

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**EVALUACIÓN DE MICROORGANISMOS TERMODÚRICOS Y  
PRINCIPALES FUENTES DE CONTAMINACIÓN EN EL TAMBO**

**por**

**Eliana MORENO RAMÍREZ**

**TESIS presentada como uno de  
los requisitos para obtener el  
título de Ingeniero Agrónomo.**

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2011**

Tesis aprobada por:

Director: Ing. Agr. Aldo Ariel Ibarra García

Ing. Agr. Jorge Washington Bermúdez Estévez

Lic. Marcela Joan González Ramos

Fecha: 10/06/2011

Autor: Eliana Moreno Ramírez

## AGRADECIMIENTOS

A La Universidad de La República y especialmente a La Facultad de Agronomía, por la formación académica y las facilidades brindadas.

Al Ing. Agr. Jorge Bermúdez, a la Lic. Marcela González y a la MSc. PhD Stella Reginensi por la oportunidad y apoyo profesional.

A Jorge Olivera por la colaboración en el procesamiento de las muestras.

A las familias Aíta, Lecchini y Pérez por la buena disposición en cada visita. Y al tambo de la Facultad de Agronomía CRS (Centro Regional Sur).

A mi Familia y Amigos por su paciencia, confianza y apoyo durante toda la carrera.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u> .....	1
1.1 <u>OBJETIVOS</u> .....	2
1.1.1 <u>Objetivo general</u> .....	2
1.1.2 <u>Objetivos específicos</u> .....	2
1.1.2.1 <u>Estudio cualitativo</u> .....	2
1.1.2.2 <u>Estudio cuantitativo</u> .....	2
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u> .....	3
2.1 <u>LA LECHE, DERIVADOS Y SU IMPORTANCIA A NIVEL NACIONAL</u> ...3	3
2.2 <u>LA LECHE Y LA CONTAMINACIÓN</u> .....	3
2.3 <u>FUENTES DE CONTAMINACIÓN</u> .....	4
2.3.1 <u>Contaminación microbiana del interior de la ubre</u> .....	4
2.3.2 <u>Contaminación microbiana del exterior de la ubre</u> .....	5
2.3.3 <u>Equipo de ordeño como fuente de contaminación</u> .....	6
2.3.4 <u>Comparación de recuentos</u> .....	9
2.4 <u>MICROORGANISMOS DE DETERIORO Y PATÓGENOS (TERMÓFILOS Y TERMODÚRICOS)</u> .....	11
2.5 <u>CARACTERIZACIÓN DEL GÉNERO <i>BACILLUS</i></u> .....	12
2.6 <u>IMPORTANCIA DEL GÉNERO <i>BACILLUS</i> EN LA INDUSTRIA LÁCTEA</u> .....	14
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....	16
3.1 <u>DESCRIPCIÓN DE LOS TAMBOS Y CONDICIONES GENERALES DE MANEJO</u> .....	16
3.2 <u>MUESTREO</u> .....	16
3.2.1 <u>Muestras de ambiente</u> .....	17
3.2.2 <u>Hisopados de ubre</u> .....	17
3.2.3 <u>Muestras de heces y suelo</u> .....	17
3.2.4 <u>Muestras de leche</u> .....	17
3.2.5 <u>Muestras de ración</u> .....	17
3.3 <u>PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS</u> .....	18
3.3.1 <u>Procesamiento de muestras de leche</u> .....	18
3.3.2 <u>Procesamiento de muestras de heces, suelo y ración</u> .....	18
3.3.3 <u>Procesamiento de hisopados de ubre</u> .....	18

3.4. ESTUDIO MICROBIOLÓGICO.....	19
3.4.1 <u>Recuento, morfología de colonias y selección de aislamientos</u> .....	19
3.5 PRUEBAS MOLECULARES.....	19
3.5.1 <u>Aislamiento de ADN</u> .....	19
3.5.2 <u>Análisis RAPD-PCR</u> .....	20
3.5.3 <u>Identificación de aislamiento por análisis de la secuencia del gen16S rADN</u> .....	20
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u> .....	21
4.1 RECIENTOS.....	21
4.1.1 <u>Recuentos según fuente por período</u> .....	21
4.1.2 <u>Recuento en heces</u> .....	22
4.1.3 <u>Recuentos en hisopados</u> .....	23
4.1.4 <u>Recuentos en leche</u> .....	24
4.2 GELES.....	25
4.3 DIVERSIDAD Y ABUNDANCIA RELATIVA.....	26
5. <u>CONCLUSIONES</u> .....	31
6. <u>RESUMEN</u> .....	32
7. <u>SUMMARY</u> .....	34
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	35
9. <u>ANEXOS</u> .....	40

## LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Resumen de información de bacterias formadoras de esporas en fuentes de contaminación en el tambo.....	9
2. Ubicación y características de los tambos seleccionados.....	16
3. Recuentos de microorganismos termodúricos (log <sub>10</sub> UFC, $\mu \pm$ d.e.) en heces, suelos, ración y leche cruda en los diferentes períodos de muestreos.....	21
4. Abundancia relativa (%) de aislamientos de microorganismos esporulados aeróbicos en diferentes fuentes de contaminación en el tambo.....	26
5. Abundancia relativa (%) de las especies principales según fuente de contaminación en los períodos analizados.....	28
Figura No.	
1. Esquema de las rutas de contaminación de la leche cruda con microorganismos en el tambo (Vissers, 2007).....	8
2. Recuento en heces para los 3 períodos en las 2 zonas.....	22
3. Recuentos de hisopados por período para los 4 productores.....	23
4. Recuentos en leche dentro de los 3 períodos para las 2 zonas.....	24
5. Perfiles de RAPD obtenidos de aislamientos en distintas muestras.....	25

## **1. INTRODUCCIÓN**

La leche es un producto complejo en su composición, constituyendo un sustrato adecuado para la multiplicación de diversos microorganismos. El sistema productivo pastoril del Uruguay y las variables ambientales, climáticas, y de manejo a las que está sometido, conduce a cambios en la cantidad y composición de la microflora que accede a la leche.

Previo al procesamiento de la leche en productos específicos, existen diversos puntos críticos de contaminación de la materia prima, que se asocian a la obtención de la leche en el establecimiento, el transporte a la planta y la recepción y el almacenaje de la leche en silos industriales

Uruguay tiene una vasta historia en referencia a la evolución del sistema de pago de la leche al productor. Hoy en día, la exigencia en cuanto a calidad higiénico-sanitaria es determinante de los rendimientos industriales y de la inocuidad de los derivados.

Una alta proporción de la producción anual de leche se exporta y los volúmenes continuarán en aumento en los próximos años. Por parte de los compradores las exigencias de calidad son crecientes y se transforman en necesarias para competir con otros exportadores de lácteos que están instalados en el mercado.

La tecnología disponible, las facilidades de equipamiento de la sala de ordeño y enfriado de la leche, y los incentivos económicos establecidos por la industria en la forma de pago, han permitido una mejora sustancial de los recuentos microbianos en leche cruda en los últimos años. De acuerdo a Carballo et al. (1999) el recuento total de bacterias puede variar desde valores iniciales elevados, por ejemplo mayores a 100.000 UFC/ml, lo cual refleja faltas higiénicas graves en la producción, hasta recuentos menores a 10.000 UFC/ml, que indican alto control de las condiciones higiénico-sanitarias y por lo tanto la obtención de una leche de mejor calidad desde el punto de vista microbiológico.

Este trabajo se enfoca en los microorganismos termodúricos aeróbicos capaces de formar esporas que resisten temperaturas de pasteurización e incluso tratamientos térmicos más intensos que se realizan habitualmente en el

procesamiento productos como leche UHT. Si bien su presencia en la leche cruda es relativamente baja su crecimiento se ve favorecido frente al de otros microorganismos en procesos como la elaboración de leche en polvo debido a las altas temperaturas utilizadas en precalentadores, evaporadores y secado del producto. Las distintas fuentes de contaminación en el tambo van desde el suelo, heces, ración, los propios animales, el aire, los operarios, entre otras.

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1 Objetivo general**

Identificación de distintas fuentes de contaminación de microorganismos termodúricos aerobios en cuatro tambos ubicados en Canelones y San José en tres períodos del año 2010 (otoño, invierno y primavera).

### **1.1.2 Objetivos específicos**

#### **1.1.2.1 Estudio cualitativo**

Analizar la diversidad de especies esporuladas aeróbicas encontradas en los distintos tambos haciendo referencia a la fuente de contaminación y al período de muestreo.

#### **1.1.2.2 Estudio cuantitativo**

Evaluar la abundancia relativa de dichas especies en cada período y en relación a las distintas fuentes de contaminación.



## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 LA LECHE, DERIVADOS Y SU IMPORTANCIA A NIVEL NACIONAL**

Uruguay produce 1.694 millones de litros de leche por año, de los cuales se remiten a plantas procesadoras el 91% del volumen anual producido. A partir de la leche remitida se procesan 67.091 ton. de leche en polvo (46%), 55.355 ton. de queso (41%), 84 millones de lts. de leche media y larga vida UHT (7%), entre otros productos (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2010). Los productos elaborados por la industria se someten a tratamientos térmicos de diferente intensidad y tiempo, lo cual favorece el desarrollo de microorganismos termodúricos y esporas.

La producción industrial láctea se destina al mercado interno y la mayor parte (60%) se exporta a diferentes países por lo que la calidad e inocuidad de los productos juegan un rol importante en la competitividad en el mercado internacional. La exportación de productos lácteos Uruguayos en volumen físico se distribuye de la siguiente forma: 55% leche en polvo, 26% queso, 13% manteca y 6% leche media y larga vida (UHT) (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2010).

