

Universidad de la República

Facultad de Ciencias

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Orientación Microbiología

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE CEPAS DE *ANOXYBACILLUS* AISLADAS DE LECHES EN POLVO COMERCIAL

ADRIANA MARTÍNEZ SANGUINÉ.

Tutor: Dra. Stella Reginensi

Unidad de Tecnología de los Alimentos -Facultad de Agronomía.

Montevideo, Uruguay

2013



Agradecimientos

A mi tutora Stella Reginensi por sus valiosas enseñanzas y el tiempo que me dedicó.

A los integrantes del grupo de laboratorio de la Unidad de Tecnología de los Alimentos: Marcela González, Jorge Bermúdez, Jorge Olivera y Nancy.

A Fernanda Aspiroz y Pedro días por sus aportes en la corrección de esta tesina.

Muy especial a mi madre y mi hermano, sin los cuales no hubiera sido posible este logro.

A mi familia toda, en especial a mi tía Zulma y mi tío Oscar por su apoyo siempre.

A mi novio David por darme fuerza en todo momento.

A mi amiga de toda la vida Carolina y mis amigas del G9 por estar desde el principio.

A todos los que se cruzaron en este camino y formaron parte de el...

¡MUCHAS GRACIAS!

Tabla de contenido

	Pág.
Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
1.1. Antecedentes.....	2
1.2. Ambientes extremos y microorganismos.....	4
1.3. Bacterias adaptadas a la vida en altas temperaturas.....	5
1.4. Aspectos biotecnológicos de microorganismos extremófilos.....	7
1.5. Producción de leche en polvo en Uruguay.....	8
1.6. Bacterias termófilas encontradas en leche en polvo.....	9
1.7. Importancia de la contaminación de industrias lácteas por bacterias termófilas formadoras de esporas.....	10
1.8. Características de los “biofilms” en general y en industrias lácteas.....	11
1.9. Ubicación de bacterias termófilas dentro de las industrias lácteas.....	15

	Pág.
1.10. Identificación y caracterización fenotípica de bacterias...	16
1.10.1. Caracterización morfológica y pruebas bioquímicas convencionales.....	16
1.10.2. Pruebas bioquímicas comerciales.....	17
1.10.3. Perfiles de proteínas totales bacterianas por SDS-PAGE.....	19
1.11. Generalidades de la identificación y caracterización genotípica de bacterias.....	20
1.11.1. ARNr 16s.....	21
1.11.2. RAPD-PCR.....	21
2. Objetivos.....	23
2.1. Objetivo general.....	23
2.2. Objetivos específicos.....	23
3. Materiales y métodos.....	24
3.1. Preparación de muestras y selección de aislamientos.....	24
3.2. Caracterización de las cepas por la morfología de sus colonias, morfología de células, presencia de esporas y posición.....	25
3.3 Caracterización fenotípica de los aislamientos por pruebas bioquímicas.....	

	Pág.
3.3.1. Enzima catalasa.....	26
3.3.2. Ensayo de Sulfuro-Indol-Motilidad (SIM).....	26
3.3.3. Fermentación de azúcares.....	27
3.3.4. Ensayo de triple azúcar hierro (TSI).....	27
3.3.5. Ensayo Rojo de Metilo-Voges-Proskauer (RM VP).....	28
3.3.6. Reducción de nitrato.....	29
3.3.7. Enzima Ureasa.....	30
3.3.8. Enzimas β galactosidasa y β glucoronidasa.....	30
3.4. Caracterización de los aislamientos mediante los perfiles proteicos.....	30
3.5. Caracterización genotípica.....	31
3.5.1. Extracción de ADN genómico.....	31
3.5.2. RAPD-PCR usando cebador OPR 13.....	32
3.5.3. Análisis de la secuencia del gen del ARNr 16S.....	33
3.6. Actividad proteolítica, lipolítica y amilolítica en placa.....	33
3.7. Ensayo para determinar la formación de biofilm.....	34
4. Resultados.....	

	Pág.
4.1. Caracterización fenotípica.....	36
4.1.1. Características morfológicas de colonias y células.....	36
4.1.2. Caracterización bioquímica.....	38
4.1.3. Caracterización fenotípica por perfiles de proteínas.....	41
4.2. Caracterización genotípica.....	42
4.2.1. RAPD- PCR.....	42
4.2.2. Identificación de los aislamientos mediante análisis de la secuencia ARNr 16S de los aislamientos.....	43
4.3. Proteólisis lipólisis y amilólisis.....	44
4.4. Formación de biofilm.....	44
5. Discusión.....	46
6. Conclusiones.....	52
7. Perspectivas.....	53
8. Bibliografía.....	54

RESUMEN

La especie termófila facultativa *Anoxybacillus flavithermus* fue aislada de fuentes termales de varias partes del mundo, también de estiércol y leche en polvo de diferentes países. En 2011 fue aislada por primera vez en Uruguay a partir de leche en polvo comercial, encontrándose en segundo lugar en orden de abundancia entre las bacterias termófilas aisladas. En este estudio se caracterizaron fenotípicamente 20 aislamientos provenientes de leche en polvo comercial uruguaya y se compararon con tres cepas de referencia de *A. flavithermus* pertenecientes a la colección del Laboratorio de la Unidad de Tecnología de los Alimentos de Facultad de Agronomía. Se seleccionaron 4 aislamientos para la identificación y caracterización genotípica. La técnica RAPD-PCR utilizando el cebador OPR13 permitió comparar los perfiles de bandas de ADN, resultando similares a las cepas de referencia de *A. flavithermus*. La comparación de las secuencias de un fragmento de 1540 pb del gen que codifica para el ARNr 16S con las secuencias depositadas en la base de datos NCBI blast mostraron que las cuatro cepas estudiadas tienen una similitud mayor al 98% con cepas de *A. flavithermus*. Las nuevas cepas aisladas y las cepas de referencia presentaron actividad proteolítica y lipolítica, por lo que potencialmente podrían contribuir al desarrollo de propiedades organolépticas no deseables en los productos. Todas las cepas en estudio presentaron adhesión a superficies lisas, lo cual es crucial en las etapas iniciales de la formación de biopelículas. El presente estudio permitió identificar nuevas cepas de *A. flavithermus* y determinar la producción de enzimas con actividad hidrolítica en los componentes de la leche en polvo. También se determinó la capacidad de adhesión en superficies lisas para la formación de biopelículas; lo cual es un problema a nivel industrial por las consecuencias en los tiempos de limpieza en las plantas productoras y sus efectos en la leche en polvo.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Antecedentes.

El género *Anoxybacillus* tiene como especie tipo a la especie *Anoxybacillus pushchinoensis* (Pikuta et al., 2000). Aunque el nombre del género *Anoxybacillus* significa “bacilos que no requieren de oxígeno” (Pikuta et al., 2000) la mayoría de las especies descritas pueden crecer bien aeróbicamente. En 2003 se descubrió que *A. pushchinoensis* es aerotolerante anaeróbica en vez de estrictamente anaeróbica, por lo tanto la descripción del género *Anoxybacillus* fue corregida pero el nombre del género no fue cambiado a pesar de que en los años siguientes varios miembros de este género fueron identificados como aerobios, anaerobios facultativos o aerobios facultativos (Pikuta et al., 2003). En la actualidad el género consta de 19 especies y 2 subespecies: *A. flavithermus* (Pikuta et al., 2000) especie anteriormente denominada *Bacillus flavothermus* (Heinen et al., 1982), *A. gonensis* (Belduz et al., 2003), *A. contaminans* (De Clerck et al., 2004), *A. kamchatkensis* (Kevbrin et al., 2005), *A. voinovskiensis* (Yumoto et al., 2004), *A. ayderensis* y *A. kestanbolensis* (Dulger et al., 2004), *A. rupiensis* (Derekova et al., 2007), *A. amylolyticus* (Poli et al., 2006), *A. bogrovensis* (Atanassova et al., 2008), *A. thermarum* (Poli et al., 2009), *A. eryuanensis* y *A. tengchongensis* (Zhang et al., 2011), *A. salavatliensis* (Cihan et al., 2010), *A. kaynarcensis* (Inan et al., 2012), *A. mongoliensis* (Namsaraev et al., 2010),

A. tepidamans (Schäffer et al., 2004; Coorevits et al., 2011), *A. caldiproteolyticus* (Chen et al., 2004; Coorevits et al., 2011). Las 2 últimas especies mencionadas fueron previamente clasificadas como *Geobacillus caldoproteolyticus* y *Geobacillus tepidamans*, respectivamente. Las subespecies son *A. flavithermus subsp. Yunnanensis*, la cual tiene alta tolerancia al etanol (Dai et al., 2011), y *A. kamchatkensis subsp. asaccharedens* (Gul- Guven et al., 2008). Los miembros de este género han sido encontrados en diversos habitats de moderada a alta temperatura: aguas termales, estiércol, comidas procesadas como gelatinas y leche en polvo (Pikuta et al., 2000; Heinen et al., 1982; De Clerck et al., 2004). La mayoría de los miembros de este género tienen una temperatura óptima de crecimiento en el rango de 50°C-65°C, son alcalófilos o alcalino tolerantes y son capaces de crecer a pH neutral con excepción de *A. amilolyticus* con pH óptimo de crecimiento de 5.6 (Poli et al., 2006). *A. flavithermus* fue originalmente aislado de una fuente termal en Nueva Zelanda (Heinen et al., 1982), luego también en otras fuentes termales de diferentes partes del mundo (Kevbrin et al., 2005; Narayan et al., 2008), de estiércol (Pikuta et al., 2000) y se ha reportado como un importante contaminante de leche en polvo (Flint et al., 2001b; Ronimus et al., 2003; Rückert et al., 2004). En Uruguay Reginensi et al. (2011) realizó un estudio con el objetivo de identificar las especies predominantes y la diversidad de bacterias termófilas formadoras de esporas en la leche en polvo comercial uruguaya. El estudio mostró que

dos de las tres especies contaminantes predominantes en la leche en polvo manufacturada de diferentes países (*B. licheniformis* y *A. flavithermus*) (Rückert et al., 2004) estaban presentes en la leche en polvo comercial uruguaya, no encontrándose la especie *G. stearothermophilus*. *A. flavithermus* cepa C se encontró en el segundo lugar en orden de abundancia en este estudio, reforzando la idea de que esta especie es un importante contaminante en la producción de leche en polvo. *A. flavithermus* ha sido descrita como bacilos Gram positivos, termófilos, formadores de endosporas terminales (una sola por célula), anaerobios facultativos (Pikuta et al., 2003) y consideradas como bacterias extremófilas de acuerdo a las condiciones para su crecimiento.

1.2. Ambientes extremos y microorganismos.

Los procariotas presentan metabolismos ampliamente variados llegando a resistir condiciones ambientales muy adversas. Los ambientes extremos han sido originalmente considerados demasiado adversos como para soportar vida microbiana. Entre ellos se encuentran fuentes hidrotermales, hielo marino, fuentes termales ácidas, lagos carbonatados, sedimentos oceánicos profundos y salinas. Algunos ambientes antropogénicos pueden considerarse también como extremos como son los calentadores de agua, efluentes termales de plantas eléctricas, acúmulos de abono, ensilados, intercambiadores de calor y evaporadores de industrias

lácteas (Burgess et al., 2009). Sin embargo, microorganismos denominados extremófilos sortean los obstáculos y se desarrollan en estos ambientes. Dependiendo de sus condiciones óptimas de crecimiento son llamados termófilos, psicrófilos, acidófilos, alcalófilos, barófilos, halófilos, xerófilos (Stetter, 1999).

