



**TESIS DE GRADO DE LA LICENCIATURA EN  
CIENCIAS BIOLÓGICAS, PROFUNDIZACIÓN EN  
MICROBIOLOGIA**

**Caracterización de cepas proteolíticas de bacterias  
psicrótrofas aisladas de leche cruda bovina  
refrigerada**

Br. Analía Camarotte

Tutora. Dra. Stella Reginensi

Tribunal: Dra. M<sup>a</sup> Eloisa Poey

Dr. Pedro Díaz

Montevideo, octubre 2013





## INDICE

Resumen.....	9
1. Introducción.....	11
1.1 Microflora de la leche cruda.....	10
1.2 Grupos microbianos presentes en la leche cruda.....	12
1.2.1 Bacterias aerobias mesófilas.....	12
1.2.2 Bacterias termodúricas.....	12
1.2.3 Bacterias coliformes.....	13
1.2.4 Bacterias psicrótrofas.....	13
1.3 Generalidades para la identificación y caracterización fenotípica de bacterias.....	14
1.4 Biofilm.....	22
1.5 Aspectos taxonómicos.....	25
1.6 Temperatura de crecimiento.....	26
2. Fuentes de contaminación microbiana de la leche cruda.....	26
2.1 Interior de la glándula mamaria.....	26

2.2 Exterior de la glándula mamaria.....	27
2.3 Contaminación proveniente de la maquina de ordeño.....	27
2.4 Contaminación proveniente del tanque de frio.....	28
2.5 Contaminación proveniente del ordeñador.....	29
2.6 Contaminación proveniente del agua.....	29
2.7 Contaminación proveniente del ambiente.....	30
3. Otros factores que afectan la calidad de la leche.....	31
3.1 Condiciones de almacenamiento en el establecimiento lechero....	32
3.2 Condiciones de transporte.....	32
4. Géneros predominantes de microorganismos en relación a las diferentes estaciones del año.....	33
5. Almacenaje en frio y efecto sobre la flora microbiana.....	34
5.1 Cambios bioquímicos causados por las bacterias psicrótrofas.....	35
5.2 Efecto de la actividad de enzimas proteolíticas y lipolíticas.....	36
6. Métodos de control de la microflora psicrótrofa.....	38
6.1 Tratamiento térmico.....	39
6.2 Activación del sistema lactoperoxidasa.....	40
6.3 Inoculación con <i>Lactococcus lactis</i> .....	41

6.4 Adición de Dióxido de carbono.....	41
6.5 Separación natural de la leche.....	42
7. Objetivos.....	43
7.1 Objetivo general.....	43
7.2 Objetivos específicos.....	43
8. Materiales y métodos.....	44
8.1 Muestras de leche.....	44
8.2 Análisis microbiológico.....	44
8.3 Caracterización fenotípica- pruebas bioquímicas.....	45
8.4 Caracterización genotípica.....	51
8.4.1 Extracción de ADN genómico.....	51
8.4.2 Analisis REP-PCR/ BOXA1R-PCR .....	51
8.4.4 Amplificación del 16S y secuenciación de aislamientos .....	52
9. Resultados.....	54
9.1 Resultados del análisis microbiológico.....	54
9.2 Amplificación REP-PCR.....	56
9.2.1 Amplificación BOX-PCR.....	58

9.3 Secuenciación.....	59
10 Discusión.....	60
11 Conclusiones.....	65
12 Bibliografía.....	67



## RESUMEN

La refrigeración utilizada en el país en los tanque de frío y el efecto de los cambios de temperatura durante el ordeño permiten el crecimiento de microorganismos psicrótrofos. Estas bacterias poseen la capacidad de desarrollarse a temperaturas menores a 7 °C. Si bien estos microorganismos son sensibles a los tratamientos térmicos que se aplican en la industria las enzimas proteolíticas y lipolíticas que secretan son termorresistentes, permaneciendo en los productos elaborados, contribuyendo a su deterioro. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la calidad microbiológica de muestras de leche bovina provenientes de dos formas de almacenamiento: tanque de frío y silo industrial del departamento de San José, durante los meses de otoño-invierno. Además se analizó si existe variación en la presencia de microorganismos según el mes del año en la que procede la muestra. Se observó una distribución desigual de microorganismos mesófilos y psicrótrofos según la procedencia y la época del año en que se obtuvieron las muestras. Se procesaron 24 muestras de leche cruda refrigerada, a las cuales se les realizaron ensayos fenotípicos y genéticos para la identificación de los microorganismos presentes. La microflora psicrótrofa incrementó al transcurrir los meses, obteniéndose el mayor recuento durante el mes de junio, mientras que el recuento de mesófilos aerobios se mantuvo constante durante los meses de abril y mayo, con aumento durante el mes de junio. El promedio obtenido del recuento de

bacterias psicrótrofas y mesófilos aerobios fue de  $4.15 \pm 0.04$  Log UFC/mL (Abril) y  $3.82 \pm 0.02$  Log UFC/mL (Mayo-Junio) respectivamente. Se observó un predominio de bacterias Gram negativas. Las bacterias psicrótrofas predominantes en las muestras de leche analizadas, pertenecieron a los géneros de *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Acinetobacter*. Se destacó la presencia de la especie de *Pseudomona fluorescens* en la leche cruda almacenada en frío. Los análisis genéticos, mediante las técnicas de BOX-PCR y REP-PCR permitieron identificar una alta variabilidad genética dentro de *Pseudomonas fluorescens*.

# 1. INTRODUCCIÓN

## **1.1 Microflora de la leche cruda**

La leche es un medio de alta riqueza para la multiplicación de la mayoría de los microorganismos razón por la que muy susceptible de contaminarse a lo largo de la cadena de producción. Esta posee una microflora mixta que incluye microorganismos patógenos los cuales pueden llegar por rutas directas e indirectas a la leche (Muñoz-Godoy 2004).

La leche es un producto biológico con alta actividad de agua y nutrientes constituyendo un buen medio para el crecimiento de microorganismos, es así que la salida de la leche de la glándula mamaria puede traer presentes microorganismos que condicionan su posterior manejo. Así como también la contaminación producida durante el manejo en el ordeño, transporte y elaboración de productos lácteos (Froeder *et al.*, 2008).

Los géneros de microorganismos así como su conteo presente en la leche recién ordeñada, es un indicador del origen de la contaminación durante su obtención. El recuento de microorganismos de la leche cuando abandona el tambo depende de la microflora inicial, de la temperatura y el tiempo en el cual la leche se ha enfriado, también influyen el cambio de temperatura durante el almacenamiento y el tiempo transcurrido hasta la recolección (Cousin y Bramley, 1987).

La leche debe ser almacenada inmediatamente después del ordeño para protegerla de la contaminación externa y de cualquier efecto adverso sobre su calidad. Para ello es fundamental el enfriamiento de la leche, se debe bajar rápidamente la temperatura, desde los 33 °C con los que la leche llega

al tanque de frío, hasta una temperatura menor o igual a los 4 °C, que es la temperatura recomendada para su almacenamiento (Muñoz-Godoy, 2004).

## **1.2 Grupos microbianos presentes en leche cruda**

A continuación se indican los distintos tipos de bacterias que se pueden encontrar en la leche cruda.

### **1.2.1. Bacterias aerobias mesófilas**

Las bacterias aerobias mesófilas son aquellas cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 30 °C y 35 °C en condiciones aerobias. Las mismas pueden provenir de la piel de los pezones, las heces, manos del ordeñador, equipo, suelo, agua, entre otras. En este sentido el recuento total de bacterias mesófilas es comúnmente usado para controlar la sanitación global y las condiciones de almacenamiento de la leche cruda (Román *et al.*, 2003).

### **1.2.2. Bacterias termodúricas**

Las bacterias termodúricas son aquellas que pueden sobrevivir a la pasteurización efectuada en el laboratorio (tratamiento térmico de 63 °C durante 30 minutos, o 72 °C por 15 minutos). Dentro de estas bacterias se encuentra la especie de *Microbacterium lacticum* y de las bacterias esporuladas la supervivencia a la pasteurización puede ser de un 100%, mientras que en otros géneros ocurre < 10%. La mayoría de estos géneros no se multiplican en forma apreciable en la leche a temperatura ambiente o en el tanque de frío, por lo que los recuentos pueden ser usados como un índice de control de calidad higiénica de la leche (Bermúdez *et al.*, 2000).

La bacteria esporogénica de interés clínico humano y que produce alteración de la leche pasteurizada, almacenada a temperaturas de 6 a 20 °C es *Bacillus cereus* siendo este microorganismo capaz de crecer a baja

temperatura; es psicrótrofo y responsable de enfermedades de origen alimentario (Silveira *et al.*, 1998).

### **1.2.3. Bacterias coliformes**

Las enterobacterias más frecuentemente encontradas en los alimentos pertenecen a los géneros *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella* y la especie *Escherichia coli*. (Valbuena *et al.*, 2004). La presencia de este tipo de microorganismos coliformes es utilizado como indicador de un proceso o un estado sanitario poco satisfactorio. La presencia en un alto conteo en alimentos procesados es indicador de contaminación post-proceso.

### **1.2.4. Bacterias psicrótrofas**

Las bacterias psicrótrofas son capaces de crecer a temperaturas menores de 0°C independientemente de cual sea su temperatura óptima de crecimiento. Es decir, ciertos microorganismos mesófilos son también psicrótrofos ya que pueden crecer a menores temperaturas aunque no sea su temperatura óptima. Estos microorganismos son los principales agentes de deterioro de la leche refrigerada y sus derivados, debido a su capacidad para producir enzimas exocelulares termorresistentes (Gutiérrez Rojo, 2006).

Durante los diversos procesos tecnológicos que existen para prolongar la vida útil de los alimentos, la refrigeración constituye el método de conservación más generalizado. Si bien la conservación en frío favorece la preservación de la leche y controla el desarrollo microbiano, también es causante de una selección de la microflora psicrótrofa. La incidencia y el crecimiento de este tipo de bacterias en la leche cruda son muy variables, dependiendo del tipo de microorganismo, su número y su estado fisiológico (Barros *et al* 2009). En la mayoría de los casos los microorganismos psicrótrofos presentan un desarrollo rápido teniendo un tiempo de generación a 4 °C de 6 a 8 horas, pudiendo de esta manera multiplicar su población diez veces, en término de 24 horas (Román *et al.*, 2003).

En este trabajo nos centraremos en las bacterias psicrótrofas

### **1.5 Aspectos Taxonómicos**

Las bacterias psicrótrofas se encuentran distribuidas en la naturaleza, siendo las principales fuentes de estos microorganismos, el suelo, polvo, aire, agua, vegetación etc. Los microorganismos psicrótrofos encontrados en los productos lácteos, incluyen tanto bacterias Gram negativas, como Gram positivas (Barros *et al.*, 2009). Dentro de las bacterias psicrótrofas Gram negativas aisladas de leche cruda bovina, el género *Pseudomonas spp* es la más abundante (50%). Las especies detectadas comprenden *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens*, siendo ésta última la más abundante.

El género *Pseudomonas* se caracteriza por su amplia biodiversidad, encontrándose ampliamente distribuidas en el ambiente. Esta distribución universal se debe a la capacidad que tienen las especies de *Pseudomonas* para adaptarse a varias condiciones y para degradar un amplio rango de sustratos (Beena *et al.*, 2011). Otros géneros de bacterias Gram negativas de importancia en el deterioro de la leche y sus derivados son *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Achromobacter* y *Alcaligenes* (Cousin, 1989).

En lo que respecta a bacterias psicrótrofas Gram positivas aisladas de la leche cruda se destacan los géneros, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*. La presencia de bacterias Gram positivas ha adquirido mayor importancia en la leche pasteurizada y productos lácteos porque algunos géneros tienen la capacidad de formar esporas; las cuales pueden resistir a los tratamientos térmicos que se le proporcionan a dichos productos (Champagne *et al.*, 1994).

## **1.6 Influencia de la temperatura en el crecimiento de bacterias psicrótrofas**

Las bacterias psicrótrofas son capaces de crecer a temperaturas menores a 0 °C, aunque su temperatura óptima de multiplicación sea superior.

Con tiempos mayores a 48 horas de almacenamiento de la leche en tanques de frío o silos a 5 °C, las bacterias psicrótrofas producen deterioro por la producción de enzimas termorresistentes. Se estudió el tiempo de generación de dichos microorganismos en la leche refrigerada, se encontró un rango de 6.6 a 12.7 horas en aquellas bacterias cuya leche estuvo almacenada a 5 °C y de 12.2 a 26.1 horas en las que la leche estuvo almacenada a 0 °C. Debido a esto, el periodo en que la leche mantuvo una buena calidad química fue de 2 a 5 días a 5 °C y aproximadamente 4 a 13 días a 7 °C. Actualmente la leche se considera de buena calidad en Uruguay con recuentos  $< 5 \times 10^4$  UFC/mL en leche refrigerada a 5 °C hasta 48 horas de almacenamiento (Signorini *et al.*, 2008).

