

- Conservar ese forraje lo mejor posible para utilizarlo como alimento durante el invierno, cuando el crecimiento del mismo sea menor y los animales estén estabulados.
- Conseguir un alimento de "relativamente" bajo coste para el ganadero con un valor alimenticio aceptable para cubrir las necesidades nutritivas de los animales.

Un buen ensilado de estas herbáceas forrajeras es decisivo para prevenir una contaminación biológica por microorganismos patógenos transmitidos por alimentos. Las principales bacterias descritas en granjas lecheras que suponen un riesgo para la salud humana y del animal son *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Campylobacter* spp. (Fox y col., 2018; Olivier y col. 2005). Se trata de bacterias zoonóticas que se transmiten a través de los alimentos y cuya presencia puede llegar a afectar a las ganaderías en diferentes niveles, ya que son capaces de contaminar los forrajes y ensilados de diversas formas. Por ejemplo, las fuentes principales de *L. monocytogenes* son el estiércol y los ensilados mal fermentados. Si la cosecha utilizada para producir ensilados procede de campos contaminados con estiércol mal procesado o sin procesar, puede comenzar un nuevo ciclo de contaminación de los ensilados y liberación del patógeno en las heces de los animales (Santorium, y col., 2012). En ocasiones, las partículas de estiércol

**Figura 3.** Incidencia de microorganismos patógenos en los suelos, forrajes y ensilados de granjas lecheras asturianas.



pueden simplemente llegar a los cultivos por la cercanía de las pilas donde se almacena, o a través de lodos originados por la lluvia o por un riego excesivo. Aunque existen métodos de tratamiento del estiércol como su compostaje, aireado, desecado y otros acondicionamientos, en ocasiones parecen ser insuficientes (Queiroz y col., 2018).

Una vez los patógenos han llegado a los cultivos, pueden infectar al animal directamente a través de la ingesta de los forrajes en fresco, pero también del ensilado si no se realiza correctamente. Las condiciones básicas para obtener un buen ensilado son la ausencia de aire en el interior del silo, un contenido suficiente de azúcares y la rápida disminución del pH del forraje (acidificación), todo ello con el fin de prevenir la proliferación de microorganismos aerobios y las indeseadas fermentaciones de las bacterias *Clostridium*, que aumentan el pH.

Con el fin de evaluar la incidencia de estos patógenos zoonóticos en pequeñas ganaderías asturianas, se analizaron los suelos de los cultivos forrajeros y los insumos de los animales (forrajes y ensilados) en 16 ganaderías a lo largo de tres estaciones distintas con el fin de detectar *Escherichia coli* VTEC, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes* y *Cryptosporidium parvum*. Las muestras, tras su recogida, se incubaron en un medio selectivo durante 24 horas y los microorganismos de interés se detectaron mediante la amplificación de su ADN mediante la técnica PCR. Si bien no se hallaron diferencias significativas entre las tres estaciones del año (otoño, primavera y verano), sí se detectó la presencia de estos microorganismos en los suelos y en los forrajes, como se muestra en la **figura 3**.

La incidencia de microorganismos perjudiciales fue baja (10 %) en el alimento para el ganado. En caso de los suelos de cultivo, la incidencia fue ligeramente superior, lo que es achacable al uso de recursos orgánicos como los fertilizantes. Al igual que sucede en el propio estiércol (Hutchison, y col., 2004), la población predominante en suelo es *Listeria* spp., mientras que las enterobacterias (*E. coli* VTEC), frecuentes en materia fecal, también están presentes.

En caso de los alimentos producidos en la explotación, *E. coli* y *Salmonella* spp. son las dos bacterias detectadas. En concreto, *Salmonella* spp. se ha detectado en muestras de ensilados, posiblemente debido a una fermentación inadecuada en silos expuestos a aire. Como posible solución, algunos autores sugieren la adición de ácido propiónico o ácido acético en cantidad adecuada ya que se emplean también en otros ingredientes de alimento para el ganado (Queiroz, y col., 2018). Cabe señalar la elevada sensibilidad de la técnica PCR a tiempo real, capaz de detectar concentraciones de microorganismos muy bajas, siendo inferiores en muchos casos a las concentraciones a partir de las cuales los microorganismos pueden infectar al animal.