1.3. Bacterias adaptadas a la vida en altas temperaturas.

En la naturaleza los ambientes extremos más extensos y con temperaturas más altas están asociados a fenómenos volcánicos. Muchas fuentes termales tienen temperaturas próximas a la ebullición y las fuentes hidrotermales submarinas (fumarolas) pueden alcanzar los 150-500°C. En algunas fuentes termales la temperatura es variable y en otras es muy constante. Los microorganismos cuya temperatura óptima de crecimiento está por encima de los 45°C se llaman termófilos y aquéllos cuya temperatura óptima se encuentra por encima de los 80°C se llaman hipertermófilos (Madigan et al., 2009).

Se han descrito una gran cantidad de especies hipertermófilas pertenecientes a los dominios *Bacteria* y *Archaea*. Dentro del dominio *Bacteria*, *Aquifex pyrophilis* y *Thermotoga maritima* exhiben las mayores temperaturas de crecimiento, 95°C y 90°C, respectivamente y en el dominio

Archaea el límite conocido de temperatura es de 113°C en la especie *Pyrolobus furarii* (Madigan et al., 2009).

Para poder crecer los microorganismos hipertermófilos así como los termófilos necesitan de adaptaciones moleculares a la termofilia. Incluidos entre los hipertermófilos hay microorganismos pertenecientes a dos dominios filogenéticamente muy diferentes, por lo tanto las estrategias para adaptarse al calor son diferentes dependiendo de la posición filogenética de cada organismo (Madigan et al., 2009). El funcionamiento de sus macromoléculas es óptimo a altas temperaturas, sus enzimas y proteínas son termoestables. Varias enzimas termoestables han sido estudiadas y se ha encontrado que su secuencia de aminoácidos difiere en unos pocos residuos de la de enzima que cataliza la misma reacción en un microorganismo mesófilo y esa diferencia parece permitir que la enzima se pliegue de tal manera que sea termoestable (Madigan et al., 2009). Como todas las células, los microorganismos hipertermófilos producen chaperonas (proteínas que funcionan reconfigurando, al menos parcialmente, proteínas desnaturalizadas). La resistencia térmica del ADN doble hélice parece aumentar en hipertermófilos debido a la topoisomerasa denominada girasa reversa, la cual causa superenrollamiento positivo estabilizando el ADN y haciéndolo más resistente a la desnaturalización térmica. Además las *Archaeas* sp. hipertermófilas tienen histonas relacionadas filogenéticamente con las histonas eucariotas, las cuales al ser adicionadas a ADN purificado *in*

Vitro incrementan la temperatura de fusión drásticamente. Además de los otros componentes celulares las membranas celulares de los termófilos e hipertermófilos deben ser también termoestables. Los termófilos típicamente presentan lípidos ricos en ácidos grasos saturados, los cuales permiten que las membranas permanezcan funcionales y estables a altas temperaturas. La membrana lipídica de la bacteria hipertermófila *Thermotoga maritima* contiene un novedoso lípido con enlace éter, 15,16 dimetil-30 gliceroloxi-triacontanedioico, que a diferencia de los lípidos con enlaces éster encontrados en mesófilos, estabiliza la membrana frente a la descomposición por altas temperaturas. Los hipertermófilos, en su mayoría del dominio *Archea*, presentan lípidos en los cuales las cadenas laterales de fitano (cuatro unidades ligadas de isopreno) en las moléculas de un tetraéter se unen covalentemente entre sí, formando una membrana de arquitectura peculiar compuesta por una monocapa lipídica de mucho más resistencia que las membranas de bacterias y eucariotas (Stetter, 1999).

1.4. Aspectos biotecnológicos de los microorganismos extremófilos.

Los microorganismos termófilos e hipertermófilos ofrecen importantes ventajas en procesos tecnológicos y biotecnológicos, muchos de los cuales funcionan más rápido y eficazmente a altas temperaturas. Por esta razón las enzimas de los termófilos e hipertermófilos están siendo utilizadas cada vez más como biocatalizadores en distintas aplicaciones industriales así como

también en diversas técnicas de investigación biológica que necesitan de enzimas. Además de la taq y Pfu polimerasa usadas en PCR, se han aislado y caracterizado proteasas, amilasas, celulasas y xilanasas termoestables de varios termófilos e hipertermófilos (Madigan et al., 2009; Goh et al., 2013). Miembros del género *Anoxybacillus* han producido varios tipos de enzimas degradadoras de carbohidratos (Derekova, 2008). Enzimas termoestables activas en frío (de psicrófilos), activas en altas concentraciones de sal (de halófilos) o activas a pH alto o bajo (de alcalófilos y acidófilos, respectivamente) serán cada vez más usadas en la industria, en situaciones en las que se requiera una actividad biocatalítica en condiciones extremas.

Microorganismos termófilos son utilizados en procesos de biorremediación, siendo particularmente útiles en muchos casos por su habilidad de resistir altas temperaturas. Se ha utilizado *Anoxybacillus* para remover tinta de aguas residuales, mercurio, cromo y metales pesados de soluciones acuosas (Goh et al., 2013)

1.5. Producción de leche en polvo en Uruguay.

En Uruguay la producción y comercialización de leche en polvo ha crecido significativamente en la última década. Solamente un pequeño porcentaje del total de la producción de nuestro país es destinado al consumo interno de Uruguay, la mayoría se exporta. También ha aumentado

en la última década la comercialización de productos lácteos importados (DIEA, 2010).

1.6. Bacterias termófilas encontradas en leche en polvo.

La mayoría de las bacterias termófilas causantes de preocupación en las industrias lácteas pertenecen al género *Bacillus* o a géneros que antiguamente pertenecían a este género (Ronimus et al., 2003; Scott et al., 2007). En Nueva Zelanda las principales bacterias que causan preocupación en las industrias lácteas son *Anoxybacillus flavithermus* y *Geobacillus spp* (Flint et al., 2001b; Ronimus et al., 2003; Scott et al., 2007). Otros bacilos encontrados aunque en menores cantidades son los termófilos facultativos *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans* y *Bacillus subtilis* (Crielly et al., 1994; Ronimus et al., 2003). En Nueva Zelanda Flint et al. (2001b) identificó aislamientos en leche en polvo como *Geobacillus thermoleovorans* o *A. flavithermus* usando secuenciación parcial del gen que codifica el ARNr 16S. Ronimus et al. (2003) identificó a las bacterias termófilas aisladas de leche en polvo en ese mismo país en siete grupos: *G. stearothermophilus*, tres cepas de *A. flavithermus*, dos cepas de *B. licheniformis* y *B. subtilis*. Rückert et al. (2004) estudió el número y tipo de bacterias termófilas aisladas de veintiocho muestras de leche en polvo de dieciocho países diferentes siendo las tres cepas contaminantes más comunes: *G. stearothermophilus* cepa A, *A. flavithermus* cepa C y *B. licheniformis* cepa F. Estas tres especies coinciden

también con las identificadas en un estudio realizado en leche en polvo comercial china, en el cual estas tres especies representaron el 80.5 % de 801 aislamientos analizados. *B. subtilis* fue también identificado en ese estudio pero en mucha menor cantidad.

En leche en polvo de Uruguay, las principales especies de bacterias formadoras de esporas encontradas en orden de abundancia fueron: *B. licheniformis*, *A. flavithermus*, *B. subtilis* y *B. megaterium* (Reginensi et al., 2011).

1.7. Importancia de la contaminación de industrias lácteas por bacterias termófilas formadoras de esporas.

Las tendencias actuales de producir productos de mayor durabilidad, desarrollo de procesos más largos, requerimientos estrictos de higiene, conocimiento de problemas de salud causados por algunos microorganismos, hacen que haya un interés creciente en el estudio de mecanismos para controlar la contaminación dentro de las industrias lácteas (Flint et al., 1997).

Aunque los bacilos termófilos formadores de esporas no son en general patógenos (con excepción de *Bacillus cereus* para el humano), en el contexto de los productos lácteos son considerados indicadores de poca higiene (Burgess et al., 2010). Si las condiciones son apropiadas sus esporas

pueden germinar, producir enzimas con actividad proteolítica, lipolítica y amilolítica, y como consecuencia deteriorar y producir desarrollo de mal sabor en los productos (Chopra y Mathur, 1984). El potencial real de deteriorar productos lácteos es bajo en los termófilos obligados debido a que generalmente estos productos son almacenados a temperaturas inferiores a los 37°C, sin embargo en el caso de termófilos facultativos como *B. licheniformis* son capaces de producir sustancias extracelulares que afectan la calidad de la leche pasteurizada y cremas de leche (Burgess et al., 2010). Además grandes recuentos de bacterias de cualquier clase son inaceptables para la mayoría de los clientes.

Los bacilos termófilos son muy difíciles de eliminar debido a que forman endosporas resistentes a altas y bajas temperaturas, tienen tasas de crecimiento rápidas y amplios rangos de temperaturas de crecimiento (Burgess et al., 2010). Las esporas que predominan en leche en polvo son pertenecientes al género *Bacillus*, pero también se han identificado bacterias termófilas esporuladas del género *Anoxybacillus*.

1.8. Características de las biopelículas en general y en industrias lácteas.

Una biopelícula se define como una comunidad de células bacterianas que crecen y se reproducen en una matriz de exopolisacáridos adheridos a una superficie (Flint et al., 1997). Las biopelículas atrapan

nutrientes para el crecimiento microbiano y ayudan a evitar que se desprendan fácilmente las células expuestas a corrientes de líquido. El desarrollo de éstas puede ocurrir en casi cualquier superficie (animada o inanimada, viva o muerta, orgánica o inorgánica) de cualquier ambiente en el cual haya microorganismos viables. Su formación es un proceso dinámico que involucra una serie de etapas. En principio las bacterias junto con otras moléculas orgánicas o inorgánicas, como las proteínas de la leche, se adsorben a las superficies formando una película, la cual altera las propiedades fisicoquímicas de la superficie (cambios en hidrofobicidad o en cargas electrostáticas), e intervienen en las diferentes fases de eventos microbianos que ocurren para la formación de la biopelícula. La adhesión de una célula a la superficie, es una señal que desencadena la expresión de genes específicos para la biopelícula, los cuales sintetizan biomoléculas de señalización intercelulares e inician la formación de la matriz de exopolisacáridos. La comunicación intercelular es decisiva para el desarrollo y mantenimiento de la biopelícula. Moléculas señalizadoras intercelulares a medida que se van acumulando participan en un mecanismo denominado “quorum sensing”, en el que transmiten señales a células adyacentes de que la población de una determinada especie está aumentando y entonces se desarrolla la biopelícula (Madigan et al., 2009). No siempre los microorganismos se fijan a superficies acondicionadas, la microtopografía (presencia de grietas o hendiduras) de las superficies tienen mucho que ver

con la retención de bacterias en la superficie. Se ha estudiado que la adsorción de algunas proteínas a las superficies inhibe la fijación de bacterias, así como otras favorecen el proceso de fijación. Componentes de la leche como caseínas y β lactoglobulinas se ha visto que en determinadas condiciones inhiben la fijación de *Listeria monocytogenes* y de *Salmonella typhimurium* (Helke et al., 1993). El segundo paso en la formación de biopelículas es la unión pasiva o activa de los microorganismos a las superficies, para esta fase las propiedades fisicoquímicas de la superficie celular de las bacterias, la fase de crecimiento, así como la disponibilidad de nutrientes en el medio circundante son importantes. Esta unión es reversible e involucra interacciones débiles como fuerza de atracción de Van der Waals, fuerzas electrostáticas e interacciones hidrofóbicas. Durante esta etapa las bacterias pueden ser removidas fácilmente simplemente por enjuagues. Luego de la unión reversible la siguiente etapa es la unión irreversible, en la que actúan interacciones dipolo-dipolo, puentes de hidrógeno, enlaces iónicos y covalentes e interacciones hidrofóbicas. Se produce liberación de exopolisacáridos bacterianos que permite una asociación irreversible con la superficie. La remoción de células en esta etapa requiere de mayor fuerza. La hidrofobicidad de las superficies celulares, el pH y la temperatura de la superficie de contacto son factores que afectan la capacidad de adhesión de los microorganismos. La siguiente etapa es la formación de pequeñas colonias o microcolonias, las cuales se extienden formando luego una capa

de células que cubre la superficie con canales de agua altamente permeables entre ellas. El anclaje continuo de las células bacterianas, ayudado por la producción adicional de exopolisacáridos y otras biomoléculas con el crecimiento de estas células asociadas al mismo, forman la biopelícula o “biofilm”, la cual consta por lo general de múltiples capas. Las biopelículas formadas por varias especies en general son más gruesas y más estables que las formadas por una sola especie (Kumar et al., 1998).