## **5. Almacenaje en frío y efecto sobre la flora microbiana**

La refrigeración no es una técnica que mejora la calidad de la leche, sólo produce una conservación de la calidad original a la entrada el tanque de frío. Este método de conservación produce un crecimiento selectivo de bacterias psicrótrofas. Dichos microorganismos tienen la capacidad de producir enzimas extracelulares proteolíticas y lipolíticas (Reginensi *et al.*, 2009). Muchas de estas enzimas extracelulares son termorresistentes y soportan el proceso de pasteurización (72 °C por 15s) e inclusive el procesamiento a ultra temperatura (UHT; 138 °C por 2s o 149 °C por 2s) (Hantsis-Zacharov *et al.*, 2007).

La leche cruda de vaca refrigerada a 4 °C durante 4 días, presenta una modificación importante en la composición de la flora microbiana original. Al 4<sup>to</sup> día de almacenaje, se produce una disminución en la proporción de

especies mesófilas Gram positivas y un aumento de manera significativa de la flora psicrótrofa Gram negativa. Las especies *P. fluorescens* y *P. putida* son las que se identifican con una mayor frecuencia (Abdou *et al.*, 2003).

Los microorganismos psicrótrofos representan menos del 10% de la flora inicial de la leche cruda, pero como tienen la capacidad de crecer rápidamente durante el almacenaje en frío de la leche, pasan a constituir un grupo predominante (Silveira *et al.*, 1998).

### **5.1 Cambios bioquímicos causados por bacterias psicrótrofas**

Las bacterias psicrótrofas son capaces de secretar enzimas termoestables (proteasas, lipasas, fosfolipasas), que degradan importantes constituyentes de la leche acelerando así su deterioro. Su producción es llevada a cabo al final de la fase exponencial de crecimiento i.e. su máxima producción ocurre a las 48 horas de refrigeración (Rowe *et al.*, 2003). Cabe mencionar que la alta concentración de estas enzimas a este tiempo se debe a un aumento en la lisis celular. Estas enzimas, activas en frío, son ricas en  $\alpha$  hélices con respecto a láminas  $\beta$  lo que le confiere una mayor flexibilidad. Así mismo, poseen más aminoácidos polares lo que puede servir para mantener a la proteína enzimáticamente flexible y enzimáticamente activa a bajas temperaturas. El alto contenido de ácidos grasos insaturados en las membranas de este tipo de microorganismos facilita el transporte enzimático (Madigan *et al.*, 2004).

El efecto de la temperatura de crecimiento en la síntesis de proteasas y lipasas extracelulares por psicrótrofos en leche depende de la especie (Silveira *et al.*, 1998).

## **5.2 Efecto de la actividad de enzimas proteolíticas y lipolíticas**

Las enzimas extracelulares de bacterias psicrótrofas hidrolizan las caseínas, principales componentes proteicos de la leche, lo que lleva a la coagulación, gelificación y la formación de sabores amargos en el producto terminado (Cempirkava 2002). Las proteinasas son enzimas que actúan sobre las proteínas causando su ruptura y transformación en péptidos de menor tamaño. Las caseínas se clasifican de acuerdo a su secuencia aminoacídica en  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$ ,  $\gamma$ . Las distintas caseínas son muy susceptibles a la hidrólisis debido a que presentan una estructura no helicoidal al azar. Casi todas las caseínas de la leche fresca recién ordeñada están contenidas en partículas agregadas llamadas micelas (Costa *et al.*, 2002). La fracción k-caseína es preferencialmente hidrolizada por las proteinasas de los distintos tipos de microorganismos psicrótrofos especialmente aquellas producidas por *Pseudomonas spp.* Esto se produce debido a que la fracción k-caseína se encuentra ubicada en la superficie de la micela y estaría más disponible para una degradación inicial. La k-caseína es degradada por las proteinasas en dos péptidos: 1) el glucomacropéptido (106-169 aa) se libera de la micela porque es hidrofílico y soluble, 2) la para k-caseína (1-105 aa), la cual permanece unida a la micela por su capacidad hidrofóbica. La  $\beta$ -caseína y  $\alpha_s$ -caseína están protegidas de la proteólisis por la k.-caseína, pero la micela de caseína presenta poros, por los cuales podrían ingresar las proteinasas y degradar preferencialmente  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$  o  $\beta$ -caseína. Una vez que la k-caseína fue removida,  $\beta$ -caseína y  $\alpha_s$ -caseína quedan expuestas a la acción de las proteasas (Perko *et al.*, 2011). Esta degradación puede tener implicancias en el uso de esta leche, para la elaboración de quesos, donde la k-caseína es esencial en la formación de la cuajada y desarrollo de sabores amargos. El sabor amargo se produce principalmente debido a que las enzimas proteolíticas degradan las proteínas a péptidos mas pequeños, comprendidos entre 6 a 10 aminoácidos, los cuales contienen aminoácidos hidrofóbicos responsables de dicho sabor (Costa *et al.*, 2002). Cabe

mencionar que la inducción de proteinasas requiere la presencia de una fuente de nitrógeno orgánico y aminoácidos tales como glutamina, asparagina y ácido aspártico. Se ha demostrado que éstos actúan como promotores de la acción de las enzimas proteolíticas (Champagne *et al.*, 1994).

Las proteinasas producidas por especies de *Pseudomonas* son mayormente activadas en rangos de temperatura entre 37 y 45 °C. Se determinó que algunas proteinasas producidas por *P. fluorescens* mantienen aproximadamente el 30% de su máxima actividad a 7 °C y el 16% a 4 °C. Se ha observado que estas enzimas son estables e incluso mantienen su actividad luego de tres meses de almacenamiento de cultivo a temperatura ambiente (Nicodeme *et al.*, 2005).

Las proteinasas psicrótrofas hidrolizan preferentemente a  $\beta$  y  $\alpha$  s-caseína. Las fracciones  $\alpha$ s y  $\beta$ -caseína son degradadas por los diferentes microorganismos psicrótrofos, pero la selectividad y el grado de degradación difiere entre estos. En general la  $\beta$ -caseína es degradada en mayor grado que la  $\alpha$ s-caseína por los diferentes microorganismos psicrótrofos (Norberg *et al.*, 2010).

Durante el almacenaje en frío las bacterias psicrótrofas producen también enzimas lipolíticas. Estas enzimas son capaces de hidrolizar los triglicéridos (98% de la grasa láctea), dando lugar a ácidos grasos libres, diglicéridos y monoglicéridos. La liberación de ácidos grasos produce un aumento de la acidez de la leche, aunque la consecuencia más negativa es la alteración de las propiedades organolépticas: sabor a rancio, sabor jabonoso, y sabor cetónico (puesto que la oxidación de los ácidos grasos da lugar a la formación de milicetonas). Los umbrales de ácidos grasos requeridos para impedir la generación de sabores indeseados son 8,3 mg/Kg a 27,5 mg/Kg dependiendo del ácido graso libre presente (Champagne *et al.*, 1994).

#### **4. Géneros predominantes de microorganismos en relación a las diferentes estaciones del año**

A lo largo del año se producen cambios en la composición de la flora microbiana presente en la leche bovina, en especial las bacterias psicrótrofas. Los microorganismos psicrótrofos con mayor potencial de deterioro pertenecen a los géneros *Pseudomonas* y *Flavobacterium*, por su capacidad de crecimiento y producción enzimática (proteínas, fosfolipasas y lipasas) a temperaturas de refrigeración (4 °C). El género *Microbacterium* no presenta capacidad destacable en la producción de enzimas de deterioro, aunque presenta resistencia a los tratamientos térmicos utilizados rutinariamente en la industria (Viejo, 2000).

Dichos microorganismos aumentan su presencia durante el invierno, disminuyendo en los meses de verano. Los géneros que predominan durante el período otoño-invierno son los de *Pseudomonas* y *Flavobacterium*, representando el 61 y 74% respectivamente. Estos géneros decaen al 50% de los aislamientos durante la época de primavera, mientras que durante el verano representan el 32% de los aislamientos.

Se presenta un comportamiento inverso al mencionado con anterioridad, para los organismos pertenecientes al género *Microbacterium*, con proporciones mínimas durante el invierno (5%), intermedias en otoño y primavera (13 y 24% respectivamente) logrando su máximo durante el verano (38%).

Las épocas de predominio de éstos géneros se asocian a la presencia de defectos en los productos manufacturados industriales. El incremento de los productos exportados por nuestro país y por ende la necesidad de extender su vida útil, exigen un permanente control de éste grupo microbiano, particularmente cuando el tiempo de refrigeración previo al proceso es prolongado (Reginensi *et al.*, 2009).

## **2. Fuentes de contaminación microbiana de la leche cruda.**

### **2.1 Interior de la glándula mamaria**

En el ordeño de una glándula mamaria sana, es posible reconocer en las primeras porciones de leche ordeñada, la presencia de microorganismos, disminuyendo a medida que el ordeño avanza. El canal del pezón se encuentra colonizado por muchos microorganismos, como por ejemplo, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, coliformes, entre otras (Barbano *et al.*, 2006).

Cuando la glándula mamaria se encuentra contaminada, especialmente en los casos de mastitis de tipo agudo, los recuentos de microorganismos pueden ser muy elevados, alcanzando valores de varios millones y también, un considerable aumento de las células somáticas

La penetración de gérmenes al tejido mamario ocurre de dos modos: por vía ascendente, a través del canal del pezón; y por vía endógena; algunos gérmenes patógenos pueden llegar a la mama por la circulación sanguínea y producir mastitis (subclínica, aguda y crónica) (Abdou *et al.*, 2003).

### **2.2 Exterior de la glándula mamaria**

Este tipo de contaminación proveniente del exterior de la glándula mamaria suele ser cuantitativamente más importante en relación con la procedente del interior de la ubre. Si bien la flora microbiana del interior de la glándula mamaria es casi en su totalidad de tipo mesófilos, en el exterior se suman microorganismos psicrótrofos y termófilos, de los cuales los formadores de esporas, tanto aerobios como anaerobios, provocan serios problemas en la industria láctea.

Entre los microorganismos que pueden llegar a la leche por vía externa, son importantes de señalar aquellos que son patógenos para el hombre, como *Bacillus cereus*, el cual tiene la capacidad de generar esporas con cierta

resistencia, provocando cuadros tóxicos debido a la producción de enterotoxinas, al consumir leche o productos lácteos con gran cantidad de esporas. *Clostridium tyrobutyricum*, formador de esporas, anaerobio estricto y termorresistente, provoca problemas de rechazos de quesos a nivel de la industria por "hinchazón" tardía (Carballo *et al.*, 1999).

### **2.3 Contaminación proveniente de la maquina de ordeño**

Esta es la fuente de contaminación más importante. La flora microbiana existente en un equipo de ordeño puede resultar variable, y esto se relaciona con el tipo de detergente y desinfectante, la técnica de limpieza, las temperaturas de lavado y el estado de las partes de goma.

Las técnicas de limpieza utilizadas en Uruguay son las establecidas a las rutinas de ordeño, se debe considerar el tipo de agua que se utiliza a nivel de tambo (la mayoría de las veces agua dura). Los detergentes alcalinos y ácidos utilizados deben ser removidos por el pasaje abundante de agua, y finalmente se deja el equipo de ordeño con desinfectante hasta el comienzo de otro ordeño con un enjuague previo con agua termizada. De ésta manera se eliminan todos los restos de compuestos orgánicos e inorgánicos como los microorganismos. Pero existen biofilm muy difíciles de erradicar, en ellos pueden crecer bacterias termorresistentes y la mayoría esporulados (Moreno *et al.*, 2007).

### **2.4 Contaminación proveniente del tanque de frio**

Los tanques de frio están diseñados para enfriar la leche de 35 °C a 4 °C en menos de 3 horas. Una refrigeración rápida de la leche luego de su recolección es vital para evitar la multiplicación de bacterias y pérdida de su calidad. La habilidad de los contaminantes para crecer se influencia por la capacidad de mantener la temperatura y el tiempo de almacenaje.

En estudios realizados relacionados a la incidencia de la flora microbiana y el tanque de frio, encontraron un alto porcentaje de bacterias Gram

negativas, especialmente en aquellos tanques que presentaban inadecuada limpieza (Contalba, 2007).

## **2.5 Contaminación proveniente del ordeñador**

El ordeñador puede llegar a jugar un papel importante en la contaminación, sobre todo cuando el ordeño es manual. Una falta de higiene en las manos del personal encargado del ordeño, facilita los riesgos de contaminación. Las rutinas actuales en la mayoría de los tambos es realizada con equipos de ordeño y con instalación manual de las pezoneras.