### **2.2 LA LECHE Y LA CONTAMINACIÓN**

La leche es el producto íntegro del ordeño total e ininterrumpido de hembras lecheras sanas, descansadas y bien alimentadas que se recoge en forma higiénica y que no contenga calostro. Desde el punto de vista físico-químico la leche es una mezcla compleja que consiste en una emulsión de grasa y una dispersión coloidal de proteínas, junto con el azúcar de la leche, la lactosa, en disolución verdadera. A éstos componentes principales los acompañan varios minerales, sobre todo calcio y fósforo, vitaminas y varios compuestos orgánicos secundarios, como el ácido cítrico, algunos de ellos nitrogenados.

Los componentes de la leche constituyen un buen sustrato para la multiplicación de diversos microorganismos y más aún si se conserva de manera inapropiada (Scheldeman et al. 2005, Rasolofo et al. 2010). El pH neutro (6.6-6.8) de la leche es adecuado para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos.

Por otra parte, la temperatura ejerce un efecto importante en el tipo de microorganismo que se desarrolla, es decir, a medida que aumenta la temperatura de conservación de la leche (hasta 35-40°C) se evidencia mayor desarrollo microbiano. Cuando la temperatura se incrementa más allá de los 40°C se desarrollan especies termófilas y termodúricas, de especial énfasis en éste trabajo. Entre 20 y 40°C hay un predominio de especies mesófilas, mientras que a bajas temperaturas se hallan los psicrófilos y psicrotrófos (Frioni, 2006).

La cantidad y tipo de microorganismo en la leche se refleja ya desde su obtención. Sin embargo también existen diversos puntos de contaminación del producto luego de obtenido (transporte, recepción y almacenamiento en planta).

## **2.3 FUENTES DE CONTAMINACIÓN**

La leche es sintetizada en las células especializadas de la glándula mamaria y es esencialmente estéril cuando se secreta por las células en los alvéolos de la ubre (Murphy y Boor, 2000). Luego de ésta etapa en que se produce la leche, la misma puede contaminarse a partir de distintas fuentes que son: el interior y exterior de la ubre así como los equipos de ordeño y de almacenamiento de la leche.

La salud e higiene de la vaca, el ambiente en que se encuentra y se la ordeña, así como los procedimientos utilizados en la limpieza y desinfección de los equipos posterior al ordeño, son elementos claves en el nivel de contaminación microbiana de la leche cruda. Adicionalmente a lo anterior, son relevantes la temperatura y el tiempo de almacenamiento ya que permiten la multiplicación de los contaminantes microbianos que alteran las características de la leche (Murphy y Boor, 2000).

### **2.3.1 Contaminación microbiana del interior de la ubre**

Este factor se relaciona con la sanidad del animal. La leche cruda que sale de la ubre de vacas sanas normalmente contiene un número muy bajo de microorganismos, menos de 1000 UFC/ml (Murphy y Boor, 2000). La contaminación microbiana dentro de la ubre de los animales sanos no se considera que contribuya de manera significativa con el número total de microorganismos en la leche cruda. En cambio, una vaca con mastitis tiene una mayor concentración de microorganismos que se liberan con la leche.

La influencia de la mastitis en el recuento total de bacterias de la leche cruda depende del tipo de microorganismo causal, la etapa de infección y el porcentaje del hato infectado. Las vacas infectadas pueden llegar a presentar recuentos superiores a  $10^7$  bacterias por ml en la leche (Murphy y Boor, 2000). Hay que destacar que los patógenos causantes de esta afección surgen como consecuencia de animales sucios, limpieza insuficiente o inadecuada del equipo luego de cada ordeño, o por temperaturas y tiempos de conservación incorrectos. El recuento de células somáticas es un indicador del grado de infección de los animales en ordeño y uno de los criterios utilizados por la industria para el pago de la leche.

### **2.3.2 Contaminación microbiana del exterior de la ubre**

El exterior de la ubre y los pezones de las vacas pueden contribuir a la contaminación microbiana de aquellos que están naturalmente asociadas a la piel del animal, así como los microorganismos que están presentes en el ambiente en que se encuentra y ordeña.

Los pezones y ubres de las vacas, inevitablemente, se ensucian en contacto con el suelo cuando se echan para el descanso y con las heces, ya que con la cola diseminan la contaminación. La contaminación de los pezones con el suelo es considerada la más importante (Chistiansson et al. 1998, Vaerewijck et al. 2001, Scheldeman et al. 2005, Huck et al. 2008, Carlin 2010). Según Murphy y Boor (2000), el ordeño de vacas con las ubres sucias con suelo y heces puede generar recuentos en leche mayores a  $10^4$  ufc/ml. Lo anterior se basa en que el suelo se compone por diferentes fracciones constituyendo una gran diversidad de nichos ecológicos donde se desarrollan los microorganismos (Carlin, 2010).