Dentro de las biopelículas encontradas en las industrias lácteas, las denominadas de “proceso” son aquellas exclusivas de estas industrias, y que se forman en las superficies de las maquinarias en contacto directo con los productos fluidos. Estas biopelículas se caracterizan por la predominancia de una única especie de microorganismo y por un rápido desarrollo (Flint et al, 1997).

Los biofilms o biopelículas son una preocupación en las plantas lácteas de manufactura ya que las bacterias dentro de las biopelículas son más difíciles de eliminar que las bacterias en vida libre (no forman parte de microcolonias adheridas a superficie). Además después de establecidas actúan como una fuente de contaminación a los productos y a otras superficies. El tipo de bacterias en la leche puede reflejar el crecimiento de biopelículas. Las bacterias termófilas son pocas en la leche cruda y no es

probable que ocurra un crecimiento significativo en su número mientras la leche esta siendo procesada para producir leche en polvo debido al escaso tiempo de permanencia de la esta en la industria láctea. Además las bacterias termófilas no pueden crecer en todas las secciones de la línea de procesamiento, ya que esta restringido su crecimiento por factores como las temperaturas. A pesar de lo anterior se pueden encontrar altos recuentos en leche en polvo. Este hecho puede ser explicado por liberación de células individuales o fragmentos de biopelículas, lo cual también puede explicar un número mayor de termodúricos en la leche pasteurizada comparada con la leche cruda.

1.9. Ubicación de bacterias termófilas dentro de las industrias lácteas.

A. flavithermus se encuentra presente normalmente en bajos niveles en la leche cruda pero puede alcanzar niveles de 10^5 UFC/ml en el producto final luego de 15-20 hs de operación de la planta (Flint et al., 2001a; Rückert et al., 2004).

Las bacterias termófilas atacan las superficies de acero inoxidable dentro de las maquinarias de procesamiento de la leche en polvo, creciendo allí y formando biopelículas (Palmer et al., 2010). Son capaces de crecer dentro de los intercambiadores de calor y en los evaporadores, siendo los primeros un ambiente ideal para el crecimiento de *A. flavithermus* (Scott et

al., 2007). Esto es debido a que estas secciones de la planta de manufactura operan a temperaturas ideales para el crecimiento de bacterias termófilas, típicamente entre 45°C y 75°C. Tanto las esporas como las células vegetativas son capaces de atacar las superficies de las maquinarias de procesamiento de leche en polvo (Flint et al., 2001a; Parkar et al., 2001). Una vez que las esporas se unen a las superficies, probablemente germinan, crecen y forman la biopelícula, incluyendo al género *Anoxybacillus* (Burgess et al., 2009; Parkar et al., 2003). Al final de un ciclo la mayoría de las bacterias termófilas serán removidas o eliminadas por CIP (clean in place) y por la exposición a desinfectantes. Sin embargo, impurezas o biopelículas pueden proteger a las esporas y/o a las células vegetativas de la actividad de los desinfectantes en el proceso CIP (Parkar et al., 2001). Esto puede resultar en un remanente de células termófilas en la planta de procesamiento de lácteos que contaminará la próxima línea de manufactura.

1.10. Identificación y caracterización fenotípica de bacterias.

1.10.1. Caracterización morfológica y pruebas bioquímicas convencionales.

Habitualmente se utilizan características fenotípicas al describir una nueva especie o al intentar identificar una determinada bacteria de interés. Algunas de las características fenotípicas estudiadas son: morfología,

movilidad, metabolismo, fisiología, bioquímica celular, entre otras. Los resultados de las pruebas realizadas a las bacterias de interés se comparan en paralelo con organismos control conocidos o con datos bibliográficos existentes. Las pruebas bioquímicas permiten demostrar determinadas características bioquímicas, como la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer lo metaboliza o no. Algunas pruebas determinan la presencia o ausencia de una determinada actividad enzimática, reducción de compuestos inorgánicos como por ejemplo nitratos para la asimilación de nitrógeno o su utilización como aceptor final de electrones en la respiración anaeróbica, crecimiento a una determinada temperatura, crecimiento en presencia de inhibidores entre otras características.

1.10.2. Pruebas bioquímicas comerciales

Existen en el mercado sistemas comerciales de identificación que permiten una rápida y fácil interpretación de los resultados. El interés en sistemas miniaturizados de identificación permitió la introducción de sistemas comerciales en la década de los 60s y ellos suministraron ventajas: fáciles de utilizar, pequeño espacio de almacenamiento, mayor durabilidad y control de calidad estandarizado.

El sistema de identificación BIOLOG GEN III MICROPLATE™ es un micrométodo estandarizado que usa 94 pruebas bioquímicas (71 ensayos sobre utilización de fuentes de carbono y 23 ensayos sobre sensibilidad a químicos) para caracterizar e identificar un amplio rango de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Las pruebas se realizan en una microplaca de 96 pocillos. Se utiliza un indicador colorimétrico que cambia de incoloro o púrpura en los casos en que se produce la utilización de las fuentes de carbono o la resistencia a químicos inhibitorios por parte de los microorganismos a identificar. Luego de la incubación de los aislamientos a ser identificados en la placa, la huella fenotípica de los pocillos de color púrpura son comparados con la biblioteca de especies de Biolog y si existe coincidencia se produce la identificación a nivel de especie (Biolog, 2013)

Los sistemas de identificación BBL CRYSTAL™ (Becton Dickinson) son utilizados en muchos laboratorios. Muchas de las pruebas usadas en este sistema son modificaciones de los métodos clásicos incluyendo pruebas de fermentación, oxidación, degradación e hidrólisis de diversos sustratos. Además se usan sustratos cromógenos y fluorógenos para detectar enzimas microbianas utilizadas por los microorganismos para metabolizar algunos sustratos.

BD BBL™ Enterotube™ II (Beckton Dickinson) es un sistema de identificación de Enterobacterias. Consiste en 12 medios de cultivo que

permiten la realización simultánea de 15 pruebas bioquímicas. Oxi/Ferm™ Tube II (Beckton Dickinson) consta de un tubo de plástico con 12 medios de cultivo que permite la identificación de bastones Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos y oxidasa positivos a partir de 14 pruebas bioquímicas que se realizan simultáneamente (Koneman et al, 2008)

API (BioMérieux) son sistemas estandarizados para la identificación de microorganismos pudiendo identificar más de 600 especies diferentes. API 20E combina una serie de pruebas bioquímicas y una base de datos. API/ID32 posee el mayor alcance disponible, incluye 15 sistemas de identificación que introduce una versión estandarizada y miniaturizada de las técnicas ya existentes, cubriendo todos los grupos encontrados en los laboratorios de microbiología industrial: *Listeria*, *Staphylococci*, *Enterobacteriaceae*, bastones Gram negativos no fermentativos, *Bacillus* y *Lactobacillus*. Continuamente se actualizan las bases de datos para estos sistemas de identificación haciendo la interpretación posible en todo momento y en todo lugar vía Internet (Biomérieux industry, 2013)

1.10.3. Perfiles de proteínas totales bacterianas por SDS- PAGE.

La identificación de bacterias por sus perfiles proteicos totales obtenidos por SDS-PAGE se basa en que cuando las proteínas se exponen al detergente iónico fuerte dodecil sulfato de sodio (SDS) y a un agente reductor como el

mercaptoetanol, se desnaturalizan. En promedio se une una molécula de SDS por cada dos residuos de aminoácidos. Los iones de SDS cubren la cadena polipeptídica y le otorgan una carga negativa uniforme. Debido a que la cantidad de SDS que se une a las proteínas es prácticamente proporcional a su tamaño, los complejos SDS-proteínas presentan un valor carga/masa constante y por lo tanto se separan de acuerdo a su tamaño cuando migran desde el cátodo al ánodo a una velocidad relacionada con su peso molecular (Watson et al., 2005). Este es un método fenotípico complementario a otras técnicas de identificación, que ha probado ser confiable para comparar y agrupar un gran número de bacterias. Ha sido utilizado en un estudio sobre la ocurrencia de bacterias termófilas en leche en polvo comercial en China. Dicho estudio permitió agrupar gran número de aislamientos similares, previo a una identificación por secuenciación parcial del gen para el ARNr 16S, sugiriendo que esta técnica es confiable para distinguir bacterias termófilas en leche en polvo (Yuan et al., 2012). Se ha observado que organismos con el mismo patrón de proteínas podrían pertenecer a la misma especie (Moore et al., 1980)

1.11. Generalidades de la identificación y caracterización genotípica de bacterias.

El desarrollo de la biología molecular ha creado una nueva era de metodologías para la detección, identificación y caracterización de microorganismos. Las técnicas genéticas han aportado un mayor nivel de

precisión, complementando a las técnicas como tinción Gram y pruebas bioquímicas convencionales.

En la década de los años 80s se empezaron a desarrollar nuevas técnicas para identificar bacterias. Los investigadores han observado que las relaciones filogenéticas entre todas las formas de vida, incluidas las bacterias, pueden ser determinadas por comparación de partes estables del material genético. En las bacterias, los candidatos para este fin incluyeron los genes que codifican las subunidades 5S, 16S (subunidad pequeña) y 23S del ARNr, y los espacios entre estos genes.

1.11.1. ARNr 16s

La técnica molecular más utilizada actualmente para propósitos taxonómicos involucra el gen que codifica para la subunidad del ARNr 16S. La comparación de secuencias del ARNr requiere la amplificación del gen que codifica el ARNr 16S, su secuenciación y el análisis de la secuencia en relación con otras secuencias obtenidas de bases de datos como Gen Bank (USA), DDSS (Japón) o EMLB (Alemania) (Madigan et al., 2009).

1.11.2. RAPD- PCR

Entre las técnicas de perfiles de ADN se encuentra la amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD-PCR). Esta es una de las técnicas más

versátiles desde que fue desarrollada por Williams et al. (1990). Utiliza cebadores cortos, usualmente de diez nucleótidos de longitud, para amplificar por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), áreas específicas distribuidas al azar en el genoma. Su pequeñez y la baja temperatura de alineamiento permiten que cada cebador se una a varias secuencias en el genoma, permitiendo amplificar muchos fragmentos de ADN. Estos fragmentos amplificados se pueden separar por electroforesis en geles de agarosa, haciendo de este ensayo una manera eficiente de mostrar polimorfismos de secuencias de nucleótidos entre individuos o grupos de individuos, proporcionando una huella característica. Una de las ventajas de esta técnica es que no se necesita información de la secuencia de ADN y además el procedimiento es relativamente rápido y fácil de llevar a cabo (Tingey et al., 1993). RAPD-PCR ha sido utilizado para identificar especies de *Bacillus* termófilos y no termófilos (Ronimus et al., 1997), específicamente en identificación y caracterización de bacilos termófilos encontrados en leches en polvo (Ronimus et al., 2003; Rückert et al., 2004; Ronimus et al., 2006; Reginensi et al., 2011).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general.