Se han encontrado muchas bacterias patógenas procedentes del ordeñador (difteria, tuberculosis, escarlatina, infecciones respiratorias). Además de las bacterias, los virus de origen humano también pueden llegar a leche (poliomielitis, hepatitis, paperas, rubeola, herpes, influenza). Los procesos de pasteurización elimina la mayoría de los virus y bacterias presentes en leche, algunas cepas pueden sobrevivir. Las heridas infectadas en manos y brazos pueden ser fuente de algunos de estos microorganismos (Jiménez-Juárez 2005).

## **2.6 Contaminación proveniente del agua**

La disponibilidad de agua y la calidad de la misma son fundamentales para una producción eficiente de leche. La utilización de agua contaminada en la limpieza de tanque, máquinas e instalaciones, es una fuente muy importante de contaminación. Es por eso que se debe evaluar su calidad microbiológica y físico-química. El agua utilizada para lavar el equipo de ordeño debe ser microbiológicamente potable para que no se convierta en un transmisor de bacterias (Signorini *et al.*, 2003).

El agua utilizada para la limpieza de tanque puede contener microorganismos de origen fecal, coliformes, enterococos, *Pseudomonas spp*, así como también, esporas de *Bacillus* etc.

Cuando un agua es referida como "agua dura" significa que contiene más minerales (calcio y magnesio) que el agua normal. El grado de dureza aumenta, cuanto mas calcio y magnesio hay disuelto. La dureza del agua puede disminuir la eficacia de los detergentes utilizados, esto va a implicar la utilización de detergentes ácidos y de rutinas de lavado del equipo adaptadas a esta realidad (Contalba 2007).

## **2.7 Contaminación proveniente del ambiente**

En relación a las fuentes de contaminación mencionadas anteriormente, el aire es la fuente de esporas provenientes de hongos, sin embargo cuando se produce el suministro de alimentos durante el ordeño, estos pueden ser una fuente de contaminación del ambiente.

El forraje conservado en forma de heno es portador principalmente de gérmenes esporulados como bacilos y clostridios. El proceso de ensilaje es una fermentación en ausencia total de oxígeno, con actividad de bacterias lácticas (*Streptococcus* y *Lactobacillus* especialmente), que actúan sobre los carbohidratos del forraje. Durante el proceso, la alta producción de ácido láctico previene el deterioro del forraje y conserva su valor nutritivo (Signorini *et al.*, 2003).

## **3. Otros factores que afectan la calidad de la leche**

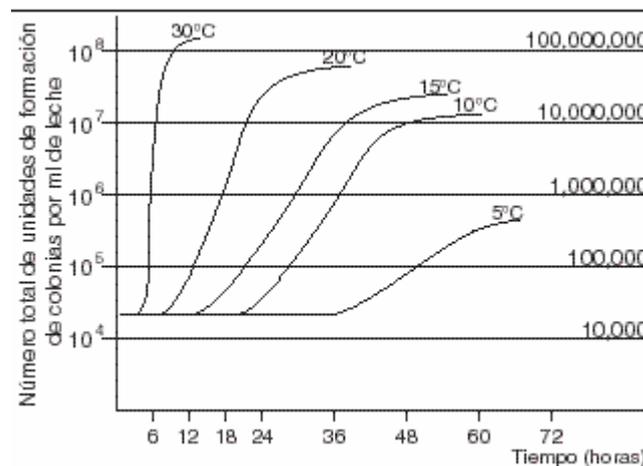
### **3.1 Condiciones de almacenamiento en el establecimiento lechero**

La leche se produce a la temperatura corporal de la vaca, 39 °C. Se generará un descenso de la temperatura en el proceso de ordeño y transferencia al tanque colector. Luego del ordeño, la leche debe ser enfriada rápidamente para minimizar el crecimiento bacteriano. Es importante enfriar la leche rápidamente en menos de 3 horas a temperaturas por debajo de 4,4 °C para evitar el crecimiento de bacterias

mesófilas, ya que la mayoría de ellas se comportan como psicrótrofas, liberando enzimas proteolíticas y lipolíticas a la leche (Homan *et al.*, 1998).

La temperatura y la duración del almacenamiento, la cantidad inicial y el tipo de bacterias presentes y en menor medida, los sistemas naturales antimicrobianos de la leche influyen en la multiplicación de las bacterias que tiene lugar en la leche almacenada (Cousin *et al.*, 1987).

En la figura 1 se detalla el efecto de la temperatura y el almacenamiento en la calidad microbiológica de la leche.



**Figura 1.** Crecimiento bacteriano en leche, inoculado con 5000 bacterias en función del tiempo, para diferentes temperaturas.

Uno de los factores más importantes que inciden en la calidad de la leche es la temperatura a la cual se la almacena, considerándose esencial si el almacenamiento va a ser mayor a doce horas. La refrigeración favorece la multiplicación de bacterias psicrótrofas presentes como contaminantes normales de la leche cruda y por esto la importancia del tiempo de residencia de la leche en el tanque de frío, menor a 48 horas, para evitar la máxima liberación de enzimas microbianas (Ruiz del Rio *et al.*, 2007).

Desde el punto de vista económico la refrigeración permite reducir los costos de transporte debido a que no es necesaria una recolección diaria. Debido a esto la leche recogida contiene varios ordeños. En el tanque de frío ingresa leche a temperaturas cercanas a los 33 °C, que se mezcla con la ya existente, que se encuentra a una temperatura cercana a los 4 °C. Los tanques son generalmente fijados para enfriar la leche de 2,8 a 3,3 °C y poseen mezcladores periódicos que aseguran la temperatura equilibrada en todo el tanque y que el calentamiento superficial no se produzca (Perdomo *et al.*, 2010).

### **3.2 Condiciones de transporte**

El transporte de la leche desde el tambo hasta la industria se lleva a cabo en camiones cisterna, los cuales son isoterms. Esto provoca que la leche que no ha sido correctamente refrigerada afecte al resto. Es frecuente que la leche llegue a la industria a temperaturas mayores a la deseada, en el entorno de 6 a 9 °C, lo que favorece la multiplicación de la flora microbiana durante el mismo.

La proporción total de psicrótrofos y coliformes en la leche de las cisternas de transporte al llegar a las plantas de procesamiento es demasiada elevada en comparación con la leche procedente de los tanques de frío de los tambos, pero no existe gran diferencia en la proporción de termodúricos (Cousin, 1982).

Es difícil poder evaluar cuanto contribuye a la contaminación total de la leche cruda el transporte, se debe sumar el aporte de los diferentes componentes del tanque cisterna (mangueras, bombas), y el tiempo que transcurre entre la recogida de la leche y su procesamiento.

### **1.3 Generalidades para la identificación y caracterización fenotípica de bacterias**

La identificación de una bacteria es su asignación a un taxón o grupo según una clasificación dada. Consiste en la determinación de las características fenotípicas y/o genotípicas y la comparación de estas características con los diferentes taxones de la clasificación considerada.

La identificación de una cepa bacteriana proveniente de un aislamiento puede realizarse utilizando diferentes combinaciones de características y distintos criterios en la evaluación de similitudes.

Si bien existen una gran variedad de pruebas bioquímicas empleadas con fines de identificación, las utilizadas de rutina en el laboratorio son las primarias y secundarias. A continuación se citan las que fueron utilizadas en el presente trabajo: Tinción de Gram, Catalasa, Oxidasa, TSI (Triple sugar iron), SIM (Sulfuro-Indol-Motilidad), Rojo de metilo- Voges-proskauer (RM-VP), Fermentación de azúcares, Utilización de Citrato, Óxido fermentación (O/F), Reducción de Nitrato, Ureasa (Koneman *et al.*, 2008).

#### **1.3.1 Generalidades para la identificación y caracterización genotípica de bacterias**

Los métodos de identificación genotípica implican la caracterización de alguna porción del genoma bacteriano por medio de técnicas moleculares para el análisis del ADN. La presencia de un gen específico o una secuencia particular del ácido nucleico se interpreta como una identificación definitiva del microorganismo.

Las técnicas de tipificación basadas en la amplificación de ácidos nucleicos mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se fundamentan en el mismo principio general común a todas ellas: la amplificación de genes o secuencias de ADN polimórficas y la separación electroforética de los productos de amplificación.

La rep-PCR es una técnica de tipificación en la que se utilizan cebadores que hibridan con secuencias de ADN repetidas o repetitivas (secuencias rep) que se encuentran distribuidas en el cromosoma de diferentes especies bacterianas. Con ésta técnica se amplifican las regiones que separan las secuencias rep, por lo que el polimorfismo resulta de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias y de la distancia de copias contiguas causadas por inserciones o deleciones de ADN (Fernández-Cuenca, 2004).

Las secuencias repetitivas son las siguientes: las secuencias REP (35-40 pb) palíndromes extragénicos repetitivos, las ERIC (124-127 pb) repetidos intergénicos consenso de las enterobacterias, y los elementos BOX (154 pb). En tales casos las técnicas se han denominado REP-PCR, ERIC-PCR y BOX-PCR respectivamente y rep-PCR colectivamente (Mantilla *et al.*, 2004).

Para analizar la diversidad a nivel de cepa se empleó la técnica de REP-PCR (Versalovic *et al.*, 1991).

BOX es un elemento muy conservado y repetido en el ADN, se ha identificado por primera vez en el cromosoma de *Streptococcus pneumoniae* (neumococo) y se lo denominó elemento BOX. Fue la primera demostración de la presencia de una fracción de ADN repetitivo en una especie de bacterias Gram positivas. La repetición BOX se encuentra compuesta por tres regiones: box A, box B y box C, que son 59,45 y 50 pares de bases de longitud respectivamente (Prats-Pastor 2005).

## **1.4 Biofilm**

Los biofilm son comunidades complejas de microorganismos, unidos irreversiblemente a una superficie, a una interfase o entre ellos, unidos en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares, que pueden presentar una única especie o un abanico de especies (Zambrano *et al.*, 2006).

La presencia de biofilm en la industria conlleva serios problemas higiénicos y numerosas pérdidas económicas por los productos que se llegan a desechar. Especialmente la industria láctea es sensible a este tipo de contaminación.

Para la formación de biofilm sólo es necesario un entorno hidratado y una mínima presencia de nutrientes, porque pueden desarrollarse sobre superficies hidrófobas o hidrófilas, bióticas o abióticas. El biofilm puede desarrollarse sobre casi cualquier tipo de superficie, debido a que previamente entra en contacto la materia orgánica presente en el agua. En la interfase agua/superficie se deposita una capa orgánica que cambia, las propiedades físicas y químicas de la superficie y mejora las posibilidades de fijación de las bacterias (Chmielewski *et al.*, 2003).

El biofilm bacteriano empieza a formarse cuando alguna célula individual se une inicialmente a una superficie. La capacidad de la célula para realizar este ataque inicial depende de factores ambientales como la temperatura y el pH, y de factores genéticos que codifican las funciones motrices, la sensibilidad ambiental, las adhesinas y otras proteínas.

Después de la unión inicial, la célula empieza a crecer y a esparcirse sobre la superficie en una monocapa, mientras forma microcolonias. Las células cambian su comportamiento y dan lugar a la compleja arquitectura del biofilm maduro. El más evidente de estos cambios es la producción de la matriz de exopolisacáridos que cementará todo el conjunto.

La formación de biofilm no es un proceso aleatorio, sino que sigue una sistemática que permite su predicción. Se han identificado cinco fases: una adsorción reversible de la bacteria a la superficie, una unión irreversible, una primera fase de maduración con crecimiento y división, la segunda fase de producción de exopolímero, y el desarrollo final de la colonia con dispersión de células colonizadoras (Zambrano *et al.*, 2006).

La adhesión de los microorganismos a un sustrato puede ser activa (por los flagelos, pili, adhesinas, cápsulas y cargas de superficie) o pasiva (por gravedad, difusión y dinámica de fluidos). En condiciones normales las células bacterianas son repelidas por la superficie ya que presentan cargas eléctricas iguales. En minutos las bacterias que encuentran la superficie acondicionada, forman con ella una unión reversible que depende de las cargas eléctricas de la bacteria. Las atracciones son de tipo electrostático o hidrófobo y fuerzas de Van der Waals, sin unión química. Si esta unión se mantiene suficiente tiempo, aparecen nuevas estructuras químicas y físicas que la harán permanente e irreversible

Los microorganismos inician la fabricación de una mezcla de polímeros polianiónicos, que excretan al exterior desde la pared bacteriana, para mantener las células unidas entre ellas y con la superficie. La composición del exopolímero consta de polisacáridos o glicoproteínas de diversos azúcares como glucosa, fructosa, manosa, N-acetilglucosamina y otros. También puede contener proteínas libres, fosfolípidos y ácidos nucleicos y teicoicos. Se sirven de ellos para mantener los nutrientes y para proteger a las bacterias de los diversos biocidas. El glicocalix atrapa nutrientes y microorganismos (Mateo-Maestre *et al.*, 2004).