En definitiva, la influencia de las vacas sucias en el recuento de bacterias totales depende del grado de suciedad de la superficie del pezón y los procedimientos de lavado que se utilizan inmediatamente antes del ordeño.

Es importante destacar que la cantidad de microorganismos de la leche en el momento que ésta abandona el tambo depende de la microflora inicial, a su vez de la temperatura a la cual esta se enfrió, de la temperatura de mantención dentro del tanque de frío (recomendable 4-5°C) y del tiempo que transcurre desde el ordeño hasta la recolección de la misma (Carballo et al., 1999). Por lo anterior, la realización de la rutina de ordeño de forma higiénica y ordenada, así como también mantener las condiciones higiénicas de la sala de

ordeño contribuirá a disminuir la carga microbiana que permanecerá en la leche.

Diversos estudios, Galton et al., Pankey, Bramley y McKinnon, citados por Murphy y Boor (2000) demostraron la relación que existe entre las técnicas de higiene de la ubre pre-ordeño y el número de bacterias en la leche, estableciendo que una buena higiene y cuidado en la rutina de ordeño es eficaz en la reducción del número de microorganismos en la leche provenientes de pezones sucios con barro, heces, etc. Una buena higiene y adecuada rutina de ordeño debe considerar la limpieza de los pezones con una solución desinfectante seguido de un secado con toalla limpia. Con respecto a la higiene de la ubre es de destacar que en Uruguay no es una práctica habitual en la rutina el secado de los pezones previo a la colocación de las pezoneras. Esta práctica se considera inadecuada debido a que según Magnusson et al. (2006), el lavado de los pezones con agua directamente de una manguera debe ser seguido por un cuidadoso secado de los pezones con un paño descartable.

Sin embargo, ni siquiera el mejor método de limpieza elimina todas las bacterias y esporas, y en consecuencia, es de gran importancia tomar medidas para mantener una buena higiene en todas las etapas de la cadena de producción láctea y así minimizar el nivel de contaminación inicial (Scheldeman et al. 2005, Magnusson et al. 2006).

En Uruguay es una práctica habitual el hecho de suministrar concentrado dentro de la sala mientras los animales son ordeñados. Diferentes autores Vaerewijck et al. (2001), Scheldeman et al. (2005) indican que el alimento juega un papel importante en la contaminación de la leche y adicionalmente a esto se menciona que las esporas sobreviven en el tracto digestivo de los animales apareciendo también en heces y multiplicando su presencia hasta 10 veces.

### **2.3.3 Equipo de ordeño como fuente de contaminación**

El grado de limpieza del equipo de ordeño influye en el recuento total y tipo de microorganismo presente en la leche. La limpieza insuficiente deja residuos de leche en las cañerías, actuando como reservorio de microorganismos y favoreciendo el crecimiento y adherencia a las superficies. También favorece la creación de condiciones que tienden a seleccionar hacia algunos grupos específicos de microorganismos (Parkar et al. 2003, Scheldeman et al. 2005).

Las bacterias (tanto esporas como células vegetativas) se adhieren a las superficies de acero inoxidable de los equipos utilizados tanto en el tambo como en la industria formando biofilms y comprometiendo la seguridad y la calidad de los productos finales (Vaerewijck et al. 2001, Scott et al. 2007, Banyó y Vyletelová 2008, Carlin 2010).

Existen otras condiciones desfavorables asociadas a la formación de biofilms como ser: la alteración en la manufactura de alimentos por la reducción del flujo de leche a través de tubos que se bloquean, la reducción de tiempos de ejecución de la planta, la corrosión del acero inoxidable y también la pérdida en la transferencia de calor a través de los intercambiadores de placas, en el caso de los pasteurizadores de leche (Parkar et al., 2003).

Según Parkar et al. (2003), Burgess et al. (2010) la contaminación bacteriana y el deterioro del producto debido a la formación de biofilms son problemas recurrentes. Los biofilms son células (vegetativas y esporas) que se adhieren y crecen en las tuberías y generalmente se asocian a la presencia de una matriz extracelular de polisacáridos (EPS). La naturaleza misma de su estructura y formación proporciona una mayor resistencia a la limpieza y desinfección.

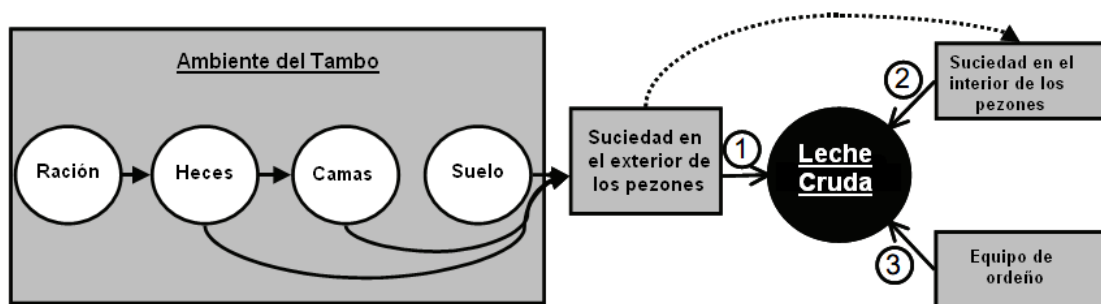
En lo mencionado anteriormente juega un rol fundamental la correcta rutina de lavado del equipo posteriormente al ordeño y del tanque de frío luego de la recolección de la leche por la industria. Una máquina de ordeño funciona bien solamente cuando se limpia cuidadosamente luego de cada uso. Además, una máquina muy limpia es necesaria para recolectar leche de alta calidad.