Caracterizar fenotípica y genotípicamente aislamientos de cepas de *Anoxybacillus* provenientes de leches en polvo comerciales uruguayas.

2.2. Objetivos específicos.

- Caracterizar por pruebas bioquímicas primarias y secundarias los aislamientos de presuntas bacterias del género *Anoxybacillus*.
- Determinar actividad proteolítica, lipolítica y amilolítica de cada aislamiento.
- Identificar por técnicas genéticas los aislamientos.
- Estudiar la formación de biofilm a través de la capacidad de adhesión a placas de polipropileno.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Preparación de muestras y selección de aislamientos.

Para la obtención de nuevos aislamientos 10 bolsas de leche en polvo producidas en Uruguay fueron obtenidas de varios comercios y se procesaron en el laboratorio de la Unidad de Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Agronomía. Para el análisis de las muestras se pesaron en condiciones de esterilidad 10 g de leche en polvo, se añadieron 90 ml de agua peptonada estéril y se homogenizó usando un Stomacher ®400 Circulator (Seward Ltd., UK). Las muestras se trataron a 80°C, por 10 minutos previo a la siembra (Rückert et al., 2004). Se transfirieron 100µl de las muestras a Tryptic Soy Agar (TSA, Oxoid Ltd., UK). Se incubaron a 55°C (Ronimus et al., 2006) por 24 hs. Luego de la incubación de cada placa, se seleccionaron 20 colonias muy sugestivas de ser *Anoxybacillus sp.*, las cuales fueron subcultivadas para obtener colonias puras. Se les realizó tinción Gram y observación al microscopio y se le realizaron las pruebas bioquímicas. A partir de los resultados se seleccionaron las cepas: 24.1, 1502, 1603, 1270 para las siguientes pruebas de caracterización e identificación. Se utilizaron como cepas de referencia *A. flavithermus*

pertenecientes al laboratorio de la Unidad de Tecnología de los alimentos (A1, A12, UY 1409).

Tabla 1. Números de aislamientos y orígenes, utilizados en este trabajo.

Número de cepa	Origen
A1	Cepa de la colección del Laboratorio
A12	Cepa de la colección del Laboratorio
UY 1409	Cepa de la colección del Laboratorio
1270	Leche en polvo comercial
24.1	Leche en polvo comercial
1502	Leche en polvo comercial
1603	Leche en polvo comercial

3.2. Caracterización de las cepas por la morfología de sus colonias, morfología de células, presencia de esporas y posición.

Las cepas aisladas se sembraron en placas con medio TSA y se incubaron a 55°C por 48hs. Luego se realizó una evaluación visual de las

colonias teniendo en cuenta las siguientes características: tamaño, color, elevación y bordes.

Se caracterizó la morfología de las células, la presencia y la posición de las esporas de cada una de las cepas aisladas, mediante tinción Gram y observación al microscopio.

3.3. Caracterización fenotípica de los aislamientos por pruebas bioquímicas.

Todas las pruebas bioquímicas de rutina utilizadas en el laboratorio fueron inoculadas a partir de un cultivo puro en TSA.

3.3.1. Enzima catalasa.

Se transfirieron con un palillo estéril, células del centro de una colonia aislada a la superficie de un portaobjetos en el que se colocó una pequeña gota de peróxido de hidrogeno al 3%. La rápida aparición y producción sostenida de burbujas de gas, indica la presencia de la enzima catalasa.

3.3.2. Ensayo de Sulfuro-Indol-Motilidad (SIM).

Se inocularon con anza recta tubos conteniendo 5 ml del medio SIM (Difco, Lb., USA). La inoculación se realizó en el centro de los tubos, en línea recta y abarcando dos tercios de la profundidad del tubo. Los tubos se incubaron a 55° C durante 24 hs. Luego de la incubación se agregaron 3-5

gotas de reactivo de Kovac`s. Las cepas se consideraron H<sub>2</sub>S positivas si se produjo un ennegrecimiento a lo largo de la línea de siembra o en todo el medio, Indol positivas en el caso de producirse compuestos de color rojizo en el medio al añadir el reactivo de Kovac`s, lo cual indica la presencia de la enzima triptofanasa y móviles en caso de producirse turbidez del medio más allá de la línea de siembra.

3.3.3. Fermentación de azúcares

Para determinar la capacidad de fermentar azúcares se inocularon tubos conteniendo 5 ml de un caldo con glucosa o manitol como única fuente de carbono, peptona y rojo fenol como indicador de pH (Koneman et al., 2008). Se incubaron a 55°C por 24 hs. El viraje hacia color amarillo del indicador de pH significa acidificación y el viraje hacia rojo significa alcalinización. La prueba se consideró positiva en el caso de observarse crecimiento y un viraje del indicador hacia el color amarillo. Además en los tubos con glucosa se colocaron tubos de Durham para detectar la formación de gas, lo cual es característico en la fermentación de glucosa.

3.3.4. Ensayo de triple azúcar hierro (TSI)

Se inocularon por punción tubos conteniendo 5 ml de medio TSI (Difco, Lb., USA) en forma de pico de flauta, introduciendo la punta hasta 3 a 5 mm del fondo del tubo. Tras retirar la punta del fondo se estrió el pico con

un movimiento hacia uno y otro lado. Se incubaron los tubos a 55°C durante 24 hs.

La fermentación de azúcares se determinó por el viraje de color del indicador de pH (rojo fenol) en la porción inclinada (pico) o en la porción inferior (fondo) del tubo. Se interpretó que las bacterias eran fermentadoras de glucosa (sin fermentación de lactosa ni sacarosa) si el indicador de pH viró hacia amarillo en todo el tubo en las primeras 10-16 h., y al continuar la incubación el pico retorno a color rojo por degradación aerobia de las peptonas que producen aminos. Se consideró positiva la fermentación de lactosa y/o sacarosa si el indicador de pH viró a color amarillo en todo el tubo. En los casos en que se observó pico y fondo alcalinos se consideró que no hubo fermentación de azúcares. La producción de H₂S y gas se puso en evidencia en caso de observarse un precipitado negro en el fondo del tubo y la formación de burbujas respectivamente.

3.3.5. Ensayo de Rojo de Metilo - Voges-Proskauer (RM-VP).

Se inocularon tubos conteniendo caldo RM-VP (Rojo de metilo-Voges-Proskauer) (DIFCO, Lab., USA) y se incubaron a 55°C por 48 hs. Luego de la incubación se dividió el contenido de cada tubo en dos tubos limpios, para hacer los dos ensayos por separado.

Para revelar VP se agregaron diez gotas de alfa-naftol al 5% y una gota de KOH al 40%. El desarrollo de color rojo-fucsia luego de 15 minutos indicó la presencia de diacetilo, producto de oxidación de la acetoína (intermediario en la producción de butanodiol) y por lo tanto las bacterias fermentaron la glucosa por la vía del butanodiol.

El revelado de RM se realizó agregando 4-8 gotas del indicador rojo de metilo. El desarrollo de un color rojo indicó que se produjo suficiente ácido como para producir el viraje del indicador de pH y por lo tanto las bacterias fermentaron la glucosa por la vía de ácido mixta.

3.3.6. Reducción de nitrato

Las bacterias se inocularon en un medio líquido conteniendo nitrato de potasio, extracto de carne y peptona (Difco, LB., USA) y se incubaron a 55°C por 24 hs. La presencia de nitritos en el medio se detectó añadiendo 1 ml de α -naftilamina y 1 ml de ácido sulfanílico con la formación de un colorante rojo de diazonio, p-sulfobenceno-azo- α -naftilamina. El desarrollo de color rojo a los 30 segundos de añadir los reactivos indica la presencia de nitritos y representa una reacción positiva para la reducción de nitratos. La ausencia de color tras el agregado de los reactivos puede indicar que los nitratos no han sido reducidos o que han sido reducidos a productos distintos de los nitritos, como amoníaco, nitrógeno molecular (desnitrificación), óxido nítrico

(NO) u óxido nitroso (N₂O), e hidroxilamida. Para evitar falsos negativos es necesario agregar una pequeña cantidad de zinc a todas las reacciones negativas. Los iones zinc reducen los nitratos a nitritos y el desarrollo de color rojo tras agregar polvo de zinc indica la presencia de nitratos residuales y confirma la reacción negativa verdadera.

3.3.7. Enzima Ureasa

Se inocularon tubos conteniendo caldo urea y se incubaron a 55°C por 24 hs. La prueba se consideró positiva en el caso de aparición de coloración rojiza en el medio, lo cual indica alcalinización e hidrólisis de urea. (Koneman et al., 2008)

3.3.8. Enzimas β galactosidasa y β glucoronidasa.

En los estudios para la caracterización enzimática de β galactosidasa y β glucoronidasa se utilizaron discos impregnados con los sustratos: o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido y fenoftalein- β -glucurónido respectivamente, introducidos en tubos estériles con 500 μ l de agua estéril y una anizada de la bacteria en estudio, la lectura se realizó luego de 3 hs. de incubación. En ambos casos la lectura se interpretó como positiva si se produjo cambio de color incoloro a color amarillo, indicando el crecimiento y la utilización de los sustratos (Quintet 3H Enterobacteriaceae, Sanofi Diagnostics Pasteur, Inc.).

3.4. Caracterización de los aislamientos mediante los perfiles proteicos.

Se cultivaron los aislamientos en caldo TS (TSB, Oxoid Ltd., UK) hasta fase exponencial tardía de crecimiento y se obtuvieron las muestras para el posterior análisis de las diferentes cepas. Las proteínas totales fueron extraídas según el siguiente procedimiento modificado de Gómez Zavaglia et al. (1999). Las células se cosecharon por centrifugación a 7000g durante 10min. a 4°C y se realizaron 2 lavados con PBS (buffer fosfato salino). Se tomaron 100 µl de suspensión celular e igual volumen de una solución al 10% de lisozima y se incubó a 37°C durante 3hs. Luego se agregaron 50 µl de SDS (dodecil sulfato de sodio) al 20% y se incubó a 100°C durante 10min, seguido de una centrifugación a 10.000g durante 10min a 4°C. Los sobrenadantes conteniendo las proteínas totales se resolvieron mediante SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10%, con un gel concentrador al 4%. Se sembró también el marcador de peso molecular PageRuler Prestained Protein Ladder, apparent MW, kDa (Fermentas Life Sciences). Se corrió a 20 mA durante 2-3 hs aproximadamente. El revelado se realizó con azul de Coomassie y su posterior desteñido con ácido acético (10%) y etanol (5%).

3.5. Caracterización genotípica.

3.5.1. Extracción de ADN genómico.

A partir de cultivos puros de 20 aislamientos se seleccionaron 4 cepas (24.1, 1270, 1502, 1603) para proseguir con la caracterización genética. A partir de estas 4 cepas y de las cepas de referencia del laboratorio de la Unidad de Tecnología de los Alimentos (A1, A12, UY 1409), se inocularon tubos conteniendo 3ml de caldo TSB y se incubaron a 55°C por 24 hs. Se cosecharon las células mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 5 minutos, en una centrifuga Spectrofuge 7M (Labnet International Inc. USA). La obtención del ADN se realizó utilizando un Kit comercial de ADN genómico (Fermentas Internacional Inc., USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizaron alícuotas del ADN obtenido para su utilización como molde en las reacciones de amplificación.