Estudios recientes otorgan un papel primordial en el control de la formación de biofilm a un sistema de comunicación entre los microorganismos, llamado "*quórum-sensing*" que actúa como un auténtico lenguaje a través de señales químicas. Este sistema actúa a modo de acuerdo (quórum) entre células

bacterianas, para la activación o represión de genes específicos (entre ellos los que regulan la producción de biofilm), mediante la liberación y la detección de ciertas sustancias llamadas autoinductores (Vuong *et al.*, 2003).

Los biofilm formados en las superficies que están en contacto con los alimentos son la principal causa de contaminación del producto final. Las consecuencias de esta contaminación pueden conducir a pérdidas económicas dado el necesario rechazo del producto o incluso, a enfermedades debidas a toxiinfecciones alimentarias si intervienen patógenos.

El diseño higiénico de las instalaciones y del equipo es la mejor medida preventiva; y el mantenimiento de las condiciones (programas de limpieza y desinfección), además de la manipulación correcta en todos los procesos.

Los biofilm son invisibles pero pueden detectarse por el olor desagradable de zonas aparentemente limpias o el carácter viscoso que adquieren algunas zonas infectadas. El proceso de limpieza puede llegar a eliminar el 90% de los microorganismos de una superficie. Una limpieza larga y exhaustiva con detergentes alcalinos formulados con quelantes, ya resulta efectiva en la eliminación de biofilm, pero no es capaz de matarlos. Las bacterias se mantienen en suspensión y pueden redepósitosarse en otro lugar, y con tiempo, agua y nutrientes, formarán un nuevo biofilm. Debido a esto es necesario desinfectar luego de limpiar (Chmielewski *et al.*, 2003).

## **6. Métodos de control de la microflora psicrótrofa**

Para lograr leche de calidad microbiológica buena, existen una variedad de métodos los cuales están basados en diferentes principios físicos, químicos y biológicos, teniendo en cuenta la diversidad de grupos microbianos que se encuentran en ella. Ninguno de estos tratamientos permite alcanzar una solución definitiva al problema debido a que: no destruyen la totalidad de los

microorganismos, no inactivan la totalidad de las enzimas y no conservan todas las propiedades y cualidades de la leche cruda.

### **6.1 Tratamiento térmico**

Los tratamientos térmicos empleados para el control microbiológico se pueden dividir en dos métodos: pasteurización y esterilización

La pasteurización clásica consiste en elevar la temperatura de la leche a 62 °C durante 30 minutos (pasteurización lenta) o 72 °C durante 15 segundos (pasteurización rápida), con este tratamiento se asegura la destrucción de todos los microorganismos patógenos, por lo que la leche es totalmente segura desde el punto de vista sanitario. Sin embargo con este tratamiento no se destruyen las formas esporuladas bacterianas y algunas formas vegetativas de bacterias no patógenas, por dicho motivo debe obligatoriamente refrigerada durante toda su vida útil

La esterilización significa la destrucción total de los bacterias patógenos o no y de las esporas. Puede obtenerse a diferentes temperaturas por encima de los 100 °C, siendo la duración del calentamiento tanto mas corta cuanto mas elevada es la temperatura.

El método clásico de esterilización consiste en calentar la leche a 118-121 °C durante 15-20 minutos. Cuando la leche tiene inicialmente un gran número de esporas, este tratamiento es insuficiente para la eliminación de éstas. El método UHT permite leche "esterilizada comercial", sin mayores modificaciones que la leche pasteurizada. Este tratamiento consiste en elevar la temperatura entre 140 y 150 °C durante 1 a 5 segundos (Taverna *et al.*, 2005).

Los tratamientos térmicos afectan las propiedades organolépticas y nutritivas de la leche, cuanto menos intenso el tratamiento, mayor será la conservación de dichas propiedades, por lo tanto las leches esterilizadas con

el tratamiento clásico son las que presentan pérdidas nutritivas mayores (Ruiz del Rio *et al.*, 2007).

## **6.2 Activación del sistema lactoperoxidasa**

Este sistema se encuentra formado por la enzima lactoperoxidasa, tiocianato (SCN<sup>-</sup>) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). En presencia de estos dos últimos componentes, el sistema genera los iones hipotiocianato (OSCN<sup>-</sup>) como principal producto antimicrobiano (pH= 2.35). Los iones hipotiocianato existen en equilibrio con el ácido hipotiocianoso (HOSCN<sup>-</sup>).

El mecanismo de acción de éste sistema se debe al efecto de los iones OSCN<sup>-</sup> y HOSCN<sup>-</sup>, los cuales son agentes oxidantes, con una corta duración de vida, que tienen la capacidad de reaccionar con los grupos sulfhidrilo de las enzimas esenciales del metabolismo bacteriano, interfiriendo en el transporte de nutrientes como la glucosa, la síntesis de ADN y ARN; la captación de oxígeno y la cadena respiratoria (Reginensi *et al.*, 2009).

El efecto antibacteriano es proporcional a la formación de los productos de la oxidación del tiocianato. Este es activado cuando la concentración de tiocianato se encuentra entre 10-15 mg/L y la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre 8-10 mg/mL (Ponce *et al.*, 2005).

## **6.3 Inoculación con *Lactococcus lactis***

En muchos casos se utiliza la inoculación con cepas de bacterias ácido lácticas para prevenir el crecimiento de microorganismos psicrótrofos. En un estudio realizado por Guinot-Thomas *et al.*, (1995) con dos leches conteniendo diferente carga microbiana, (una de  $4 \times 10^3$  y otra con  $2,8 \times 10^4$  psicrótrofos/mL), inoculadas con 0.5% de *Lactococcus lactis subsp lactis*

detectó una inhibición del crecimiento en las leches que poseían bajas cargas microbianas (Vero *et al.*, 2004).

Las bacterias ácido lácticas tienen un efecto inhibitorio sobre los psicrótrofos de un 35% cuando los mismos varían en el orden de  $10^3$ - $10^5$  microorganismos/mL (Champagne *et al.*, 1994).

Las bacterias ácido lácticas pueden fermentar la lactosa y otros azúcares a ácido láctico, lo que provoca el descenso del pH y esto explica la inhibición sobre la flora psicrótrofa (Chen 2003).

#### **6.4 Adición de Dióxido de Carbono**

La adición de CO<sub>2</sub> en la leche refrigerada tiene un efecto inhibitorio en el crecimiento de psicrótrofos y extiende la vida media de la leche cruda. El CO<sub>2</sub> es efectivo en alargar la fase lag y disminuir la fase de crecimiento, principalmente en bacterias Gram negativas y otras células bacterianas vegetativas. El CO<sub>2</sub> influye en la fase log, lag y estacionaria, pero de diferente manera dependiendo del microorganismo (Madigan *et al.*, 2004).

El modo de acción del CO<sub>2</sub>, involucra una serie compleja de interacciones, las cuales incluyen el desplazamiento de oxígeno, la influencia de pH, la rotura de membranas celulares y las interferencias metabólicas

Cuando se inyecta CO<sub>2</sub> en un líquido se produce un desplazamiento del oxígeno, volviendo al medio más anaerobio. Los psicrótrofos más alterantes son aerobios, de modo que aumentando la anaerobiosis del medio se favorece el control de los mismos. La influencia del pH es explicada por la formación de ácido carbónico, que provoca la disminución del mismo. Un medio más ácido contribuye a reprimir el crecimiento de las bacterias psicrótrofas. En el caso de la industria láctea esto debe controlarse ya que si el pH desciende demasiado, puede ocasionar problemas tecnológicos. El CO<sub>2</sub> se acumula como gas en la membrana celular de las bacterias, alterando la permeabilidad de la misma. Al pasar ácido carbónico al interior

celular, se reduce el pH intracelular, lo que lleva a una inhibición de enzimas claves, entre ellas las decarboxilasas (Ruiz del Rio *et al.*, 2007).

El tratamiento con CO<sub>2</sub> reduce la degradación de la glucosa, debido al efecto de este sobre la actividad metabólica de los microorganismos presentes en la leche. La concentración de CO<sub>2</sub> extiende la vida media de la leche pasteurizada sin modificar la fracción de monosacáridos libres.

La adición de CO<sub>2</sub> en la leche cruda y sus efectos combinados con la refrigeración, podrían ser una manera apropiada de controlar el crecimiento microbiano, no existiendo evidencia que este tratamiento cause un efecto sobre las esporas de diferentes psicrótrofos (Ruiz del Rio *et al.*, 2007).

### **6.5 Separación natural de la leche**

La separación natural de la leche es un proceso ampliamente utilizado en la elaboración de quesos duros y semiduros en países europeos. En nuestro país la quesería artesanal utiliza este principio durante el denominado "peinado" de la leche en tina. La separación natural de la fase grasa superior luego de dos horas de reposo bajo refrigeración (4°C) reduce significativamente todos los grupos microbianos, particularmente a los microorganismos psicrótrofos. Esta reducción microbiana y otros aspectos relacionados con el tamaño de partículas grasas en la leche utilizada, conduce a ventajas desde el punto de vista higiénico y perfiles de sabor en la manufactura de quesos a nivel artesanal o industrial (Reginensi *et al.*, 2

## **7. Objetivos**

### **7.1 Objetivo General**

El objetivo general del presente trabajo fue, identificar los diferentes géneros predominantes de bacterias psicrótrofas relacionados con la calidad microbiológica de la leche cruda bovina almacenada en tanque de frío y silos industriales.

### **7.2 Objetivos específicos**

- Aislar los géneros de bacterias psicrótrofas predominantes en leche cruda bovina provenientes de tanque de frío y silos industriales
- Identificar por caracterización fenotípica, bioquímica y genética las cepas de bacterias psicrótrofas aisladas.
- Determinar los géneros que predominan en las distintas muestras, de acuerdo a la época del año en la cual fueron obtenidas.

## **8. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **8.1 Muestras de Leche**

Se procesaron 24 muestras de leche cruda bovina refrigerada, obtenidas a nivel industrial provenientes de tanque de frío de diferentes productores que remiten a una industria láctea del departamento de San José. Las muestras fueron obtenidas en los meses de abril, mayo y junio de 2012, recolectadas en frascos estériles y transportadas bajo refrigeración al Laboratorio de la Unidad de Tecnología de los Alimentos- Facultad de Agronomía.

### **8.2 Análisis microbiológico**

El análisis microbiológico comprendió el recuento de microorganismos mesófilos aerobios y psicrótrofos totales en placa.

Para el recuento de aerobios mesófilos las muestras fueron sometidas a diluciones seriadas y decimales en SSF 0.85% estéril y se transfirieron 100  $\mu$ L a placas de PCA (Plate Count Agar, Oxoid), dichas placas se incubaron a 32 °C durante 48 horas.

El recuento de psicrótrofos se realizó en PCA + Caseína al 1% de caseína, incubando a 7 °C durante 10 días. De las 24 muestras procesadas, en 10 muestras se presentaron colonias psicrótrofas con halos de proteólisis en PCA+ caseína.

Posteriormente se realizó el recuento y aislamiento de diez colonias al azar por placa de diferentes morfologías y subcultivadas dos veces en placas de PCA+C. Para la realización de las pruebas bioquímicas las cepas bacterianas aisladas se conservaron a -20° C en caldo Soya Tipticasa con 15% de glicerol. De 200 aislamientos se

seleccionaron las colonias mas proteolíticas (midiendo el halo de proteólisis individualmente) en medio PCA+ caseína.

De acuerdo a los halos de proteólisis, el presente estudio se prosiguió con 120 bacterias psicrótrofas.

### **8.3 Caracterización fenotípica**

#### **Pruebas bioquímicas**

Las pruebas bioquímicas determinan la actividad de una vía metabólica (conjunto de reacciones químicas) a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer lo metaboliza o no. Tales pruebas se han desarrollado para demostrar en forma clara una determinada característica bioquímica como presencia o ausencia de una cierta actividad enzimática (grupo de enzimas) o vía metabólica, crecimiento en presencia de inhibidores, entre otros (Koneman *et al.*, 2008).

Las pruebas rutinarias de laboratorio primarias y secundarias utilizadas para la caracterización fenotípica y bioquímica incluyeron morfología de las colonias, tinción de Gram, catalasa, oxidasa, TSI, SIM, VP/RM, fermentación de glucosa, citrato, O/F, reducción de NO<sub>3</sub>, urea, crecimiento en Mc Conkey. A continuación se procederá a detallar dichas técnicas

#### **Ensayo para detectar actividad catalasa**

- **Procedimiento**

Se transfirió una ansada de células de una colonia aislada a la superficie de un portaobjetos en el que se colocó una gota de peróxido de hidrógeno al 3%.