No se ha observado una correlación entre la presencia de microorganismos patógenos en el suelo y su transmisión a los forrajes y ensilados producidos en estas granjas asturianas. En cualquier caso, el número de muestras positivas es demasiado bajo para inferir relaciones estadísticas claras, una evaluación más extensa incluyendo factores de manejo permitiría extraer conclusiones más claras.

## AUTENTIFICACIÓN DE LA LECHE EN BASE A PASTOS Y FORRAJES

Una manera de desarrollar el potencial de los espacios rurales es la combinación de un proceso de identificación territorial con la creación de marcas o etiquetas con las que el territorio se promocio. Los productos territoriales son conceptualizados como una forma de capital cultural con el potencial de brindar un mayor beneficio social y económico a los espacios rurales. Cuando se habla de marcas de calidad diferenciada, es esencial establecer mecanismos de certificación del producto final con su sistema de producción, permitiendo una trazabilidad desde "la granja a la mesa". En los últimos años se está llevando a cabo un enorme esfuerzo en la búsqueda de moléculas que permitan asociar composición de los productos agroalimentarios y alimentación del ganado y, por tanto, permitan la trazabilidad y autenticación de la leche según su sistema de producción u origen geográfico.

La leche es un alimento complejo con alrededor del 88% de agua, donde se encuentran glóbulos grasos emulsionados (3.3% a 4.4%), proteínas suspendidas (2.9% a 3.9%, principalmente caseínas), glúcidos, principalmente lactosa, con un contenido de alrededor de 4,8% y minerales (0,7 a 1,2%). La leche contiene también otros compuestos en concentraciones muy bajas (menos de 100 mg / L), como nucleótidos y material genético, hormonas, alcoholes, cetonas, y vitaminas como la A, D, E, K, y las del grupo B (Akers, 2016; Pardini, 2012). Para producir un litro de leche, se estima que se requieren unos 500 litros de sangre circulando a través de la glándula mamaria para proporcionar los precursores de los componentes de la leche. Una vez llegan a la glándula mamaria, algunos penetran a través de los capilares y pasan de la sangre a la leche sin cambios, como por ejemplo los minerales, algunas hormonas, y las inoglobulinas. Otros en cambio entran a través de transportadores específicos de la célula epitelial. La proporción de estos componentes en la leche depende por una parte de factores relacionados con el animal como la edad, la fase de lactación, la raza, factores genéticos, la salud de la vaca

y factores ambientales como la temperatura, el ordeño, y la alimentación (Akers, 2016).

De todos los componentes de la leche, la grasa es el elemento más variable, teniendo un efecto notable sobre ella, el manejo y la alimentación. Respecto al caso que nos ocupa, el pastoreo normalmente se relaciona con un mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados en la leche (conocidos por su efecto positivo sobre la salud humana) (Martin *et al.*, 2005), lo que en parte se puede explicar asumiendo que, en un sistema extensivo, la energía gastada para caminar es mayor que en los otros sistemas, entonces la mayor movilización de reserva corporal contribuye a un mayor contenido cis9-C18:1 (Kay y col. 2005). Por otra parte, la leche producida por vacas alimentadas con hierba fresca (gramíneas y leguminosas) tiene una relación alta de ácidos grasos insaturados/ ácidos grasos saturados, cuando se compara con vacas alimentadas con ensilado o heno (Kalač y Samková, 2010). Igualmente se ve afectada la proporción de antioxidantes en la leche, y así, las dietas basadas en hierba poseen un mayor contenido de precursores de vitamina A (Daley y col., 2010) y vitamina E (Luciano y col., 2011), ya que los niveles de los pigmentos carotenoides son altos en las hojas verdes (430 a 700 mg / kg de MS para los carotenoides totales, 250 a 415 mg / kg de MS para la luteína) (Prache y col., 2003). Sin embargo, el contenido de antioxidantes disminuye con el secado del forraje y la duración de conservación del mismo (Nozière y col., 2006), y así por ejemplo el ensilado de maíz y la mayoría de los concentrados tienen una baja concentración en estos pigmentos (Prache y Theriez, 1999).