Al momento de lavar hay que tener en cuenta que la leche contiene componentes orgánicos (lactosa, proteínas, grasa) e inorgánicos (sales Ca y Mg) que presentan distinta solubilidad en agua, por lo tanto la rutina de lavado comienza con una etapa de pre-lavado con agua a 35-45°C para remover los residuos de leche de la máquina y precalentar las cañerías para que actúen mejor las soluciones limpiadoras. Luego se sigue utilizando un detergente alcalino durante 10 min. a una temperatura entre 50-75°C para remover los restos de materiales orgánicos, enjuagando. A continuación, se debe lavar con detergente ácido recirculando por la cañería durante 5 minutos a 35-45°C para neutralizar los residuos de cloro y alcalinos (prolonga la vida de las partes de goma), también evita los depósitos de minerales ayudando a prevenir la formación de piedra de leche; contribuyendo a su vez con la muerte de ciertas bacterias. Se enjuaga el detergente ácido con agua tibia para facilitar

el secado del equipo y se desinfecta con una solución de hipoclorito de sodio sin enjuagarlo.

Al momento del ordeño es necesario eliminar el desinfectante del equipo. Cabe aclarar que la frecuencia en el uso de detergentes ácidos depende de la dureza del agua, siendo de uso semanal si el agua es blanda y diario si el agua es dura. Cuando el ordeño finaliza, toda la suciedad visible y los depósitos de leche deben ser removidos de la parte exterior de las unidades de ordeño y de los tubos flexibles mediante el cepillado y enjuagado con agua limpia.

Figura No. 1 Esquema de las rutas de contaminación de la leche cruda con microorganismos en el tambo (Vissers, 2007)



El presente esquema resume las principales fuentes de contaminación de la leche en el tambo mencionadas anteriormente en este ítem. En la Figura No. 1 se visualizan las distintas fuentes primarias de contaminación que existen en el ambiente del tambo y las rutas de transmisión por las cuales los microorganismos llegan a la leche cruda.

Las fuentes primarias de contaminación de esporas son: la ración, las heces, el suelo y las camas donde los animales descansan. Cabe la aclaración que tales camas no se utilizan en el sistema productivo del Uruguay.

La vía de contaminación comienza con la ración, las esporas capaces de resistir al tracto gastrointestinal aparecen en heces, luego los animales excretan en el suelo, convirtiéndose éste también en contaminante potencial. Es de destacar que como se mencionó el suelo se compone por diversos constituyentes conformando varios nichos favoreciendo el desarrollo de diversos microorganismos.

Durante el descanso lo animales se recuestan sobre el suelo, contaminando el exterior de la ubre (1). La limpieza pre-ordeño descrita reduce sólo en parte la suciedad adherida a la ubre y es de ésta manera que llega a la leche.

La contaminación del interior de los pezones (2) se asocia a la mastitis. Y finalmente se muestra la contaminación de la leche a través del equipo de ordeño (3) producida cuando los microorganismos y residuos que están adheridos a las superficies del equipo de ordeño se ponen en contacto con la leche.

### 2.3.4 Comparación de recuentos

Cuadro No. 1 Resumen de información de bacterias formadoras de esporas en fuentes de contaminación en el tambo

Fuente	Microorganismo	Media	DE	min	Máx	Referencia
Leche cruda	Bacillus cereus	13	29	s/d	170	Hanus et al. (2004)
	Bacillus licheniformis	9	20	s/d	140	
	Otros Bacillus	12	26	s/d	150	
	Bacillus totales	34	40	s/d	170	
Leche cruda	Bacillus cereus	41	s/d	<10	880	Christiansson et al. (1999)
Leche cruda	Esporulados mesófilos y psicrótrofos	59	s/d	3	340	Foltys y Kirchnerova (2006)
Leche cruda	Esporulados psicrótrofos	120	s/d	70	880	Huck et al.(2008)
Leche cruda	Bacillus cereus	81	s/d	s/d	137	Magnusson et al. (2007)
Concentrado	Bacillus cereus	52	117	s/d	600	Hanus et al. (2004)
	Bacillus licheniformis	406	1031	s/d	5300	
	Otros Bacillus	604	1252	s/d	8500	
	Bacillus totales	1061	1894	s/d	8500	
Concentrado	Bacillus cereus	850	s/d	<100	4600	Christiansson et al. (1999)
Concentrado	Esporulados	s/d	s/d	4000	s/d	Vaerewijck et al. (2001)
Concentrado	Esporulados	s/d	s/d	10000	s/d	Scheldeman et al. (2005)
Concentrado	Esporulados	82.000	21.600	s/d	s/d	Slaghuis et al. (1997)