- **Interpretación**

El ensayo se consideró positivo al observar la aparición y producción sostenida de burbujas de gas (oxígeno)

### **Ensayo para detectar actividad oxidasa**

- **Procedimiento**

Se añadió unas gotas de reactivo al disco comercial, con papel filtro, los cuales contienen reactivo para detectar oxidasa (BD BBL, France) y luego se extendió una ansada de la colonia a estudiar. Se realizó un control negativo de ansa, ya que esta puede producir falsos positivos.

- **Interpretación**

Cuando se utiliza el reactivo dimetil-p-fenilendiamina, se considera el ensayo como positivo cuando aparece un rosado a fucsia en un tiempo de aproximadamente 2 minutos y luego se torna a color negro.

### **TSI (Triple sugar iron)**

El agar triple azúcar hierro es un medio nutriente y diferencial que permite estudiar la capacidad de producción de ácido y gas a partir de glucosa, sacarosa y lactosa en un único medio. La glucosa en el medio TSI esta en una proporción 10 veces menor que la lactosa y la sacarosa.

- **Procedimiento**

Se inocularon con punta (alambre recto), tubos con medio TSI. Para esto se inoculó hasta  $\frac{3}{4}$  partes de la profundidad del medio y luego se estrió en la

superficie del pico, posteriormente se incubaron los tubos a 37 °C durante 24hs.

- **Interpretación**

Pico alcalino/fondo alcalino (K/K/gas-/H<sub>2</sub>S-): No hay fermentación de azúcares.

Pico alcalino/fondo ácido (K/A/gas-/H<sub>2</sub>S-): Glucosa fermentada, ni lactosa, ni sacarosa fermentadas.

Pico alcalino/fondo ácido (K/A/gas-/H<sub>2</sub>S+): Glucosa fermentada, ni lactosa, ni sacarosa fermentadas. No hay producción de gas, si de H<sub>2</sub>S.

Pico alcalino/fondo negro (K/N/gas+/H<sub>2</sub>S+): Glucosa fermentada, ni lactosa, ni sacarosas fermentadas, producción de gas y de ácido sulfhídrico.

Pico ácido/fondo ácido (A/A): Glucosa y lactosa y/o sacarosa fermentadas. Puede producirse H<sub>2</sub>S o no.

### **Prueba SIM (Sulfuro-Indol-Motilidad)**

Esta prueba se realiza para determinar actividad triptofanasa, motilidad y producción de H<sub>2</sub>S de los microorganismos.

- **Procedimiento**

Se inocularon por punción, tubos conteniendo 5mL de medio SIM (sulfuro Indol motilidad) y se incubaron a 37 °C por 24hs. Al finalizar este período, se añadieron 5 gotas de reactivo de Kovac's. Este reactivo al reaccionar con el Indol como con el triptófano vira de color al rojo, indicando actividad triptofanasa.

- **Interpretación**

La prueba se consideró positiva cuando se observó la formación de un anillo de color rojo en la parte superior del tubo.

La motilidad se consideró positiva en caso de observarse turbidez más allá de la línea de siembra. La producción de H<sub>2</sub>S se determinó positiva en caso de observarse un ennegrecimiento en la línea de siembra, o en todo el medio.

### **Prueba Rojo de metilo- Voges-proskauer (RM-VP)**

Esta prueba se utiliza para identificar los diferentes géneros de enterobacterias mediante el tipo y la proporción de productos que se originan por la fermentación de la glucosa.

- **Procedimiento**

Se inoculó el caldo RM-VP con un cultivo puro de 24hs de crecimiento y se incubó a 37 °C durante 48hs. Luego de finalizado el tiempo de incubación se transfirió 1 ml de caldo a un tubo para VP. Para revelar VP se agregaron 0.6 ml (10 gotas) de alfa-naftol al 5% y 0.2 mL (4 gotas) de KOH al 40%. Se agitó suavemente para exponer el medio al oxígeno atmosférico y dejarlo reposar durante 10 a 15 minutos. En otro tubo, con caldo restante se reveló RM agregando unas 4-8 gotas del indicador rojo de metilo.

- **Interpretación**

La prueba rojo de metilo se considera positiva, cuando se observa el desarrollo de un color rojo estable a pH ácido, por el agregado del indicador rojo de metilo, estableciendo que el microorganismo en estudio fermentó la glucosa por la vía ácido mixta.

La prueba Voges-Proskauer es positiva si se desarrolla un color rojo fucsia luego de 15 minutos del agregado de alfa-naftol y KOH, indicando que el microorganismo fermentó la glucosa por la vía del 2,3-butandiol y el pH neutro.

### **Fermentación de azúcares**

- **Procedimiento**

Se inocularon caldos en tubo con el medio TSB (caldo tripticasa soja), con glucosa, manitol, lactosa, e indicador de pH (rojo fenol), pH ácido (amarillo) pH alcalino (rojo) y se incubaron a 37 °C por 24hs.

- **Interpretación**

Dicha prueba se considera positiva en el caso de observarse crecimiento y viraje del indicador al color amarillo (ácido). Si se produce gas se puede observar en la campana de Durham invertida. Las bacterias no fermentadoras no producen viraje o generan un viraje hacia el pH alcalino (rojo).

### **Utilización de citrato**

- **Procedimiento**

Se inoculó la superficie del pico de flauta de tubos conteniendo el medio de citrato junto con el indicador azul de bromotimol y se incubaron a 37 °C durante 48hs a 72hs.

- **Interpretación**

La utilización de citrato se detecta mediante la visualización de crecimiento y la alcalinización del medio (azul prusia).

## **Óxido fermentación (O/F)**

- **Procedimiento**

Se inocularon por picadura tubos conteniendo el medio de cultivo Hugh-Leifson (semisólido), este medio presenta el indicador azul de bromotimol el cual vira a color amarillo en medio ácido, incubándose a 35 °C durante 24 a 48hs.

- **Interpretación**

La producción de ácido se detecta en el medio por descenso de pH a ácido virando a color amarillo. En el caso de microorganismos oxidativos, este viraje ocurre en la superficie. Se observa viraje en todo el tubo cuando el microorganismo es fermentador, si el medio no cambia de color o vira al color azul (pH básico) con respecto a un tubo del mismo lote sin sembrar, se considera que el microorganismo es inactivo frente a la glucosa.

## **Reducción de nitrato**

- **Procedimiento**

Se inocularon tubos conteniendo 5 mL de caldo Nitrato (Difeo, Lb., USA), los cuales se incubaron a 37° C durante 24hs.

- **Interpretación**

La reducción de nitratos a nitritos se detecta añadiendo N,N-dimetil- $\alpha$ -nalfilamina y ácido sulfanílico, los cuales generan un complejo con los nitritos de color rojo, indicando la prueba positiva. Los ensayos que se obtuvieron negativos se confirmaron con la prueba de reducción de zinc, en la cual se agrega una granalla de zinc y al no generarse cambio de color en el medio, se considera positivo el ensayo.

## **Prueba ureasa**

- **Procedimiento**

Se inocularon tubos conteniendo 5 ml de caldo Urea (caldo de Stuart) y se incubaron a 37 °C durante 24 a 72hs.

- **Interpretación**

El ensayo de ureasa se consideró positivo, cuando se observó una coloración rosa a fucsia, lo cual indica alcalinización del medio e hidrólisis de la urea (MacFaddin, 2003).

## **Caracterización genotípica**

### **8.4.1 Extracción de ADN genómico**

Se inocularon tubos conteniendo 3mL de TSB (caldo tripticasa soja, Oxoid, Ltd., UK) con cultivos puros de cada aislamiento y se incubaron a 37 °C durante 24 hs. Se prepararon los paquetes celulares a 8.000 rpm durante 15 minutos en una centrifuga Spectrofuge 7M (Labnet International Inc. USA). El ADN fue purificado utilizando un Kit comercial de ADN genómico (ZR Fungal/Bacterial, DNA Miniprep. Zymo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **8.4.2 Análisis REP-PCR / BOXA1R-PCR**

Se empleó la técnica de PCR para la determinación de la presencia de secuencia REP y BOXA1.

La reacción se realizó en un volumen total de 25 µL, con 5 µL de lisado y 20 µL de mix preparada con 1X Thermo buffer (Fermentas, USA), 2.5 mM de

MgCl<sub>2</sub>, 0.5 μM de primer REP-PCR (REP1R 5'-IIIIICGICGICATCIGGC-3'-REP2I 5'-ICGICTTATTCIGGCCTAC-3'), 1.0 μg/mL de BSA, 0.2 mM de dNTP (Fermentas, USA), 1U Taq polymerase (Fermentas, USA) y agua suficiente para un volumen final de 25 μL. La amplificación se realizó en las siguientes condiciones: desnaturalización de 95 °C por 7 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 40 °C por 1 min y 65 °C por 8 min, con una extensión final de 65 °C durante 16 min.

Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de 1.5% de agarosa, conteniendo 0.5 μg/mL de Good View (SBS Genetech Co., Ltd.). Se sembraron 12 μL del producto de PCR y se realizó la electroforesis a 94 V, utilizando buffer Tris-Borato-EDTA (TBE), durante 4 horas. Las bandas resultantes se visualizaron y se fotografiaron en un transiluminador UV.

### **8.4.3 Análisis REP-PCR**

#### **Primer BOXA1R**

El análisis se realizó en 25 μL de reacción conteniendo: 1X Thermo Buffer (Fermentas, USA), 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 250 μM de cada dNTP (Fermentas, USA), 1U de taq polimerasa (Fermentas, USA), 2 μM de primer BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'), y 5 μL de lisado. La amplificación se realizó en un termociclador Corbett CG1-96 Thermal cycler (Corbett, Research UK) con el siguiente programa: desnaturalización a 95 °C por 15 min; seguido de 35 ciclos, cada uno de 94 °C por 1 min, 53 °C por 1 min, 72 °C por 2.5 min y un paso de extensión final de 72 °C durante 10 min.

Los productos de la amplificación y el marcador de peso molecular GeneRuler 100pb plus DNA Ladder (Fermentas Life, Sciences) se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5%, conteniendo 0.5 μg/mL de Good

View (referencia), se sembraron 15  $\mu$ L del producto de PCR y se realizó una electroforesis a 95 V, utilizando Buffer Tris-Borato-EDTA (TBE). Las bandas resultantes se visualizaron y se fotografiaron en un transiluminador UV.

#### **8.4.4 Amplificación del gen del ARNr 16S y secuenciación de aislamientos seleccionados representativos de los diferentes perfiles de BOX**

##### **a) Amplificación del gen del ARNr 16S**

Se realizó la amplificación del 16S para la detección de las especies bacterianas. El ARN 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.540 nt, codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S), a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica (Rodicio *et al.*, 2004).

De acuerdo a la agrupación de los diferentes perfiles bioquímicos se seleccionaron 27 aislamientos y se realizaron análisis de secuenciación del gen ARNr 16S. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25  $\mu$ L con: 1x Thermo buffer (Fermentas, USA), 2.5 mM de  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M de cada dNTP (Fermentas, USA), 1U Taq polimerase (Fermentas, USA), 0.2 mM de cada primer (fD1 5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3' y rd1 5'-AAGGAGTGATCCAGCC-3') (Weisburg *et al.*, 1991) y 20  $\mu$ g de ADN. El PCR se realizó en un termociclador Corbett CG1-96 con un Palmtop computer interface (Corbett Research Ltd., Cambridge, UK). Los productos de amplificación fueron purificados y se enviaron a su secuenciación.

**b)** Los productos fueron secuenciados por MacroGen Sequencing service, Korea usando un secuenciador capilar ABI PRISM 3730XL (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) utilizando el cebador fD1. Las secuencias de ADN obtenidas fueron comparadas con las depositadas en la base de datos NCBI BLAST data base (<http://blast.ncbi.nih.gov/Blast.cgi>) y con

cepas de referencia (las cuales se nombran a continuación) pertenecientes al laboratorio de Unidad de Tecnología de los Alimentos, para la identificación de aislamientos basados en la similitud de secuencia.