Los perfiles de ácidos grasos y el contenido de antioxidantes en leche pueden ser utilizados como indicadores de la dieta de los animales y del sistema de manejo, puesto que se ha demostrado que estos perfiles cambian dependiendo del manejo del ganado (De la Torre-Santos y col., 2020). Sin embargo, las técnicas de detección y cuantificación de estas moléculas son relativamente costosas. Si decíamos anteriormente que el pastoreo entendido como ejercicio modificaba el perfil de ácidos grasos de la leche, parece que los perfiles de antioxidantes reflejarían más bien la alimentación, sin tomar en cuenta el ejercicio.

En los últimos años se han identificado unas moléculas que juegan un papel fundamental en todos los procesos fisiológicos y patológicos, y que están presentes en todos los fluidos del organismo de animales (Weber y col., 2010), como por ejemplo sangre, leche, orina, por lo que han merecido una gran atención como biomarcadores no invasivos, y se están usando tanto en la medicina forense, como para el diagnóstico, pronóstico e incluso evaluación terapéutica de muchas enfermedades. También se han utilizado en el sector agroalimentario para el control de calidad en productos lácteos, y poniendo un ejemplo concreto para el control del fraude en el etiquetado de la leche en polvo (Izumi y col, 2012).

Nos estamos refiriendo a los microARNs, unas moléculas de ARN de cadena simple y de tamaño corto, de 21 a 25 nucleótidos,

# EFECTIVIDAD COMPROBADA con un solo producto



**COCCI CERO**  
Fitobiótico

PRESENTACIÓN EN SACOS DE 15 Kgs.



- Modula la microbiota del rumen y reduce la emisión de metano a la atmósfera.
- Estimula el sistema inmune y previene de procesos infecciosos (Clostridium) y parásitos (Cryptosporidium y Coccidios).
- Mejora la digestibilidad de la fibra y el almidón.
- Mejora la producción de ácidos grasos volátiles.
- Modula la microbiota ruminal e intestinal salutífera.
- Actúa como repelente de insectos externos.



Agroalimentaria Manchega de Biotecnología, S.L.

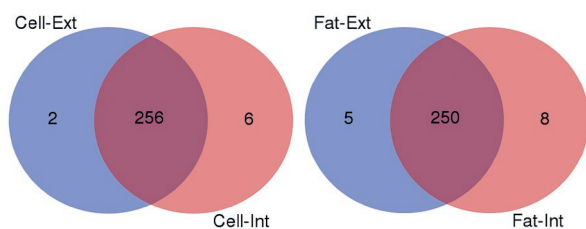
C/ Río Montaña, 5 • Pol. Ind. Sta. M<sup>a</sup> de Benquerencia • 45007 Toledo (España)  
Teléfono: 925 672 642 • info@ambiotecsolutions.com



**FAMI<sup>Q</sup>S**

www.ambiotecsolutions.com





**Figura 4.** Diagramas de Venn donde se representan los microARN detectados por secuenciación, en las diferentes fracciones de la leche estudiadas y según el tipo de sistema de explotación.

que están presentes en eucariotas (aquellas células que tienen su material hereditario fundamental, el ADN, encerrado dentro de una doble membrana o envoltura: algas, protozoos, hongos, plantas, y animales) y que son responsables de la regulación de la expresión de genes (He y Hannon, 2004). Hay dos características principales en estos marcadores que los hacen muy interesantes para nuestro objetivo de diferenciar el sistema de producción en que las vacas están produciendo leche. Primero, se sabe que los perfiles de expresión de estos microARN cambian según, su contexto genético (Billat col., 2019; especie, raza, individuo), pero también según las condiciones ambientales: ejercicio, estado fisiológico, alimentación, estrés (Kosaka y col., 2010b; Weber y col., 2010; Li y col., 2012). En segundo lugar, estas moléculas permanecen estables cuando son sometidas a condiciones adversas, como las altas temperaturas, los ciclos de congelación / descongelación, la digestión de la ARNasa y las condiciones ácidas por ejemplo (Zhang y col., 2012). Todas estas características y el hecho de que se puedan muestrear de forma no invasiva o mínimamente invasiva, los convierten en biomarcadores ideales para la clasificación de la leche según los sistemas de producción de las vacas.