Ensilaje de pastura	Esporulados	50.000	s/d	s/d	s/d	Hanus et al. (2004)
Ensilaje de maíz		160.000	s/d	s/d	s/d	
Verdeos	Esporulados	s/d	s/d	103	105	Scheldeman et al. (2005)
Heces	Bacillus cereus	126	304	s/d	2000	Hanus et al. (2004)
	Bacillus licheniformis	1458	2593	s/d	15.000	
	Otros Bacillus	5416	12320	s/d	83.000	
	Bacillus totales	6999	12671	s/d	86.100	
Heces	Bacillus cereus	150	s/d	<100	800	Christiansson et al. (1999)
Heces	Esporulados psicrótrofos	155.000	s/d	710.000	s/d	Huck et al. (2008)
Heces	Bacillus cereus	<50	s/d	s/d	100	Magnusson et al. (2007)
Heces	Esporulados	210	2	s/d	s/d	Vissers et al. (2007)
Suelo	Bacillus cereus	9980	s/d	300	140000	Christiansson et al. (1999)
Suelo	Esporulados psicrótrofos	710.000	s/d	350.000	1.200.000	Huck et al. (2008)
Suelo	Esporulados	350.000	5	s/d	s/d	Slaghuis et al. (1997)
Suelo	Esporulados	70.000	2	s/d	s/d	Vissers et al. (2007)
Aire/m <sup>3</sup>	Bacillus cereus	33	s/d	6	100	Christiansson et al. (1999)
Aire tambo	Bacillus cereus	275	s/d	s/d	500	Magnusson et al. (2007)

s/d: sin dato

El Cuadro No. 1 muestra los resultados obtenidos por diferentes autores de recuentos de microorganismos en leche, ración, heces, suelo y aire. En términos generales, los recuentos de *Bacillus* totales (esporulados mesófilos) en promedio en leche es 47 UFC/ml en leche (con un máximo 225 y mínimo de 3 UFC/ml). En ración el promedio es de 97.333 UFC/g (mínimo de 3550 UFC/g). Para las heces la media es 3600 UFC/g pudiendo alcanzar un



máximo de 86.000 UFC/g. Y en el suelo hay en promedio 210.000 UFC/g según estos autores.

En referencia a *Bacillus cereus* se ve que el promedio en leche es de 45 UFC/ml en leche (con un máximo 396 y mínimo de 10 UFC/ml). En ración el promedio es 451 UFC/g (con máximo 2600 y mínimo de 117 UFC/g). Para las heces la media es 109 UFC/g (con máximo 967 y mínimo de 100 UFC/g). En el suelo la media es de 9980 UFC/g (con máximo 140.000 y mínimo de 300 UFC/g) y para el aire el promedio es 154 UFC (con máximo 300 y mínimo de 6 UFC).

En el caso de *Bacillus licheniformis* en leche se encuentra con un promedio de 9 UFC/ml, llegando a un máximo de 140 UFC/ml según lo reportado por estos autores. En ración el promedio es 406 UFC/g llegando a un máximo de 5300 UFC/g. En heces el promedio es de 1458 UFC/g alcanzando un valor máximo de 15.000 UFC/g.

Para los esporulados psicrotófos el promedio en leche es de 120 UFC/ml (con un máximo 880 y mínimo de 70 UFC/ml). En el caso de heces los recuentos promedios son de 150.000 UFC/g con un máximo de 710.000 UFC/g. los recuentos de estos microorganismos en el suelo son bastante elevados siendo en promedio 710.000 UFC/g (con un máximo 1.200.000 y mínimo de 350.000 UFC/ml).

Finalmente para el caso de “otros *Bacillus*” entrando en esta categoría especies pertenecientes a este género pero sin *B. licheniformis* ni *B. cereus* que ya fueron considerados antes. El promedio en leche es de 12 UFC/ml alcanzando como máximo 150 UFC/ml. En ración estas están presentes en promedio de 604 UFC/g con un máximo de 8500 UFC/g. Y en el caso de las heces presentan un promedio de 5400 con un máximo de 83.000 UFC/g.

## **2.4 MICROORGANISMOS DE DETERIORO Y PATÓGENOS (TERMÓFILOS Y TERMODÚRICOS)**

Varias cepas de termófilos obligados y facultativos son capaces de producir una variedad de enzimas termoestables, incluyendo proteasas y lipasas, lo que podría resultar en el deterioro de los productos lácteos (Adams et al. 1974, De Jonghe et al. 2009, Burgess et al. 2010).