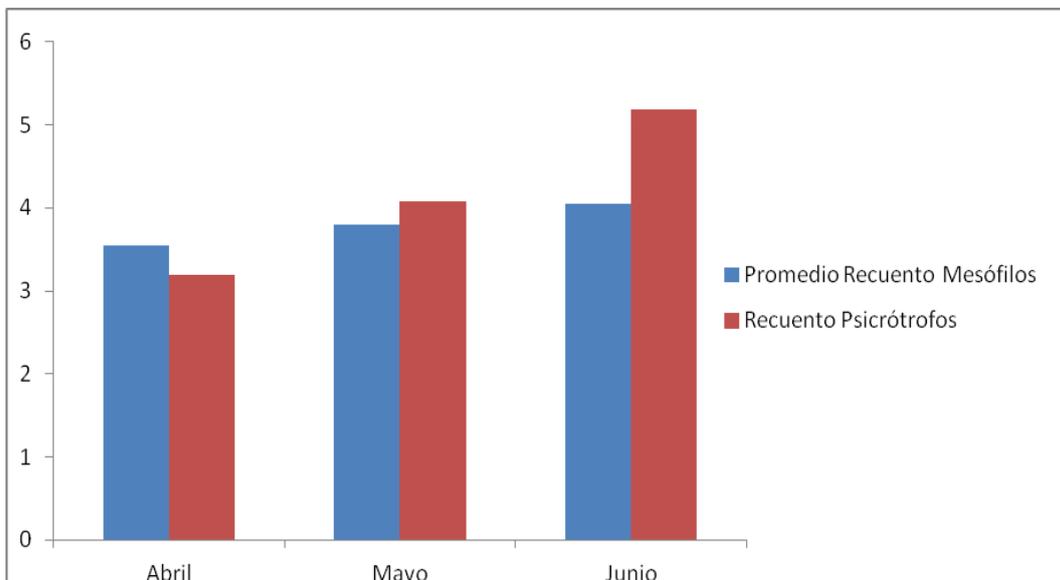
<i>Pseudomona fluorescens</i> ATCC 17552
<i>Rahnella aquatilis</i> ATCC 55046
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 8100
<i>Acinetobacter</i> ATCC 19606
<i>Psychrobacter</i> ATCC 17955
<i>Pseudomona sp</i> ATCC 21808
<i>Pseudomona Brenneri</i> ATCC 49642
<i>Pseudomona fragi</i> ATCC 4973

## 9. Resultados

### 9.1 Recuento microbiano en leche cruda de tanque de frío

Los análisis microbiológicos realizados en este trabajo indican un predominio de bacterias psicrótrofas, incrementándose dichos microorganismos en el mes de junio.

En la Figura 2 se observa la variación en la flora microbiana durante el periodo otoño-invierno.



**Figura 2.** Variación de microorganismos mesófilos aerobios y psicrótrofos en relación a los meses de abril, mayo y junio, de leche proveniente de silo industrial.

El promedio de recuentos durante el muestreo para bacterias mesófilas fue de  $3.80 \pm 0.02$  Log UFC/mL mientras que para los microorganismos psicrótrofos es  $4.15 \pm 0.04$  Log UFC/mL. Si bien se debe considerar en este punto que no sólo importa el recuento de bacterias psicrótrofas, sino que también se deben considerar las especies de cepas bacterianas predominantes productoras de enzimas. En la leche cruda en el tanque de frío existe un “pool” microbiano, por lo tanto una gran producción de enzimas termoestables y en su mayoría son excretadas al medio por bacterias

psicrótrofas. También se debe señalar que un número importante de bacterias mesófilas aerobias se comportan como bacterias psicrótrofas en ambientes refrigerados.

El recuento de bacterias mesófilas aerobias y psicrótrofas incremento durante el muestreo. En el caso de bacterias psicrótrofas llegaron a  $5,79 \pm 0,01$  Log UFC/mL en el mes de junio en las muestras de leche, i.e 2 log mas que en el mes de abril. Esta alta cantidad de bacterias psicrótrofas trae como consecuencia una alta actividad proteolítica y lipídica en la leche alterando su calidad.

## **9.2 Identificación morfológica, fisiológica y bioquímica**

De acuerdo a los resultados obtenidos por las pruebas bioquímicas y proteólisis se realizaron los diferentes grupos a partir de los 200 aislamientos iniciales. Es así que se detectaron tres grupos de bacterias psicrótrofas predominantes en leche cruda: *Pseudomonas* (63%), *Rahnella* (11%) y *Acinetobacter* (3.7%) (La mayor actividad proteolítica la desarrollan las especies de *Pseudomonas*). Seleccionándose 27 aislamientos representativos de cada grupo.

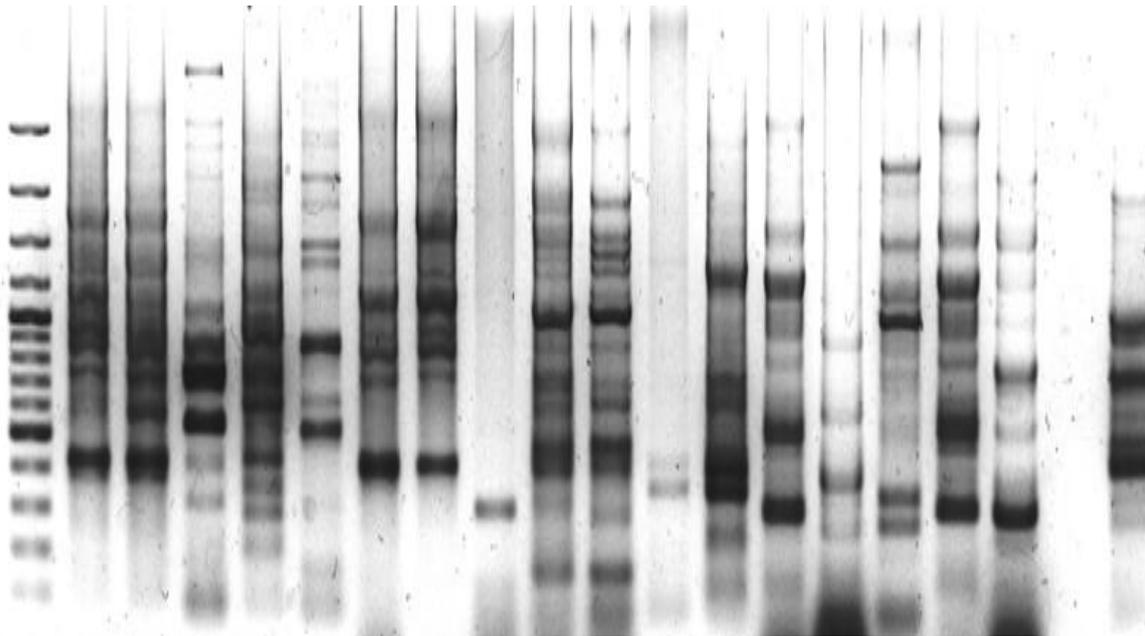
Se seleccionaron las cepas bacterianas Gram negativas, oxidasa positiva, las que presentaban metabolismo oxidativo en el medio de Hugh Leifson y las que crecen a 4° C. No se observó reducción de nitratos para las cepas de bacterias psicrótrofas estudiadas. Se confirmó su identificación por secuenciación del gen ARNr 16S.

## **9.3. Caracterización molecular**

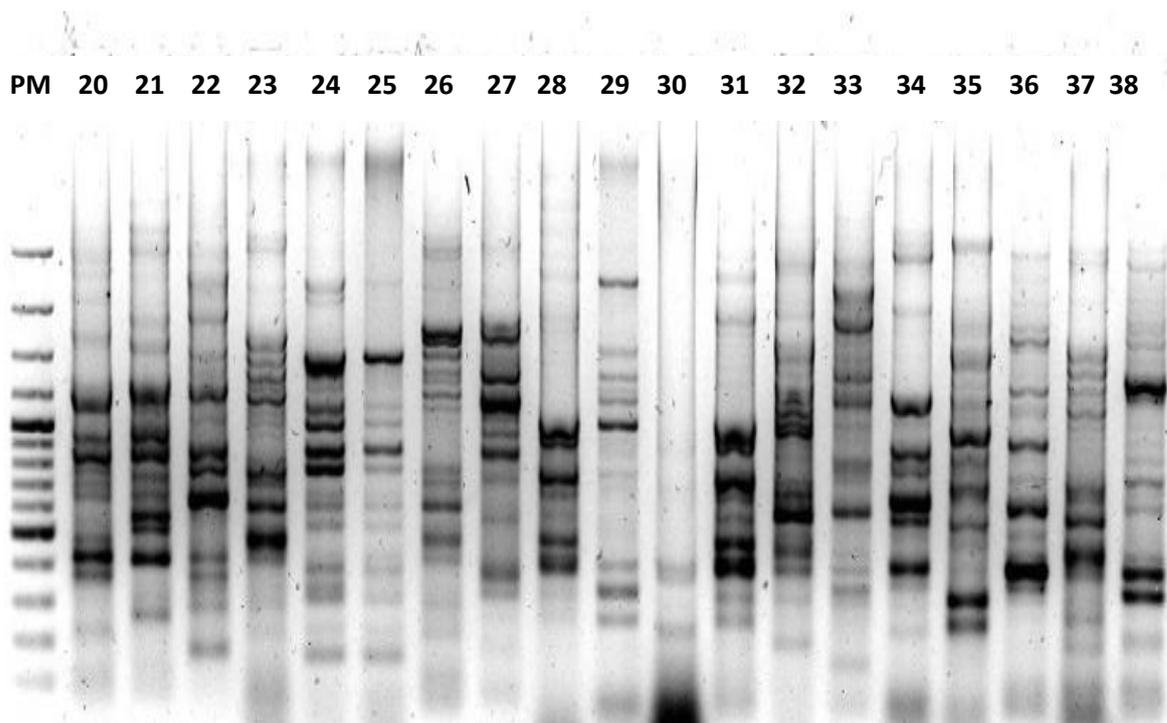
### **9.3.1 Amplificación REP-PCR**

Los análisis para determinar la variabilidad intraespecie se realizaron por la técnica REP-PCR, (ver Figuras 3 y 4). Es así que se identificaron diferentes perfiles de banda en 27 aislamientos correlacionando con perfiles de las cepas de referencia provenientes de colecciones del Laboratorio de la U.T.A.

PM 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19



**Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados de Rep-PCR. **carril PM:** marcador de peso molecular 100pb; **carril 1: Cepa de Referencia *Rahnella aquatilis***; **carril 3: Cepa de Referencia *Acinetobacter sp***; **carril 4: Cepa de Referencia *Serratia sp***; **carril 5: Cepa de Referencia *Psychrobacter sp***; **carriles 2,6,7: *Rahnella aquatilis***; **carril 9: Cepa de Referencia *Pseudomonas fluorescens***; **carriles 10,12,14,15,17,19: *Pseudomonas fluorescens***; **carril 16: Cepa de Referencia *Pseudomonas sp***; **carril 13: *Pseudomonas sp***. Las cepas pertenecientes a los carriles 8, 11,18 no lograron ser identificadas.



**Figura 4.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados de REP-PCR. **carril PM:** marcador de peso molecular 100pb; **carril 20: Cepa de Referencia *Pseudomona fluorescens***; **carril 21: Cepa de Referencia *Pseudomona fragi***; **carril 22: Cepa de Referencia *Pseudomonas brenneri***; **carriles 23,24,25,26,28,31,32,36,38: *Pseudomonas fluorescens***; **carril 27: Cepa de Referencia *Acinetobacter sp***; **carril 33: *Acinetobacter sp***; **carril 34: *Pseudomonas brenneri***; **carril 35: Cepa de Referencia *Psychrobacter sp***. Las cepas pertenecientes a los carriles 29, 30, 37 no lograron ser identificadas.

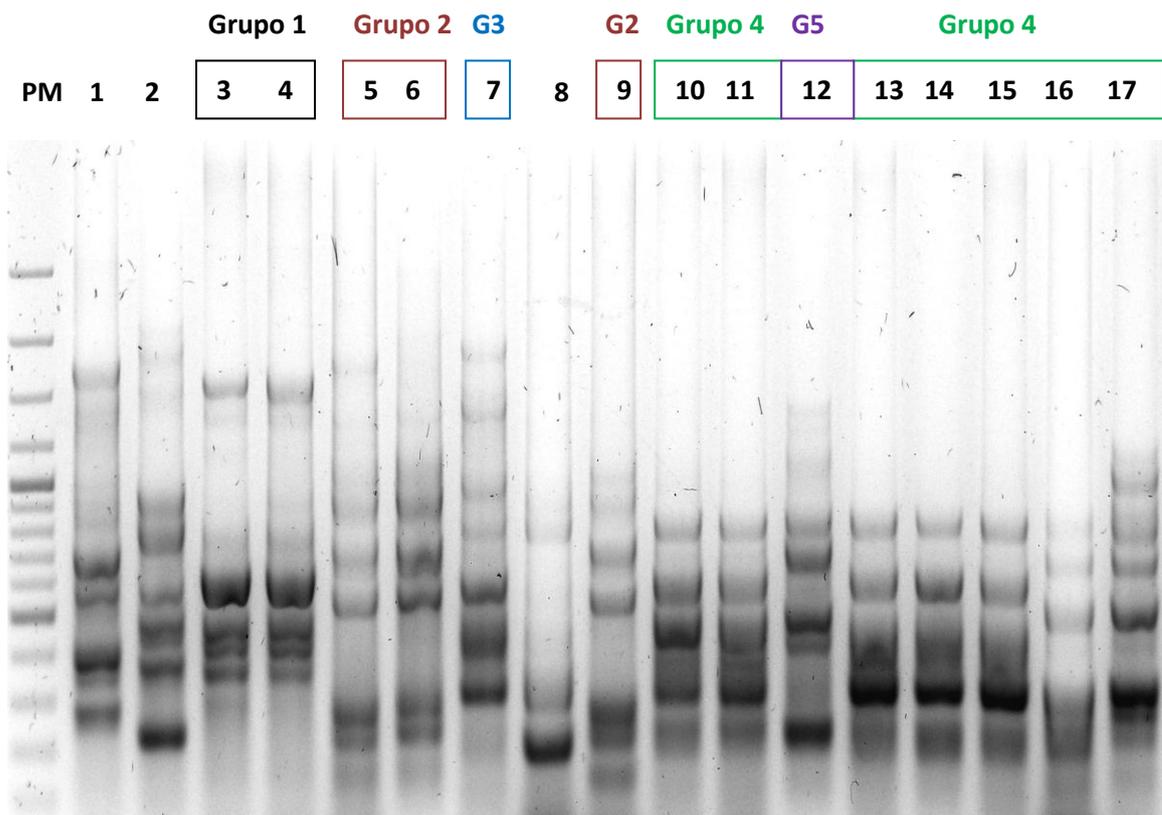
Los 27 aislamientos fueron identificados en 5 especies de acuerdo a la comparación de bandas de los perfiles REP-PCR con las de las cepas de referencia. Los resultados de las pruebas bioquímicas también se tuvieron en cuenta de momento de asignar una especie a cada aislamiento.