3.5.2. RAPD-PCR usando cebador OPR 13.

La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de reacción de 25 µl conteniendo: 1X Thermo buffer, 2.5mM de MgCl₂, 200µM de cada dNTP (Fermentas, USA), 1U de Taq polimerasa (Fermentas, USA), 1 µM de primer OPR13 (5'-GGACGACAAG-3') (Ronimus et al., 1997) y 5 µl del DNA molde. Las mezclas de reacción se procesaron en un termociclador Corbett CG1-96 con un palmtop computer interface (Corbett Research Ltd., Cambridge, UK)

según el siguiente programa: 3 min y 45 seg. a 94°C; luego fueron sometidos a 35 ciclos cada uno de: 15 s a 94°C- 15 s a 36°C- 2 min. a 72°C; finalmente un paso de extensión final de 4 min. a 72°C (Ronimus et al., 1997). Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa al 1.5% utilizando buffer Tris-Borato- EDTA (TBE) y conteniendo 0.5µg/ml de Good View (SBS Genetech Co., Ltd). El marcador de peso molecular utilizado fue GeneRuler 100pb Plus DNA Ladder (Fermentas Life Sciences). La electroforesis se realizó a 10 V/cm por 1 h. Las bandas se visualizaron en un transiluminador UV.

3.5.3 Análisis de la secuencia del gen del ARNr 16S.

Los aislamientos seleccionados fueron identificados mediante análisis de secuencia del gen ARNr 16S. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 µl conteniendo: 1X Thermo buffer (Fermentas, USA), 2,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP (Fermentas, USA), 1U Taq polymerase (Fermentas, USA), 0,2 mM de cada cebador (fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Weisburg et al., 1991) y 20 ng de ADN molde. Los cebadores se utilizaron para amplificar un fragmento de 1540 pares de bases del gen del ARNr 16S (Weisburg et al., 1991) y los productos de amplificación fueron purificados y secuenciados por MacroGen Sequencing Service, Korea. Las secuencias de DNA se compararon con las depositadas en la base de datos

NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para la identificación de los aislamientos basados en la similitud de secuencias.

3.6. Actividad proteolítica, lipolítica y amilolítica en placa.

Para cada uno de los aislamientos seleccionados se evaluó: a) la actividad proteolítica, mediante siembra en superficie en placas de TSA adicionado con caseína al 2%; b) la actividad lipolítica mediante siembra en superficie en placas de agar Spirit Blue (Difco); c) la actividad amilolítica mediante la siembra en superficie en placas de TSA adicionada con almidón al 1%, revelando la actividad enzimática luego de 48 hs. de incubación con una solución de Lugol (0.3% de I). Se verificará la presencia de una zona clara alrededor de la colonia (halo), lo cual indicará la presencia de actividad proteolítica, lipolítica o amilolítica.

3.7. Ensayo para determinar la formación de biofilm.

Para cada aislamiento se evaluó su capacidad de formar biofilm. Los aislamientos fueron cultivados en caldo TS a 50°C durante 24 hs. Los cultivos se ajustaron a una densidad óptica de 0.1 de absorbancia a 600nm, se inocularon al 1% en medio TSB en una placa de polipropileno estéril de 96 pocillos. Se incubaron con agitación a 50°C durante 48 hs, luego de los cuales se evaluó la capacidad de formar biofilm según la metodología propuesta por Auger et al. (2006), usando triplicados por cada cepa. Los

pocillos fueron lavados dos veces con PBS y las células adheridas fueron teñidas con solución de cristal violeta al 1%, a temperatura ambiente por 20 minutos. Luego las células fueron lavadas tres veces con PBS (tampón fosfato salino) estéril, el colorante se solubilizó con etanol absoluto y se midió la densidad óptica a 490 nm. Se define el coeficiente de adhesión como la relación entre la absorbancia a 490 nm de la muestra y la absorbancia a 490 nm del control sin inocular. Valores mayores a 1 indican formación de biofilm y adhesión a la superficie.

4. RESULTADOS

Las muestras de leche en polvo comercial uruguaya fueron calentadas a 80°C por 10 min. Este tratamiento permite aislar de forma selectiva microorganismos formadores de esporas ya que mata las células vegetativas pero mantiene viables las esporas presentes. Reginensi et al. (2011) notó que la ocurrencia de *A. flavithermus* se incrementaba mediante este tratamiento de las muestras. Luego las muestras fueron sembradas en medio TSA e incubarlas a 55°C por 24 hs. Los 20 aislamientos seleccionados al azar presentaron los mismos resultados en las pruebas bioquímicas y las características morfológicas de las células al microscopio fueron similares, por lo que se seleccionaron al azar 4 cepas para las demás pruebas de caracterización e identificación (1270, 1502, 1603, 24.1). Se compararon con las cepas de referencia de *A. flavithermus* (A1, A12, UY 1409).

4.1. Caracterización fenotípica.

4.1.1. Características morfológicas de colonias y células.

Las características morfológicas de los aislamientos incluyen la descripción macroscópica de las colonias, descripción microscópica de la forma y tamaño celular, la coloración Gram y la movilidad. La descripción de la morfología de las colonias (forma, bordes, color, elevación) se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Descripción de la morfología de las colonias en medio TSA.

Número de aislamiento	Características morfológicas de las colonias en medio TSA luego de 24 hs de incubación a 55°C.
A1	Forma circular, bordes irregulares, color crema con centro más oscuro, convexa, tamaño pequeño.
A 12	Forma circular, bordes regulares, color crema claro, convexa, tamaño mediano.
UY 1409	Forma circular, bordes regulares, color crema , convexa, tamaño pequeño
24.1	Forma circular, bordes irregulares, color crema con centro más oscuro, convexa, tamaño pequeño
1270	Forma circular, bordes regulares, color crema con centro más oscuro, convexa, tamaño mediano
1502	Forma circular, bordes irregulares, color crema con centro más oscuro, convexa, tamaño mediano
1603	Forma circular, bordes regulares, color crema, convexa, tamaño pequeño

Las células obtenidas de colonias puras de cada uno de los aislamientos y teñidas con tinción Gram resultaron ser bastones Gram +, pleiomórficas, esporuladas (esporas terminales, en varios casos con esporangio hinchado,"forma de clavo"). Al observar al microscopio, en un mismo preparado se pudo observar típicamente bastones rectos, bastones curvados y variadas morfologías, típico de *A. flavithermus* (figura 1). Se examinaron al microscopio células viables de cada uno de los aislamientos constatándose que se trataba de células móviles.

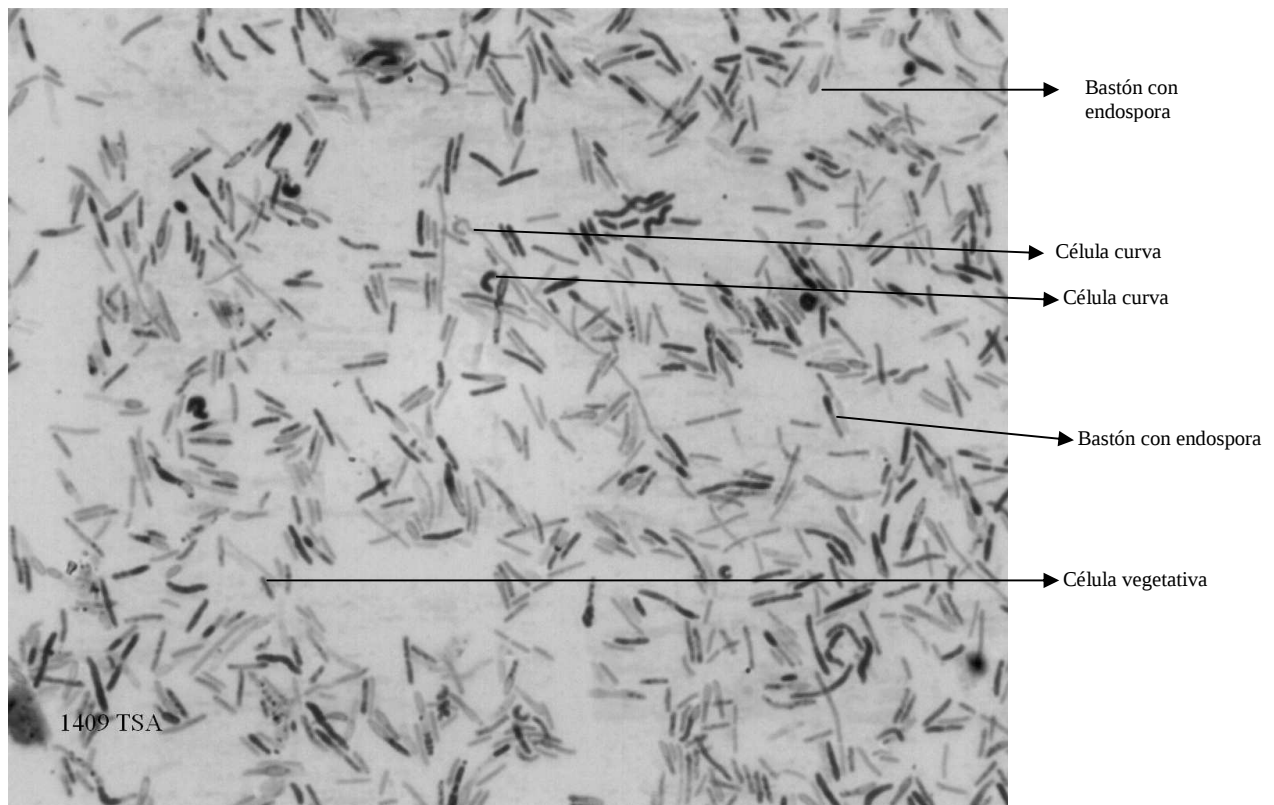


Figura 1. Vista microscópica (100X, microscopio óptico) de la cepa UY 1409 en medio TSA luego de 24 hs. de crecimiento, observando la morfología típica de sus células y esporas.

4.1.2 Caracterización bioquímica

En la tabla 3 se observan los resultados correspondientes a las pruebas bioquímicas realizadas a los cuatro aislamientos estudiados en este trabajo y las cepas de referencia. Todos los aislamientos estudiados resultaron ser catalasa positivos, y fermentaron glucosa y manitol.

Tabla 3. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a los aislamientos (24.1, 1270, 1502, 1603) y las cepas de referencia (A1, A12, UY 1409).

Aislamiento	catalasa	Fermentación de glucosa	Fermentación de manitol	TSI	SIM	Rojo de metilo	Voges- Proskauer	Reducción de nitrato	Ureasa	β galactosidasa	β glucoronidasa
A1	+	+	+	A/A	-/-/+	+	-	+	-	+	-
A 12	+	+	+	A/A	-/-/+	+	-	+	-	+	-
UY140	+	+	+	A/A	-/-/+	+	-	+	-	+	-
1270	+	+	+	A/A	-/-/+	+	-	+	-	+	-
24.1	+	+	+	A/A	-/-/+	+	-	+	-	+	-
1502	+	+	+	A/A	-/-/+	+	-	+	-	+	-
1603	+	+	+	A/A	-/-/+	+	-	+	-	+	-

TSI (A/A = pico ácido / fondo ácido);

SIM (presencia de H₂S / presencia de Indol / movilidad)

Los resultados de la prueba TSI indicaron que los aislamientos y las cepas de referencia fermentan glucosa y lactosa y/o sacarosa, no observándose producción de gas ni H₂S.