Para buscar marcadores del tipo microARN se secuenciaron tres muestras de leche de tanque de explotaciones extremas, todas de ganado frisón: intensivas con estabulación permanente, y otras tres extensivas con más de 12 horas de pastoreo. Los muestreos se realizaron de leche de tanque durante la primavera, para maximizar las diferencias entre los grupos de ambos sistemas de producción, y en tanques de leche que contuviera un número par de ordeños, para eliminar las posibles diferencias propias del ordeño de mañana o de tarde.

De cada muestra de leche, se extrajo ARN total tanto de la grasa de la leche como de la fracción celular, asumiendo que sus contenidos en microARN son diferentes (Li y col., 2017), y se llevó a cabo la secuenciación para determinar todos los microARN presentes en cada muestra. Como se preveía, los microARN presentes en la fracción celular y grasa presentaron diferencias, y así en la leche de ganaderías intensivas de 275 microARN diferentes encontrados, 18 y 12 resultaron exclusivos de células y de grasa respectivamente, siendo 245 comunes a las dos fracciones. En el caso de la leche de ganaderías extensivas, de 273 microARN diferentes encontrados, 18 y 16 resultaron exclusivos de células y grasa respectivamente, siendo 239 comunes. Pero lo realmente importante fue comprobar cómo dentro de la misma fracción de la leche, había diferencias en los perfiles de expresión de estos microARN según la leche fuera de vacas mantenidas en extensivo o en intensivo. Así por ejemplo en el caso de la fracción celular, de 264 microARN diferentes encontrados, se identificaron dos de expresión exclusiva en extensivo y seis cuya expresión solo se encontraba en leche producida en condiciones intensivas (**figura 4, izquierda**). De forma análoga, de 263 microARN diferentes encontrados en la fracción grasa de la leche, se encontraron ocho exclusivos de las granjas intensivas y cinco exclusivos de granjas extensivas (**figura 4, derecha**).

A partir de los resultados de este trabajo, se puede afirmar que las condiciones en que se explotan las vacas productoras de leche se ven reflejadas en los perfiles de expresión de los microARN, tanto de la fracción celular como de la fracción grasa de la leche de tanque, señalando a estos biomarcadores, como candidatos para el desarrollo de sensores encaminados a detectar y/o cuantificar

su presencia y poder diseñar herramientas de autenticación.

## TRABAJOS FUTUROS

En nuestro afán de caracterizar el sistema de producción de leche en base a pastos forrajes, hemos podido poner de manifiesto que los alimentos que son producidos en la propia explotación son microbiológicamente seguros, afirmación que está vinculada al hecho de que el manejo de la explotación, tanto en lo que respecta al animal como a la producción de alimentos es correcto. Sin embargo, debemos plantearnos la siguiente premisa, si queremos orientar la ganadería hacia la sostenibilidad y fomentar la alimentación con forrajes producidos en la propia explotación, deberíamos proponer la realización de controles periódicos, no sólo de la calidad de los forrajes sino también de la seguridad de los mismos, con el fin de prevenir ulteriores problemas tanto en el animal como en las producciones.

En cuanto a la leche, hemos visto que existen diferencias en la expresión de microARN dependiendo del sistema de producción, señalando este tipo de marcador como diana para la autenticación y trazabilidad de la leche en base a pastos forrajes.

Nuestros próximos trabajos se encaminan al desarrollo de sensores portátiles y de fácil uso tanto para el control de calidad de forrajes, como para la autenticación de la leche producida en base a pastos forrajes y a los productos lácteos derivados. Mientras tanto, estos resultados nos han permitido demostrar que este tipo de producción de leche es segura y de calidad diferenciada, y animar a nuestros ganaderos a seguir en este sistema de producción.

Este trabajo está parcialmente financiado por el Principado de Asturias GRUPINNySA (IDI/2018/000237), cofinanciado con fondos FEDER y RTA2015-00061/AEI/FEDER (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria). Sergio Forcada está financiado por un Contrato Predoctoral FPI-INIA BES-2017-081314. Loubna Abou el Qassim está financiado por un Contrato Predoctoral Severo Ochoa (BPI7-49). ■