Estas enzimas de deterioro son responsables de sabores anormales y defectos estructurales en la leche pasteurizada y en otros productos industriales de la leche. Se producen cuando las esporas germinan a causa de la temperatura utilizada en el tratamiento térmico (De Jonghe et al., 2009). Guamis

et al. (1987), menciona que la leche sometida a una temperatura de 55°C durante aprox. 1 hora inactivaría esas enzimas de deterioro pero a su vez generaría cambios organolépticos perjudiciales en la leche.

Hay que destacar que los polvos lácteos son utilizados muy comúnmente como ingredientes para la elaboración de otros alimentos, por tal razón se destaca la importancia de las enzimas que actuarán a nivel del producto cuando esté finalizado, afectando su calidad.

En la industria láctea *Bacillus* y *Clostridium* son dos de los géneros que determinan la vida útil de una gran variedad de productos lácteos tratados térmicamente.

En cuanto al género *Clostridium* las esporas bacterianas son mucho más resistentes que sus contrapartes vegetativas, la más peligrosa es *Clostridium botulinum* que produce una neurotoxina que puede ser fatal, aunque la especie que genera mayores problemas en lácteos es *Clostridium Tyrobutiricum* (Holt et al., 1994). Algunas esporas, de dicha especie son sumamente relevantes en la elaboración de quesos (Vaerewijck et al., 2001). De Jonghe et al. (2009) las mencionan como responsables de la hinchazón tardía en quesos.

Este género incluye bacterias anaerobias estrictas bacilos de 0.3-2.0 por 1.5-20  $\mu\text{m}$ , Gram positivos, esporulados, por lo que pueden persistir en el alimento cuando la mayoría de los microorganismos entéricos han sido destruidos. Su temperatura óptima de crecimiento es 10-65°C (Holt et al. 1994, Rasolofo et al. 2010). Son comúnmente encontrados en el alimento, más específicamente en los alimentos conservados por fermentación (ensilaje mal elaborado), debido a la condición de anaerobiosis (Vaerewijck et al., 2001).

## **2.5 CARACTERIZACIÓN DEL GÉNERO *BACILLUS***

Estudios taxonómicos han evidenciado la diversidad de dicho género (Holt et al. 1994, Vary 1994, Burgess et al. 2010).

Los microorganismos del género *Bacillus* son bacilos de 0.5-2.5 por 1.2-1.0  $\mu\text{m}$ , Gram positivos, aerobios estrictos o anaerobios facultativos encapsulados (Holt et al., 1994). Una característica relevante es su capacidad de formar esporas extraordinariamente resistentes a condiciones desfavorables, como ser altas temperaturas (Kolter et al., 2008).

La esporulación es un proceso natural en el ciclo de crecimiento de ciertos grupos de bacterias. Se trata de un mecanismo de supervivencia que generalmente se considera como un proceso que ocurre cuando el organismo está bajo condiciones de estrés (temperaturas elevadas o de congelación, irradiaciones, químicos, deshidratación, etc.). Las esporas constan de un núcleo, también conocido como protoplasma, que contiene los materiales nucleares, rodeados por la membrana y la corteza, todo esto su vez encerrado en una envoltura externa (Burgess et al., 2010).

Debido a la resistencia de sus endosporas al estrés ambiental, así como su supervivencia en el largo plazo bajo condiciones adversas y la facilidad de dispersión, la mayoría de las bacterias aerobias formadoras de esporas son ubicuas y se puede aislar de una amplia variedad de fuentes como el suelo, las pasturas, las heces, el agua y el aire (Vaerewijck et al. 2001, Huck et al. 2008, Kenneth 2011).

Burgess et al. (2010) mencionó que la presencia de minerales en la leche, tales como el magnesio, calcio y potasio pueden desempeñar un papel importante en la activación y desarrollo de esporas. El calcio es un componente de la leche que estaría implicado en incrementar la expresión de los genes relacionados a la esporulación.

Los microorganismos de este género son principalmente mesófilos, aunque también existen algunos psicrófilos y termófilos como ser *B. cereus* y *B. licheniformis* respectivamente. *B. licheniformis* es la especie termófila predominante en la leche cruda (Crielly et al. 1994, Banyó y Vyletelová 2008, Burgess et al. 2010).

Sin embargo, gran crecimiento de *Bacillus* termófilos se puede producir cuando los ciclos de producción en la industria son demasiado largos, cuando el equipo de producción no se limpia correctamente entre los ciclos de producción o cuando se utilizan productos contaminados (Burgess et al., 2010).

La mayoría de las bacterias aerobias formadoras de esporas en la leche pertenecen a éste género. La contaminación con esporas de éste género generalmente no representa un peligro potencial para los consumidores a excepción de *B. cereus* (Reginensi et al., 2011). En cambio, Banyó y Vyletelová (2008) revelan que *B. cereus* tanto como *B. licheniformis* y *B. subtilis* aisladas de leche han demostrado poseer propiedades patogénicas, pudiendo representar un peligro para la salud humana.