La prueba bioquímica SIM indicó que todas las cepas bacterianas estudiadas carecen de la enzima triptofanasa ya que no se observó el anillo rojo característico luego de añadir al medio SIM el reactivo de Kovac`s. Tampoco se observó ennegrecimiento al lo largo de la línea de siembra aunque si se observó crecimiento más allá de ella por lo que se interpretan

como H₂S negativas y móviles. En todos los casos la reacción de rojo de metilo (RM) resultó positiva, por lo que se deduce que los microorganismos en estudio fermentan la glucosa por la vía de ácido mixta y acidifican el medio de cultivo. Las cepas estudiadas no fermentan la glucosa por la vía del 2,3 butanodiol.

La reducción de nitratos fue positiva para todos los aislamientos, produciéndose reducción de nitrato a nitrito, detectándose con los reactivos correspondientes.

Los aislamientos analizados en caldo urea no presentan la enzima ureasa.

Los cuatro aislamientos dieron positivo para la enzima β galactosidasa, produciéndose cambio de color de los discos lo cual indica la presencia de la enzima que hidroliza el sustrato, y todos resultaron negativos para la enzima β Glucoronidasa., al igual que las cepas de referencia.

El crecimiento en placas con medio TSA e incubadas a 37°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C fue positivo para los aislamientos estudiados en este trabajo, observándose el crecimiento de las colonias típicas de cada cepa,

4.1.3 Caracterización fenotípica por perfiles de proteínas.

Se ha comprobado que el análisis de los patrones de proteínas totales obtenidos a partir de SDS-PAGE ha resultado muy confiable y es una herramienta más para comparar y agrupar un gran número de bacterias (Gomez-Zavaglia et al., 1999).

En la figura 2 se observan los perfiles de proteínas totales de los cuatro aislamientos estudiados en este trabajo (24.1, 1270, 1502, 1603) y las cepas de referencia A12 y UY1409. Observando los perfiles se puede agrupar a los aislamientos en 3 grupos, cada uno con la misma cantidad y tamaño de bandas: grupo1 (UY1409, 1270,24.1), grupo 2 (A12, 1502), grupo 3 (1603); aunque los tres grupos concuerdan en la mayoría de las bandas excepto en las bandas de mayor tamaño.

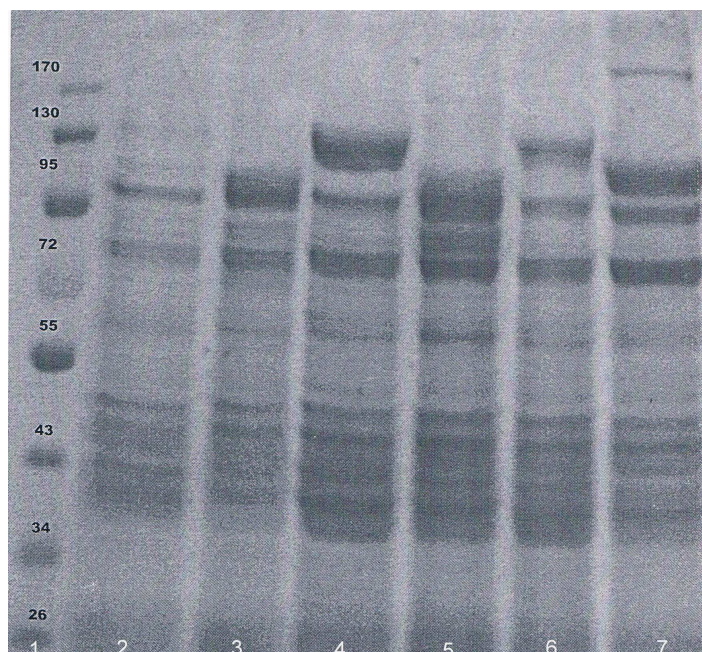


Fig.2. SDS-PAGE de perfiles de proteínas totales, en un gel de poliacrilamida al 10%, con un gel concentrador al 4%. Carriles (1: Marcador de peso molecular (MPM), 2: UY 1409, 3: 1270, 4: A12, 5: 24.1, 6: 1502, 7: 1603). El tamaño en Kda del MPM esta indicado en el margen izquierdo de la figura.

4.2. Caracterización genotípica

4.2.1. RAPD- PCR

Los perfiles de ADN obtenidos por RAPD-PCR utilizando el cebador OPR13 de los aislamientos 24.1, 1270, 1502, 1603 y de las cepas de referencia de *A. flavithermus* (A1, A12, UY 1409), muestran tres bandas bien marcadas de aproximadamente 1600, 1000 y 450 pares de bases, así como

dos bandas más tenues de aproximadamente 650 pb y 2600 pb, como se observa en la figura 3.

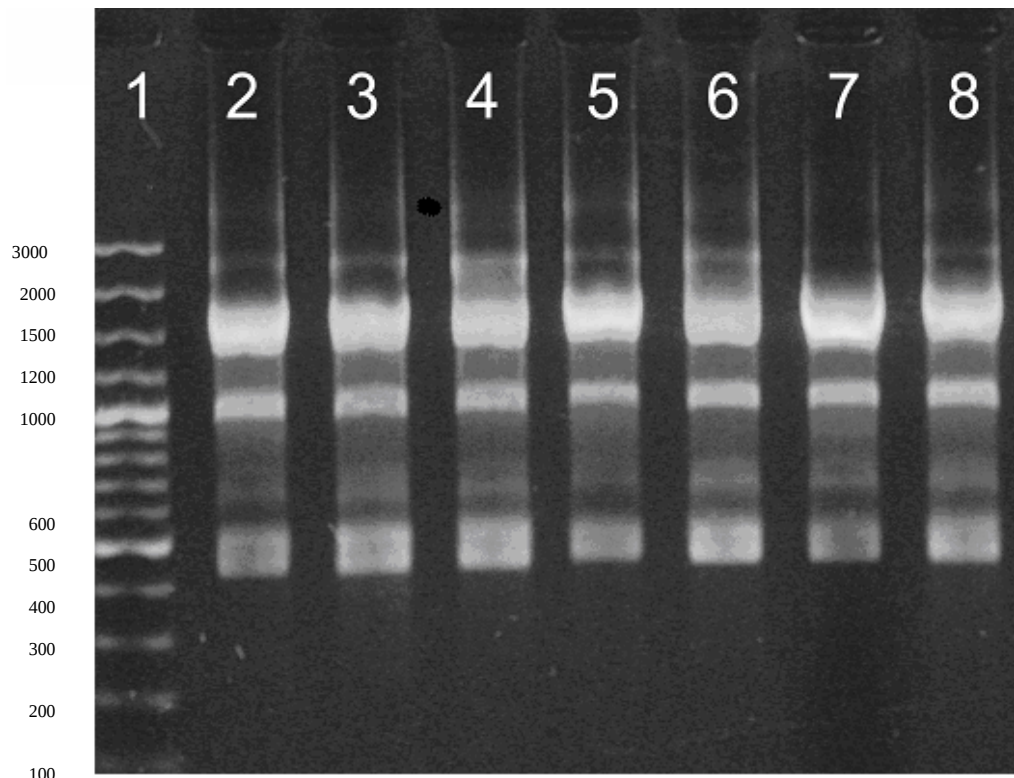


Fig.3. Perfiles de ADN producto de RAPD- PCR de los aislamientos obtenidos de leche en polvo y de las cepas de referencia de *A. flavithermus* del laboratorio, corridos en electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Carril 1: Marcador de peso molecular; carriles 2-4 (cepas de referencia A1, A12, UY1409, respectivamente); carriles 5-8 (nuevos aislamientos: 24.1, 1502, 1603, 1270, respectivamente). El tamaño en pares de bases del marcador de peso molecular está indicado en el margen izquierdo de la figura.

4.2.2. Identificación de los aislamientos mediante análisis de la secuencia codificante del ARNr 16S de los aislamientos.

Mediante la amplificación, purificación, secuenciación y comparación con las secuencias depositadas en la base de datos NCBI BLAST del

fragmento de 1540 pb. del gen que codifica el ARNr 16S se encontró una similitud mayor al 98 % de los cuatro aislamientos con la especie *Anoxybacillus flavithermus* lo cual permitió identificarlos como pertenecientes a esta especie.

4.3. Proteólisis, lipólisis y amilólisis.

Las actividades proteolíticas y lipolíticas analizadas mediante siembra en superficie en placas de medio de cultivo TSA adicionado con caseína al 2% y siembra en superficie en placas de medio de cultivo Agar Spirit Blue, respectivamente, resultaron positivas para las cepas estudiadas, siendo los halos pequeños y similares para las distintas cepas. La actividad amilolítica resultó negativa en todos los casos.

4.4. Formación de biofilm

Uno de los objetivos específicos de este trabajo fue estudiar la formación de biofilm a través de la capacidad de adhesión a superficies lisas con el ensayo de tinción con cristal violeta. La tabla 4 muestra los valores de absorbancia a 490 nm, los cuales resultaron mayores al control para los seis aislamientos. Por lo tanto los coeficientes de adhesión son mayores a 1 y esto indica que hubo adhesión a la superficie de los pocillos por parte de los microorganismos. El aislamiento 1502 presentó el valor de coeficiente de adhesión mayor (2.55)

Tabla 4. Valores de Absorbancia a 490nm y coeficientes de adhesión de cada aislamiento.

Número de cepa	Absorbancia 490nm	Coeficiente de adhesión
Control	0.1345	1.00
A1	0.2580	1.92
A12	0.2427	1.80
1409	0.2605	1.94
1270	0.2705	2.01
24.1	0.2597	1.93
1502	0.3434	2.55
1603	0.2326	1.73

5. DISCUSIÓN.

Mediante el análisis de las características fenotípicas y su comparación con las cepas de referencia de *A. flavithermus* correspondientes a la colección del Laboratorio (cepas A1, A12, UY 1409), análisis de los perfiles de ADN con la técnica RAPD- PCR y el análisis de la secuencia parcial del gen que codifica el ARNr 16S se identificaron las cepas (24.1, 1502, 1603, 1270) como pertenecientes a la especie *A. flavithermus*.

En los perfiles de ADN de las cepas analizadas por RAPD- PCR con el cebador OPR 13 se observan tres bandas de mayor intensidad (1600, 1000 y 460 pares de bases) (Fig. 4). Los tamaños de estas bandas coinciden con los tamaños de bandas de los perfiles de *A. flavithermus* cepa C (UY 1409) aislados de leche en polvo comercial en Uruguay descritos por Reginensi et al. (2011), lo cual confirmó la identificación de las cepas. Mediante esta misma técnica y con este mismo cebador se analizaron los perfiles de ADN de *A.flavithermus* cepa C aislados de leche en polvo en Nueva Zelanda así como los perfiles de ADN de esta especie correspondientes a nueve países (Alemania, Estados Unidos, Francia, Sudáfrica, Tailandia, Nueva Zelanda, Gran Bretaña, Canadá y México) y en todos ellos se destacaban en intensidad cuatro bandas, tres de las cuales se corresponden con 1600, 1000 y 460 pb, con excepción de Francia en la que faltó la banda característica de 1000 pb (Ronimus et al., 2003; Rückert et al., 2004).

Las colonias de *A.flavithermus* fueron descritas por primera vez por Heinen et al. (1982) y luego por Pikuta et al. (2000) como de color amarillo brillante. Se descubrió que el color amarillo se debía a un carotenoide encontrado en la membrana citoplasmática de la bacteria, el cual era fotosensible (Heinen et al., 1982). Esta descripción no se corresponde con el color crema de las colonias de los aislamientos estudiados en este trabajo, sin embargo hay evidencia de variaciones en esta característica entre diferentes cepas de esta misma especie. Un ejemplo es la descripción de las colonias de *A. flavithermus spp yunnanensis* como de color crema, lisas, con bordes redondeados (Dai et al., 2011). Se deberían realizar análisis adicionales para valorar la posibilidad de que las cepas analizadas pertenezcan a esta subespecie, una de ellos debería ser el análisis de la capacidad de crecer en presencia de etanol.