Los aislamientos fueron asignados a una de las siguientes especies; *Rahnella aquatilis* (11%), *Acinetobacter sp* (3.7%), *Pseudomonas sp* (3.7%), *Pseudomonas fluorescens* (56%), *Pseudomonas Brenneri* (3.7%). Mas del 50% de los aislamientos fueron asignados a la especie *P. fluorescens* aunque la variabilidad intraespecie fue importante entre los perfiles de esta especie.

La secuenciación del gen ARNr 16S, permitió identificar especies de bacterias psicrótrofas con > 98% de similitud.

### 9.3.2 Amplificación BOX-PCR

En la Figura 5 se detalla el resultado de la amplificación de 14 cepas correspondientes a *Pseudomonas fluorescens* mediante la técnica de BOX-PCR. Debido al alto número de aislamientos pertenecientes a *P. fluorescens* en nuestro relevamiento, nos preguntamos si existiría variabilidad genética entre dichas cepas. En este sentido los análisis de BOX-PCR evidenciaron un alto polimorfismo genético en estas cepas. Los distintos perfiles de bandas se agruparon en 5 grupos bien definidos, siendo el perfil del grupo 4 el más representativo de la especie (ver figura 5). Cabe destacar que las cepas pertenecientes a este grupo fueron las que presentaron mayor actividad proteolítica.



**Figura 5.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados de Box-PCR. **carril PM:** marcador de peso molecular 100pb ; **carril 1:** Referencia *Pseudomonas breunneri*; **carril 2:** Referencia *Pseudomonas fluorescens*; **carriles 3,4,5,6,7,9,10,11,12,13,14,15,16,17:** *Pseudomonas fluorescens*. La cepa perteneciente al carril 8 no logró ser identificada.

Cabe destacar que el perfil de banda de los aislamientos del grupo 3, es muy similar al de los aislamientos del grupo 4 excepto que el grupo 3 carece de una banda de ~ 200pb.

## **10. Discusión**

Los recuentos de mesófilos aerobios realizados para las 24 muestras recolectadas durante los meses de abril, mayo y junio incrementaron en menos de un Log al finalizar el período de muestreo. La flora psicrótrofa incrementó hasta 2 Log al transcurrir los meses, produciéndose el mayor recuento de dichas bacterias en el mes de Junio. A lo largo del año se producen cambios en la composición de la flora microbiana psicrótrofa, generándose un predominio de dichas bacterias durante los meses de invierno, que conduce a diferencias en la potencialidad para deteriorar la leche y los productos, con cierta independencia de los recuentos bacterianos. Los géneros de bacterias psicrótrofas que predominan en el período otoño-invierno son de los géneros *Pseudomonas* y *Flavobacterium*, mientras que durante los meses de verano, se incrementan los aislamientos pertenecientes al género *Microbacterium* (Reginensi *et al.*, 2009).

El recuento de bacterias psicrótrofas en la leche cruda, se considera como el parámetro importante que influye en el comportamiento de la leche durante el almacenamiento. Una leche con una buena calidad microbiológica puede ser almacenada a 4 °C durante 48 horas sin que se originen cambios en la composición fisicoquímica, éste almacenamiento genera un incremento en la flora psicrótrofa, lo cual incrementara la proteólisis de las caseínas de la leche (Revelli *et al.*, 2004).

Para que se produzca proteólisis y cambios organolépticos en el producto son necesarios niveles  $> 5.0 \times 10^6$  y  $10^7$  UFC/mL de bacterias psicrótrofas (Revelli *et al.*, 2004). Se ha señalado que la ausencia de proteólisis puede ser debida a que no se liberan las proteinasas por encontrarse las bacterias todavía en fase exponencial de crecimiento, a niveles de  $10^6$  UFC/mL o que solamente una pequeña proporción de estos psicrótrofos son proteolíticos (Guinot-Thomas *et al.*, 1995)

Los recuentos de psicrótrofos en el presente trabajo son menores a los comunicados; se debe considerar en este punto que en la leche existe un "pool" de microorganismos y de enzimas liberadas, lo cual es importante considerar no solo el recuento microbiano sino también las cepas predominantes con alta actividad proteolítica y lipolítica.

Así mismo el recuento de bacterias aerobias mesófilas, es un indicador de la calidad sanitaria de la leche, su presencia en un número elevado (siendo el margen máximo permitido de  $5.0 \times 10^4$  UFC/mL) indica riesgos sanitarios y también incremento del contenido enzimático (proteólisis y lipólisis). Esto último probablemente conduzca a problemas tecnológicos en la elaboración de productos lácteos como son: disminución del rendimiento quesero, sabores a amargos y rancios (Caraballo *et al.*, 2002).

Generalmente los microorganismos mesófilos provocan en aquellas leches que son mantenidas sin refrigeración, acidificación debido al crecimiento de bacterias lácticas (flora normal) con producción de ácido láctico por fermentación de la lactosa, bajando el pH e inhibiendo así el desarrollo de otros microorganismos y ocasionando la precipitación de la caseína al acercarla a su punto isoeléctrico (pH 4.6) (Viejo *et al.*, 2001).

Un valor elevado de dichas bacterias se genera como consecuencia de prácticas antihigiénicas en la producción, métodos inadecuados en el manejo y transporte bajo condiciones climáticas cálidas sin facilidades de refrigeración (Valbuena *et al.*, 2004).

El promedio del recuento de bacterias psicrótrofas aisladas en éste trabajo experimental es de 4.23 Log UFC/mL, lo cual indicaría que las muestras de leche cruda estudiadas, presentan recuentos bajos de éste grupo bacteriano. Es importante señalar que los estudios de proteólisis para cada cepa son necesarios para determinar la vida útil de la leche y sus productos. Se mencionó con anterioridad que el recuento es independiente de las especies de bacterias psicrótrofas predominantes en la leche.

En el caso de bacterias aerobias mesófilas, el promedio fue de 3.82 Log UFC/mL por lo tanto las muestras analizadas cumplen con lo establecido en cuanto al parámetro de microorganismos mesófilos permitidos en la leche de alta calidad, por pago de las empresas lácteas.

De acuerdo a la calidad integral de la leche adquiere gran importancia en función a dos aspectos fundamentales como son la salud pública y su aptitud industrial, necesitando de todos los sectores involucrados, en la producción primaria, conservación, transporte, almacenamiento y transformación. Es imprescindible partir de animales sanos, genéticamente aptos, apropiadas condiciones de alimentación y manejo, buena practicas de higiene, control y tratamiento de mastitis y otras patologías, con el objetivo de asegurar al consumidor, productos inocuos, íntegros y legítimos (Marth, 1981).

Se realizó por las pruebas bioquímicas la identificación de las bacterias seleccionadas al azar y el predominio es de bacterias Gram negativas con respecto a bacterias Gram positivas. La predominancia de bacterias Gram negativas, aisladas de muestras de leche cruda refrigerada, se encuentra en concordancia con resultados obtenidos de otras investigaciones

Los géneros de bacterias psicrótrofas aisladas se identificados por pruebas bioquímicas, proteólisis y fluorescencia pertenecieron a los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Rahnella*. Obteniéndose un predominio del género *Pseudomona*, siendo la especie de *Pseudomonas fluorescens* la más abundante.

En general se puede decir que la predominancia de los grupos bacterianos va a depender básicamente de la temperatura de conservación, así, a temperaturas óptimas para la misma (<5°C). Las diferentes especies del género *Pseudomonas*, son las mas abundantes por su mayor capacidad de adaptación a las condiciones, logrando sobrevivir en diversos hábitat (Valbuena *et al.*, 2004).

La característica más particular de las bacterias psicrótrofas presentes en la leche cruda es su capacidad de producir enzimas hidrolíticas sobre las cuales, los tratamientos térmicos como la pasteurización y de ultra alta temperatura (UHT) son termoestables. *Pseudomonas fluorescens*, es predominante en la leche refrigerada y es enzimáticamente activa, reteniendo una actividad residual entre un 14% y un 51% (Costa *et al.*, 2002).

Las cepas de *Pseudomonas fluorescens* muestran una amplia variabilidad en su capacidad de producción de enzimas proteolíticas, lipolíticas y fosfolipídicas. Estudios realizados en diferentes cepas de *Pseudomonas fluorescens*, demostraron adicionalmente la resistencia térmica de estas enzimas a tratamientos térmicos intensos (130°C) por periodos de 3 s (Viejo, 2000).

Estudios realizados sobre el efecto de la temperatura en la actividad de las lipasas producidas por aislamientos de *Pseudomonas fluorescens*, mostraron que la temperatura óptima de la enzima fue de 37°C pero aproximadamente el 90% de su actividad máxima se mantuvo a 5°C (Abdou, 2003).

Los resultados obtenidos por la amplificación mediante la técnica de REP-PCR en relación a los perfiles de bandas de las especies bacterianas en el presente trabajo de *Rhanella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas sp*, *Pseudomonas brenneri*, con cepas de referencia procedentes de colecciones del Laboratorio de Unidad de Tecnología de los Alimentos, permitieron determinar los perfiles de las bandas con la identificación de las especies de bacterias psicrótrofas aisladas.

El análisis genético mediante la técnica de BOX-PCR permitió establecer la existencia de variantes génicas entre individuos de una misma especie. Se observó variabilidad intraespecie entre cepas de *P. fluorescens* (Grupo 4), estableciendo 5 grupos, predominado el grupo 4 con el mayor número de aislamientos.

El polimorfismo genético hace referencia a la existencia en una población con diferencias en la secuencia de distintas porciones de ADN. Los polimorfismos pueden tener distinta trascendencia desde el punto de vista funcional, dependiendo de si afectan a una región codificante del genoma, a una región reguladora o a una región no codificante.

La variabilidad intraespecie observada en las cepas de *P. fluorescens* permite inferir que dicho polimorfismo otorgaría a ésta especie mayor capacidad de adaptabilidad al medio ambiente. Es decir la existencia de diferentes poblaciones genéticamente distintas dentro de la misma especie de *P. fluorescens*, podría permitir que frente a cualquier presión de selección, ya sea natural o artificial, una o varias poblaciones de *P. fluorescens* sean capaces de subsistir y de crear resistencia o adaptabilidad a dicha presión selectiva (Gana, 2003).

La secuenciación del gen ARNr 16S amplificado permitió confirmar la identificación de los diferentes grupos de cepas bacterianas con similitud mayor a 98%.

## 11. Conclusiones

- Las bacterias Gram negativas mostraron un predominio con respecto a las Gram positivas. Los géneros hallados fueron *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Rahnella*. Obteniéndose una prevalencia del género *Pseudomonas* siendo la especie de *P. fluorescens* la más abundante.
- Se observaron cambios en la composición de la flora microbiana, en relación a la época del año. Los microorganismos psicrótrofos aumentan durante el periodo de invierno.
- Los análisis resultados de las pruebas bioquímicas, proteólisis y fluorescencia, permitió agrupar a las bacterias en 3 grupos representados por los géneros, *Rahnella*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter*.
- La especie de bacteria psicrótrofa predominante en leche cruda es *Pseudomonas fluorescens*, correspondiendo a más del 60% de los aislamientos.
- Los análisis realizados por la técnica molecular REP-PCR permitió establecer 5 grupos al compararse las bandas de los perfiles por con las cepas de referencia (*P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. brenneri*, *P. sp*, *Rahnella aquatilis* y *Acinetobacter*).
- Los análisis de los resultados de BOX-PCR revelaron polimorfismo genético entre las cepas representativas de *P. fluorescens* y se identificaron 5 grupos con patrones de bandas definidas y diferentes, predominando el grupo 4.