Las células obtenidas de colonias puras de los aislamientos estudiados en este trabajo fueron bastones Gram +, con endosporas terminales, pleiomórficas (ocurrencia de bastones curvados y rectos en un mismo preparado) lo cual no ha sido observado previamente en nuestro laboratorio así como también en la especie relacionada *A. contaminans* (De Clerck et al., 2004).

Los resultados de las pruebas bioquímicas de los aislamientos (24.1, 1502, 1603, 1270) coincidieron entre si y con los pertenecientes a las cepas

de referencias utilizadas en este trabajo aunque se podrían haber admitido variaciones. Existen también coincidencias con resultados de pruebas bioquímicas de *A. flavithermus* en estudios anteriores. Según los resultados de la prueba de la enzima catalasa todos los aislamientos resultaron poseer esta enzima, lo cual concuerda con descripciones anteriores de *A. flavithermus* (Pikuta et al., 2000). Los aislamientos resultaron no poseer la enzima triptofanasa. Pikuta et al. (2000) describió a *A. flavithermus* como positiva para la enzima triptofanasa. Se produjo la reducción de nitrato a nitrito por parte de las cuatro cepas (24.1, 1502, 1603, 1270) así como de las cepas de *A. flavithermus* de referencia. El desarrollo de color rojo a los 30 segundos nos indicó la presencia de nitrito. Con esta técnica no podemos saber las etapas siguientes a esta reducción. Este puede ser el primer paso en la respiración anaeróbica utilizando nitrato como aceptor final de electrones o el primer paso hacia la asimilación de nitrógeno. Cepas de *A. flavithermus* han sido informadas como reductoras de nitrato (Pikuta et al., 2000; Heinen et al., 1989), así como en otros estudios no se ha observado actividad reductora de nitrato (Belduz et al., 2003; Saw et al., 2008). Estas diferencias pueden deberse a diferencias entre cepas e indica que los métodos bioquímicos tradicionales no aportan datos correctos para la identificación a nivel de especies en este caso. Actualmente los análisis bioquímicos estándar no son adecuados para la identificación fenotípica pero siguen siendo importantes para aprender los comportamientos bioquímicos

de las bacterias. Debido a que el género *Anoxybacillus* es relativamente nuevo comparado con otros mucho más estudiados como *Geobacillus* o *Bacillus*, las bases de datos de los proveedores de kits comerciales de análisis bioquímicos como Biolog® y Api® no tienen disponibles datos bioquímicos de *Anoxybacillus* (Goh et al., 2013)

En este estudio los perfiles de proteínas totales realizados por SDS-PAGE fueron utilizados para caracterizar las bacterias fenotípicamente y comparar los nuevos aislamientos con las cepas de *A. flavithermus* de referencia, buscando posibles diferencias marcadas que pudieran inferir que se trataran de diferentes especies, previo a la identificación por secuenciación parcial del gen ARNr 16S. Se observa en la figura 3 una baja diversidad de perfiles de proteínas totales. Excepto en las bandas de mayor tamaño existe una gran similaridad entre los seis aislamientos. Si observamos las bandas de mayor tamaño se pueden agrupar los aislamientos en 3 grupos. Las diferencias entre las bandas entre estos 3 grupos reflejan variaciones entre cepas. Yuang et al. (2012) en su estudio sobre la ocurrencia de bacilos termófilos en leche en polvo comercial de China agrupó un gran número de aislamientos según la similaridad en sus perfiles de proteínas totales por SDS-PAGE. En ese estudio los perfiles de proteínas totales tienen más de quince bandas, encontrándose fácilmente variación entre ellos incluso dentro de la misma especie, por ejemplo se encontraron dos diferentes perfiles para la especie *A. flavithermus*. En este

trabajo de acuerdo a esta técnica se encontraron 3 perfiles diferentes quedando en evidencia la diversidad intraespecie de *A. flavithermus*.

La actividad proteolítica y lipolítica no es una característica deseable. La leche en polvo tiene fecha de caducidad extensa y estas actividades sumadas a las de otras especies que estuviesen presentes podrían producir propiedades organolépticas no deseables en leche en polvo así como en otros productos lácteos que se almacenan por largo tiempo antes de su consumo. Los aislamientos de *A. flavithermus* estudiados en este trabajo no presentan actividad amilolítica por la técnica utilizada (con almidón soluble). Se han descubierto y caracterizado amilasas de varias cepas de *Anoxybacillus* (Goh et al., 2013). Una cepa de *A. flavithermus* aislada de una fuente termal en Turquía fue utilizada como inóculo para la producción de α amilasa a partir de cáscara de arroz usando fermentación en estado sólido (Goh et al., 2013)

En trabajos anteriores se ha observado que *A. flavithermus* forma biopelículas y se han estudiado las propiedades de la superficie externa de estas bacterias implicadas en la capacidad de ellas de adherirse a superficies como acero inoxidable. Se ha demostrado que la carga eléctrica de la superficie de las bacterias, la hidrofobicidad y las proteínas de superficie son factores que influyen en la unión de *A. flavithermus* a superficies de acero inoxidable (principal material en industrias lácteas). La

remoción de las proteínas de superficie de una cepa de *A. flavithermus* resultó en la reducción de 10^{-1} log en su habilidad de adherirse a acero inoxidable (Palmer et al., 2010). Las diferencias en los valores de coeficientes de adhesión entre los aislamientos estudiados se pueden deber a diferencias en las proteínas de superficie de cada cepa. Se ha demostrado para otros tipos de bacterias que la movilidad de las bacterias es un factor que influye en la adhesión inicial de las bacterias a las superficies (Vatanyoopaisarn et al., 2000), pero en nuestro caso las cepas resultaron ser móviles a partir de la prueba SIM y observación al microscopio del cultivo fresco, por lo tanto las variaciones no se podrían atribuir a la movilidad diferencial de las cepas.

6. CONCLUSIONES

- Los nuevos aislamientos y las cepas de referencia fueron caracterizados fenotípica y genotípicamente, e identificados como *A. flavithermus*.
- Los perfiles de bandas por PCR-RAPD fueron idénticos para todos los aislamientos evaluados en diferentes períodos de muestreos a partir de muestras obtenidas de industrias lácteas y de leche en polvo comerciales de diferentes marcas
- Las cepas de *Anoxybacillus* fueron confirmadas por secuenciación de un fragmento del gen que codifica para el ARNr 16S, con similitudes mayores a 98%,
- El presente estudio permitió ampliar la colección de *A. flavithermus* aislada de leche en polvo uruguaya.
- Las cepas de *A. flavithermus* analizadas en este estudio tienen actividades proteolíticas y lipolíticas
- Se comprobó la capacidad de las cepas aisladas de adherirse a superficies lisas apoyando la idea de que son capaces de formar biopelículas.

7. PERSPECTIVAS

La formación de biofilm a nivel industrial es un proceso complejo; es importante desarrollar a nivel de laboratorio condiciones similares para analizar las diferentes etapas en la adhesión y maduración del mismo, así como también evaluar las relaciones que existen con otras especies bacterianas (*Bacillus*) contaminantes de leche en polvo.

Una perspectiva a futuro desde el punto de vista de la actividad enzimática sería evaluar la estabilidad térmica de las enzimas, determinar la presencia y el deterioro producido en la leche en polvo.

Trabajos futuros permitirán realizar un enfoque a la problemática de deterioro y disminución de la vida útil de la leche en polvo, no descartando los posibles ecosistemas microbianos resistentes a los procesos térmicos que alteren en conjunto la calidad de este producto y permitan establecerse técnicas moleculares en tiempo real para identificar la presencia y cuantificación de *Anoxybacillus*.

8. BIBLIOGRAFÍA

Adiguzel, A., Ozkan, H., Baris, O., Inan, Kadriye, I., Gulluce, M., Sahin, F. (2009). Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. *Journal of Microbiological Methods* 79, 321-328.

Atanassova, M., Derekova, A., Mandeva, R., Sjöholm, C., Kambourova, M. (2008). *Anoxybacillus bogrovensis* sp.nov., a novel thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Dolni Bogrov, Bulgaria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 2353-2362.

Auger, S., Krin, E., Aymerich, S., Gohar, M. (2006). Autoinducer 2 affects biofilm formation by *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 937–941.

Austin, J. W., Bergeron, G. (1995). Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. *Journal of Dairy Research* 62, 509–519.

Burgess, S.A., Brooks, J.D., Rakonjac, J., Walker, K.M., Flint S.H. (2009). The formation of spores in biofilms of *Anoxybacillus flavithermus*. *Journal of Applied Microbiology* 107, 1012-1018.

Burgess, S.A., Lindsay, D., Flint, S.H. (2010). Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *International Journal of Food Microbiology* 144, 215-225.

Belduz, A.O., Dulger, S., Demirbag, Z. (2003). *Anoxybacillus gonensis* sp. Nov., a moderately thermophilic, xylose-utilizing, endospore- forming bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 1315-1320.

Chen, X.G., Stabnikova, O., Tay, J.H., Wang, J.Y., Tay, S.T.L. (2004). Thermoactive extracellular proteases of *Geobacillus caldoproteolyticus* sp.nov., from sewage sludge. *Extremophiles* 8, 489-498.

Chopra, A.K., Mathur, D.K. (1984). Isolation, screening and characterization of thermophilic *Bacillus* species isolated from dairy products. *Journal of Applied Bacteriology* 57, 263–271.

Cihan, A., Ozcan, B., Cumhuri, C. (2010). *Anoxybacillus salavatliensis* sp. nov., an α -glucosidase producing, thermophilic bacterium isolated from Salavatli, Turkey. *Journal of basic Microbiology* 51, 136-146.

Coorevits, A., Dinsdale, A.E., Halket, G., Lebbe, L., De Vos, P., Van Landschoot, A., Logan, N.A. (2011). Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*: emendation of *Geobacillus*, *G. stearothermophilus*, *G. jurassicus*, *G. toebii*, *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidans* (nom. corrig., formerly “*thermoglucosidasius*”); transfer of *Bacillus thermantarcticus* to the genus as *G. thermantarcticus*; proposal of *Caldibacillus debilis* gen. nov., comb. nov.; transfer of *G. tepidamans* to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* and proposal of *Anoxybacillus caldiproteolyticus* sp.nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62, 1470–1485.

Crielly, E.M., Logan, N.A., Anderton, A. (1994). Studies on the *Bacillus* flora of milk and milk products *Journal of Applied Bacteriology* 77, 254–263.

Dai, J., Liu, Y., Lei, Y., Gao, Y., Han, F., Xiao, Y., Peng, H. (2011). A new subspecies of *Anoxybacillus flavithermus* spp. *yunnanensis* ssp. nov. with very high ethanol tolerance. *FEMS Microbiology Letters* 320, 72-78.

De Clerck, E., Rodriguez-Díaz, M., Vanhoutte, T., Heyrman, J., Logan, N.A., De Vos, P. (2004). *Anoxybacillus contaminans* sp. Nov. and *Bacillus gelatini* sp. Nov., isolated from contaminated gelatin batches. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 941-946.

Derekova, A., Sjöholm, C., Mandeva, R., Kambourova, M. (2007). *Anoxybacillus rupiensis* sp. Nov., a novel thermophilic bacterium isolated from R upi basin (Bulgaria). *Extremophiles* 11, 577-583.

Derekova, A., Mandeva, R., Kambourova, M. (2008). Phylogenetic diversity of thermophilic carbohydrate degrading bacilli from Bulgarian hot spring. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24, 1697-1702.

DIEA, 2010. Estadísticas del sector lechero 2010. Serie de trabajos especiales N° 304. Ministerio de Agricultura y pesca, Montevideo, Uruguay.

Dulger, S., Demirbag, Z., Belduz, A.O. (2004). *Anoxybacillus ayderensis* sp. nov. and *Anoxybacillus kestanbolensis* sp.nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1499-1503.

Flint, S.H., Bremer, P., Brooks, j. (1997). Biofilms in dairy manufacturing plant-descriptions, current concerns and methods of control. *Biofouling* 11, 81-97.

Flint, S.H., Van den Elzen, H., Brooks, J.D., Bremer, P.J. (1999). Removal and inactivation of thermo-resistant *streptococci* colonising stainless steel. *International Dairy Journal* 94, 29–436

Flint, S.H., Palmer, J., Bloemen, K., Brooks, J., Crawford, R. (2001a). The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. *Journal of Applied Microbiology* 90, 151–157.

Flint, S.H., Ward, L., Walker, K. (2001b). Functional grouping of thermophilic *Bacillus* strains using amplification profiles of the 16S-23S internal spacer region. *Systematic and Applied Microbiology* 24, 539-548.

Goh, K.M., Kahar, U.M., Chai, Y.Y., Chong, C.S., Chai, K.P., Ranjani, V., Illias, R.M., Chan, K.G.(2013). Recent discoveries and applications of *Anoxybacillus*. *Applied Microbiology and biotechnology* 97, 1475-1488.

Gomez Zavaglia, A., Abraham, A., Giorgieri, S., De Antoni, G. (1999). Application of polyacrylamide gel electrophoresis and capillary gel electrophoresis to the analysis of *Lactobacillus delbruekii* whole-cell proteins. *Journal of dairy Science* 82, 870-877.

Gul-Guven, R., Güven, K., Poli, A., Nicolaus, B. (2008). *Anoxybacillus kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* subsp.nov., a thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Batman. *The Journal of General and Applied Microbiology* 54, 327-334.

Kevbrin, V., Zegler, K., Lysenko, A.M., Wiegner, J. (2005). *Anoxybacillus kamchatkensis* sp.nov., a novel thermophilic facultative aerobic bacterium with a broad pH optimum from the Geyser valley, Kamchatka. *Extremophiles* 9, 391-398.

Koneman, E.W., Winn, W.C., Allen, S.D., Janda, W.M., Procop, G.W., Srechenberger, P.C., Woods, G.L. (2008). *Diagnostico Microbiológico. Texto y atlas color*. 6ª edición. Buenos Aires, Médica Panamericana.

Kumar, G., Anand, S. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* 42, 9-27.

Heinen, W., Lauwers, A.M., Mulders, J.W.M. (1982). *Bacillus flavothermus*, a newly isolated facultative thermophile. *Antonie van Leeuwenhoek* 48, 265-272.

Helke, D.M., Somers, E.B., Wong, A.C.L. (1993). Attachment of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* to stainless steel and Buna-N in the presence of milk and individual milk components. *Journal of Food Protection*. 56, 479–484.

Hinton, A.R., Trinh, K.T., Brooks, J.D., Manderson, G.J. (2003). Thermophile survival in milk fouling and on stainless steel during cleaning. *Transactions of the Institution of Chemical Engineers* 80, 299–304.

Inan, K., Belduz, A.O., Canakci, S. (2012). *Anoxybacillus kaynarcensis* sp. nov., a moderately thermophilic, xylanase producing bacterium. *Journal of Basic Microbiology*. Doi:10.1002/jobm.201100638.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (2009). *Brock, Biología de los microorganismos*. 12^a edición. Madrid, Pearson Education.

Moore, W., Hash, D., Holdeman, H., Cato, E. (1980). Polyacrylamide Slab Gel Electrophoresis of Soluble Proteins for Studies of Bacterial Floras. *Applied and environmental Microbiology* 39, 900- 907.

Namsaraev, Z.B., Babasanova, O.B., Dunaevsky, Y.E., Akimov, V.N., Barklhutova, D.D., Gorlenko, V.M, Namsaraev, B.B. (2010). *Anoxybacillus mongoliensis* sp.nov., a novel thermophilic proteinase producing bacterium isolated from alkaline hot spring, Central Mongolia. *Microbiology* 79, 491-499.

Narayan, V., Hatha, M.A., Morgan, H.W., Rao, D. (2008). Isolation and characterization of aerobic thermophilic bacteria from the Savusavu hot springs in Fiji. *Microbes and Enviroments* 23, 350-352.

O`Sullivan, A., Rinna, J., Humphreys, G., Weightman, A., Fry, J. (2006). Culturable phylogenetic diversity of the phylum 'Bacteroidetes' from river epilithon and coastal water and description of novel members of the family Flavobacteriaceae: *Epilithonimonas tenax* gen nov., sp. nov. and *Persicivirga xylanidelens* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 169-180.

Palmer, J.S., Flint, S.H., Schmid, J., Brooks, J.D. (2010). The role of surface charge and hidrophobicity in the attachment of *Anoxybacillus flavithermus* isolated from milk powder. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 37, 1111-1119.

Parkar, S.G., Flint, S.H., Palmer, J.S., Brooks, J.D. (2001). Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel. *Journal of Applied Microbiology* 90, 901–908.

Parkar, S.G., Flint, S.H., Brooks, J.D. (2003). Physiology of biofilms of thermophilic bacilli and potential consequences for cleaning. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30, 553–560.

Pikuta, E., Lysenko, A.M., Chuviskaya, N., Mendrock, U., Hippe, H., Suzina, N., Nikitin, D., Osipov, G.A., Laurinavichius, K. (2000). *Anoxybacillus pushcinensis* gen. nov., sp nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavothermus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 2109-2117.

Pikuta, E., Cleland, D., Tang, J. (2003). Aerobic growth of *Anoxybacillus pushchinoensis* K1(T): emended descriptions of *A. pushchinoensis* and the genus *Anoxybacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 1561-1562.

Poli, A., Esposito, E., Lama, L., Orlando, P., Nicolaus, G., Appolonia, F., Gambacorta, A., Nicolaus, B. (2006). *Anoxybacillus amylolyticus* sp. nov., a thermophilic amylase producing bacterium isolated from Mount Rittmann (Antarctica). *Systematic and Applied Microbiology* 29, 300-307.

Poli, A., Romano, I., Cordella, P., Orlando, P., Nicolaus, B., Ceschi, C.B. (2009). *Anoxybacillus thermarum* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from thermal mud in Euganean hot spring, Abano Terme, Italy. *Extremophiles* 13, 867-874.

Reginensi, S.M., González, M.J., Olivera, J.A., Sosa, M., Juliano, P., Bermúdez, J. (2011). RAPD-based screening for spore-forming bacterial populations in Uruguayan commercial powdered milk. *International Journal of Food Microbiology* 148, 36-41.

Ronimus, R.S., Parker, L.E., Morgan, H.W. (1997). The utilization of RAPD-PCR for identifying thermophilic and mesophilic *Bacillus* species. *FEMS Microbiology Letters* 147, 75-79.

Ronimus, R.S., Parker, L.E., Turner, N., Poudel, S., Rückert, A., Morgan, H.W. (2003). A RAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders. *International Journal of Food Microbiology* 85, 45-61.

Ronimus, R.S., Rueckert, A., Morgan, H.W. (2006). Survival of thermophilic spore-forming bacteria in a 90(+) year old milk powder from Ernest Shackelton's Cape Royds Hut in Antarctica. *Journal of Dairy Research* 73, 235-243.

Rückert, A., Ronimus, R.S., Morgan, H.W. (2004). A RAPD based survey of thermophilic bacilli in milk powders from different countries. *International Journal of Food Microbiology* 96, 263–272.

Rückert, A., Ronimus, R.S., Morgan, H.W. (2006). Development of a real-time PCR assay targeting the sporulation gene, *spo0A*, for the enumeration of thermophilic bacilli in milk powder. *Food Microbiology* 23, 220-230.

Saw, J.H., Mountain, B.W., Feng, L., Omelchenko, M.V., Hou, S., Saito, J.A., Stott, M.B., Li, D., Zhao, G., Wu, J., Galperin, M.Y., Koonin, E.V., Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Ridgen, D.J., Dunfield, P.F., Wang, L., Alam, M. (2008). Encapsulated in silica: genome, proteome and physiology of the thermophilic bacterium *Anoxybacillus flavithermus* WK1. *Genome Biology* 9, 1-16.

Schäffer, C., Franck, W.L., Scheberl, A., Kosma, P., Mc Dermott, T.R., Messner, P. (2004). Classification of isolates from locations in Austria and Yellowstone National Park as *Geobacillus tepidamans* sp. Nov. *International Journal of systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 2361-2368.

Scott, S.A., Brooks, J.D., Rakonjac, J., Walker, K.M.R., Flint, S.H. (2007). The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder. *Internacional Journal of Dairy Technology* 60, 109-117.

Stetter, K.O. (1999). Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Letters* 452, 22-25.

Tingey, S., Del Tufo, J. (1993). Genetic Analysis with Random Amplified Polymorphic DNA Markers. *Plant Physiology* 101, 349-352.

Vatanyoopaisarn, S., Nazli, A., Dodd, C.E., Rees, C.E., Waites, W.M. (2000). Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 860- 863.

Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G., Chater, K., Sinderen, D. (2007). Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71, 495- 548.

Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F.J., Lupski, J.R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5, 25–40.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting . *Nucleic Acid Research* 23, 4407-4414 .

Watson, D.J., Baker, T.A., Bell, S.P., Gann, A., Levine, M., Losick, R. (2005). *Biología molecular del gen*. 5ª edición. Madrid, Médica Panamericana.

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.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* 18, 6531-6535

Yuan, D., Liu, G., Ren, D., Zhang, D., Zhao, L., Kan, C., Yang, Y., Ma, W., Li, Y., Zhang, L. (2012). A survey on the occurrence of thermophilic bacilli in commercial milk powders in China. *Food Control* 25, 752-757.

Yumoto, I., Hirota, K., Kawahara, T., Nodasaka, Y., Okuyama, H., Matsuyama, H., Yokota, Y., Nakajima, K., Hoshino, T. (2004). *Anoxybacillus voinovskiensis* sp. Nov., a moderately thermophilic bacterium from a hot spring in Kamchatka. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1239-1242.

Zhang, C., Huang, X., Pan, W., Zhang, J., Wei, K., Klenk, H., Tang, S., Li, W., Zhang, K. (2011). *Anoxybacillus tengchongensis* sp. nov. and *Anoxybacillus eryuanensis* sp. nov., facultatively anaerobic, alkalitolerant bacteria from hot springs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61, 118-122.

Recursos electrónicos

Biomerieux industry. Identification and Microbial Genotyping. (2013). [Internet], disponible desde <http://www.biomerieux-industry.com/servlet/srt/bio/industry-microbiology/dynPage?doc=NDY_FDA_PRD_G_PRD_NDY_17> [Acceso 15 de enero de 2013]

Biolog. GEN III MicroPlate™ Instructions for Use.(2013). [Internet], disponible desde <<http://www.biolog.com/pdf/milit/00P%20185rA%20GEN%20III%20MicroPlate%20IFU%20Mar2008.pdf>> [Acceso 15 de enero de 2013]