## 12.Bibliografía

Abdou, A.M (2003) Purification and partial characterization of psychrotrophic *Serratia marcescens* lipase. **American dairy science association**. 86, p 127-132.

Barbano, D.M; Y. Ma, y M.V. Santos (2006) Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. **J. Dairy Sci** 89, p 15-19.

Barros, Leal, Nornberg, M; Tondo, E.C; Brandelli, A (2009) Bacterias psicrótróficas e actividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta Scientiae Veterinariae** 37(2), p 157-163.

Beena, A.K; Ranjini, A.R; Riya, T.G (2011) Isolation of psychrotrophic multiple drug resistant *Pseudomonas* from pasteurised milk. **Veterinary World**. Vol.4/8 349-352

Bermúdez, J; Reginensi, S; Viejo, J (2000) Géneros bacterianos asociados al deterioro de la leche y productos lácteos. **Jornada "Evolución, presente y futuro de calidad"**. Conaprole, Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay. 25p.

Caraballo, Mazzuchelli, P.N; Douglas, Fulle, G.F (2002) **Evaluación de deterioro proteico por psicrótrofos en leche ovina y caprina en tanque de frío**. Tesis Ing. Agr, Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay.

Carballo, A; Ilundain, M; Inciarte, J; Cataste, J (1999) **Estudio de la contaminación microbiana en la leche en seis tambos del departamento**

**de flores en dos épocas del año.** Tesis Ing. Agr, Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay. 61p

Cempirkava, R (2002) Psychrotrophic vs. total bacterial counts in bulk milk samples. **Vet. Med. - Czech** 47(8), p 227-233.

Champagne, C.P; Laing, R.R; Roy, D; Mafu, A.A (1994) Psychrotrophs in dairy products: Their effects and their control. **Critical reviews in food science and nutrition** 34(1), p 1-30.

Chen, L (2003) Detection and impact of protease and lipase activities in milk powders. **International Dairy Journal** 13, p 255-275.

Chmielewski, R; Frank, J.F (2003) Biofilm formation and control in food processing facilities. **Rev. Food Sci and Food Saf** 2, p 22-32.

Contalba, Tapia, V.A (2007) **Algunas variables climatológicas y su relación con el recuento total (UFC) en leches refrigeradas provenientes de equipo de ordeño con lavado CIP de la provincia de BÍO- BÍO.** Tesis Médico Veterinario, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción, Chillán Chile.

Costa, L Marcia; Gómez, S.M. Francisca; Molina, C Luz H; Simpson, R Ricardo; Romero, M. Alejandro (2002) Purificación y caracterización de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* y sus efectos sobre las proteínas de la leche, **Archivos latinoamericanos de nutrición** 52(2), p 160-165.

Cousin, M (1982) Presence and activity of psychrotrophic microorganism in milk and dairy products, **A review journal of food protection** 45(2), p 172-207.

Cousin, M (1989) Physical and biochemical effects on milk components  
**Enzymes of Psychrotrophs in raw food** CRS press, p 205-224.

Cousin, C; Bramley, A (1987) Microbiología de la leche cruda, **Microbiología lactológica** 1, p 109-150.

Díaz, R; Gamazo, C; López-Goñi, I (2005) **Manual práctico de Microbiología** 3ª edición, Elsevier-Masson.

Favale, M.S; Umansky, G.N; Scarinci, H.E; Simoneta, A.C (1994) Incidencia de bacterias psicrótrofas proteolíticas y lipolíticas en leche cruda. **Revista argentina de lactología** VI(10) p 25-36

Fernández-Cuenca, F (2004) Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. **Enferm Infecc Microbiol Clin** 22(6) p 355-360

Froeder, Arcuri, E; Lima Da Silva, P.D; Vasconcelos Paiva Brito M.A, Feitosa, Brito, J.R; Lange, Dos Anjos, Magalhaes (2008) Contagem, isolamento e caracterização de bacterias psicrótrofas contaminantes de leite cru refrigerado, **Ciencia Rural, Santa María** 38(2), nov, p 2250-2255

Gana, E (2003) **Relación entre polimorfismos genéticos intragénicos y características de producción de leche y fertilidad en vacas holstein fresian.** Tesis Ing. Agrónomo Facultad de Ciencias Silvoagropecuarias, Universidad Mayor, Santiago, Chile. 52 p.

Guinot-Thomas, P; Ammouy, M; Laurent, E (1995) Effects of storage conditions on the composition of raw milk. **Int Dairy J.** 5: 211-223.

Gutiérrez, Rojo, R (2006) Los psicrotrofos y la calidad de la leche, **Industria alimentaria**, noviembre diciembre.

Hantsis, Zacharov, E; Halpern, M (2007) Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits, **Applied and environmental microbiology** 73(22) p 7162-7168.

Jimenez, Juárez, W.A (2005) **Evaluación de la calidad fisicoquímica y microbiológica de la leche bovina de tres principales pequeños productores de Santa Ana mixtan del parcelamiento nueva concepción, Escuintla, Guatemala.** Tesis Médico Veterinario, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

Koneman, E.W; Winn, H; Allen, S (2008) **Diagnostico microbiológico** 6ª edición, Argentina, Médica Panamericana.

Madigan, M.T; Martinko, J.M; Parker, J (2004) **Brock, Biología de los microorganismos** 10ª edición, Madrid, Pearson educación S.A

MacFaddin (2003) **Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica** 3ª edición, Argentina, Médica Panamericana.

Mantilla, J.R; García, I; Espinal, P.A; Valenzuela, E.M (2004) Estandarización y evaluación de tres sistemas de rep-PCR para la tipificación de *Klebsiella pneumoniae*. **Col. Cienc. Quím. Farm** 33(1) p 48-58.

Marth, E (1981) Assuring the quality of milk. **Journal Dairy Sci.** 64, p 1017-1022.

Mateo, Maestre, M; Maestre, Vera, J.R (2004) Biofilm: Modelo de comunicación bacteriana y resistencia a los antimicrobianos. **Rev. Esp Quimioterap** 17(1), p 26-28.

Moreno, Vásquez, F.C; Rodríguez, Martínez, G; Méndez, Mancera, V.M; Osuna, Ávila, L.E; Vargas, M.R (2007) Análisis microbiológico y su relación con la calidad higiénica y sanitaria de la leche producida en la región de alto de chicamocha (departamento de Boyacá). **Revista de medicina veterinaria** julio-diciembre(14) p 61-83

Muñoz-Godoy, S (2004) **Perfil microbiológico de la leche de estanque de tres centros de acopio lecheros (CAL) de la provincia de Valdivia**. Tesis Ing. Alim, Facultad de Ciencias Agrarias, Valdivia, Chile

Nicodeme, M; Grill, J.P; Gaillard, J.L; Gaillard, H (2005) Extracellular protease activity of different *Pseudomonas* strains: dependence of proteolytic activity on culture conditions. **Journal of Applied Microbiology** 99, p 641-648.

Norberg, B.L.M; Friedrich, C.R; Weiss, D.N.R; Tondo, C.E; Brandelli, A (2010) Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International journal of dairy technology** 63(1), p 41-46.

Perdomo, González, N (2010) **Evaluación de la calidad microbiológica de la leche y queso fresco de "prensa" artesanal elaborado por el municipio de Jesús Carranza, Veracruz, México**. Tesis de grado, medico veterinario, Facultad de medicina veterinaria y zootecnia, Veracruz, Mexico.

Perko, B (2011) Effect of prolonged storage on microbiological quality of raw milk, **Microbiological quality of raw milk** 61(2), p 114-124.

Ponce, C.P; Armenteros, A.M; Villoch, C; Montes de Oca, N; Carreras, J (2005) Evaluación de riesgos microbiológicos y químicos de la activación del sistema lactoperoxidasa en leche cruda. **Centro de ensayos para el control de la calidad de la leche y productos lácteos CENLAC. Centro nacional de sanidad agropecuaria , CENSA, San José de las Lajas, Habana, Cuba** 9(5), p 1-21

Prats-Pastor, G (2005) **Microbiología Clínica** 1<sup>era</sup> edición, Madrid, Editorial médica Panamericana.

Reginensi, S; Viejo, J; Bermúdez, J; (2009) Incidencia de bacterias psicrótrofas en el deterioro de la leche cruda bajo condiciones de refrigeración, **Tecnología láctea latinoamericana** (57) p 54-58

Revelli, G.R; Sbodio, O.A; Tercero, E.J (2004) Recuento de bacterias totales en leche cruda de tambos que caracterizan la zona noroeste de Santa Fe y sur de Santiago del Estero, **Revista Argentina de Microbiología** (36) p 145-149.

Rodicio, M.R; Mendoza, M.C (2004) Identificación bacteriana mediante secuenciación de ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica, **Enferm, Infecc, Microbiol, Clin** 22(4), p238-245.

Román, S; Guerrero, L; Pacheco, L (2003) Evaluación de la calidad fisicoquímica, higiénica y sanitaria de la leche cruda almacenada en frío, **Revista científica, FCV-LUZ** XIII( 2), p 146-152.

Rowe, M.T; Dunstall, G; Kilpatrick, D; Wisdom, G.B (2003) Effect of growth phase on the subsequent growth kinetics of psychrotrophic bacteria of raw milk origin, **International journal of dairy technology** 56(1), p 35-38.

Ruiz del Rio, A; Toledo, Pino, I (2007) **Evaluación de CO<sup>2</sup> en el control de microorganismos psicrótrofos y termodúricos en la leche cruda refrigerada.** Tesis Ing. Agr Facultad de Agronomía , Montevideo, Uruguay.

Siegfried, S; Neuhaus, K (2006) Life at low temperatures. **Prokaryotes.** Cap 1.8(2) p 210-262.

Signorini, M.L; Sequeira, G.J; Bonazza, J.C; Dalla, Santana, R; Otero, J.R; Rosmini, M.R (2003) Variación estacional en los principales indicadores de higiene en leche cruda de un tambo en la cuenca central. **Revista FAVE-Ciencias veterinarias** 2(2), p 98-110.

Signorini, M.L; Sequeira, G.J; Bonazza, J.C; Dalla, Santana, R; Martí, L.E; Frizzo, L.S; Rosmini, M.R (2008) Utilización de microorganismos marcadores para la evaluación de las condiciones higiénico-sanitarias en la producción primaria de leche. **Revista científica, FCV/LUZ XVIII** (2), p 207-217

Silveira, I; Pinheiro, E; Teixeira, D (1998) Influencia de microorganismos psicrótrofos sobre a qualidade do leite refrigerado, **Higiene Alimenticia** 12(55), p 21-27.

Taverna, M; Chávez, M; Páez, R; Cuatrín, A; Negri, L (2005) Caracterización de la actitud tecnológica de la leche destinada a la elaboración de leche polvo entera en la cuenca lechera central. **Revista argentina de lactología** (23), p 33-49

Valbuena, E; Castro, G; Lima, K; Acosta, W; Briñez, W; Tovar, A (2004) Calidad microbiológica de las principales marcas de leche pasteurizadas distribuidas en la ciudad de Maracaibo, Venezuela, **Revista científica, FCV-LUZ XIV(1)**, p 59-67.

Vero, L.De; Taccogna, M; Solieri, L; Puglisi, M.L; Fava, P; Giudici, P; Gullo, M (2004) Cooked ham as a model system to predict shelf-life. **Industri Alimentari 43(441)**, p 1139-1143.

Versalovic, J; Koeu,T; Lupski, JR (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to DNA fingerprinting of bacterial genomes **Nucleic Acids Res (19)**, p 6823-31.

Viejo, J (2000) **Importancia de los psicrotrofos en la leche y sus productos**. Monografía del primer año del Máster en ciencias e Ing. de los alimentos, Centro politécnico del Cono sur, Colonia, Uruguay. 120 p.

Viejo, M.J; Damián, J.P; Falcao, O; Bermúdez, J.W; Reginensi (2001) Efecto de las enzimas proteolíticas producidas por bacterias psicrótrofas del género *Pseudomonas fluorescens* en leche. **Tecnología láctea Lationoamericana (24)**, p 60-63

Vuong, C; Gerke, C; Somerville, G.A; Fischer, E.R; Otto, M (2003) Quorum-Sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermis*. **Journal Infect Dis 188**, p 706-718.

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology 173**, 697-703.

Zambrano, M.A; Suarez, Londoño, L (2006) Biofilms bacterianos: sus implicaciones en salud y enfermedad. **Universitas Odontológica** 25(57), p 19-25.