La presencia de *Bacillus cereus* es un factor limitante de la vida útil de la leche pasteurizada siendo también un agente potencial de envenenamiento (Toxiinfección) y degradación de los alimentos (Christiansson et al. 1998, Magnusson 2006, Vanykó y Vyletelová 2008, De Jonghe et al. 2009, Carlin 2010). Ésta especie es ubicua comúnmente en el suelo.

## **2.6 IMPORTANCIA DEL GÉNERO *BACILLUS* EN LA INDUSTRIA LÁCTEA**

La calidad, la seguridad y el rendimiento económico de la leche y los productos lácteos dependen de la calidad de la leche cruda, elaboración, distribución y condiciones de almacenamiento de los mismos. Por tal razón, el enfoque de gestión de la cadena está obligado a garantizar que los productos lácteos sean seguros desde el punto de vista sanitario y de alta calidad (Vissers, 2007).

Las bacterias correspondientes al género *Bacillus* son un grupo importante en la industria láctea como responsables del deterioro de la leche cruda y pasteurizada así como también de productos lácteos (Huck et al. 2007, Scott et al. 2007, Banyó y Vyletelová 2008, Burgess et al. 2010). Su presencia en la industria láctea es un indicador de higiene deficiente e incluso si los recuentos son elevados compromete la venta de los productos elaborados. Además, su crecimiento puede dar lugar a defectos en los productos lácteos causados por la producción de enzimas resistentes al calor (Burgess et al., 2010).

Estas bacterias son capaces de crecer en las plantas de fabricación de productos lácteos, inclusive en aquellos cuyas temperaturas de elaboración alcanzan los 40-65°C. Por tal razón, han sido aisladas de leche UHT cuyo procesamiento industrial implica la utilización de ultra alta temperatura (142-144°C por 2 o 3 segundos). Dicha naturaleza resistente al calor hace especialmente importante la prevención de la contaminación inicial de la leche cruda en el tambo (Coorevits et al., 2008).

Por otra parte, la cualidad mencionada previamente de ser formadoras de esporas capaces de resistir el calor y hasta incluso químicos, dificulta aún más su eliminación.

Además de poseer un amplio rango de temperatura de crecimiento, muestran una tasa de crecimiento rápido (tiempo de generación de aproximadamente 15-20 minutos) y como ya se comentó tienden a la formación de biofilms en los equipos de procesamiento (Scott et al., 2007).

Martin et al. (1966), sugieren que la temperatura usada en el tratamiento UHT estimula la germinación y crecimiento de esporas, resultando la leche UHT más susceptible al deterioro, que la pasteurizada de manera común. A su vez, se descubrió que cuanto más elevada la temperatura utilizada en el tratamiento UHT menor era el número de esporas que sobrevivían, pero que estas sobrevivientes poseen la capacidad de crecimiento acelerado. Lo anterior se explica por una alteración en la composición de la leche dada por la alta temperatura generando un medio más favorable para la germinación y crecimiento de las esporas (shock térmico).

En cuanto a la leche en polvo Scott et al. (2007), menciona que las esporas son capaces de sobrevivir la baja actividad de agua y alta temperatura necesarias en la elaboración de dicho producto. A su vez, hace énfasis en que también son capaces de resistir el proceso de limpieza CIP (Cleaning In Place) en la industria. Según Burgess et al. (2010), recuentos de termodúricos elevados ( $> 10^4$  UFC /g) en los productos lácteos terminados, como por ejemplo en leche en polvo, es un indicador de la falta de higiene durante la procesamiento.

Estudios realizados en la extensión de la vida útil de la leche fluida demostraron que es necesario eliminar o al menos imponer control para evitar la contaminación de la leche cruda a nivel de los tambos, mencionando que para lograr ésto es necesario comprender las principales fuentes de contaminación y como éstas llegan a la leche (Huck et al., 2007, 2008).

Finalmente hay que recordar que no solo la leche es la fuente de contaminación de los productos en la industria, también juegan un rol importante los equipos de procesamiento y los materiales utilizados para envasarlos y presentarlos al consumidor (Banycó y Vyletelová, 2008).

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 DESCRIPCIÓN DE LOS TAMBOS Y CONDICIONES GENERALES DE MANEJO**

Para la realización del trabajo experimental se escogieron 4 tambos, 2 de ellos localizados en el departamento de Canelones, localidad de Progreso y los otros 2 en el departamento de San José en la localidad de Kiyú. Uno de los tambos pertenece a la Facultad de Agronomía; Centro Regional Sur (CRS), mientras que los otros tres pertenecen a productores particulares.

Cuadro No. 2. Ubicación y características de los tambos seleccionados

<b>Tambo</b>	<b>Propietario</b>	<b>Ubicación</b>	<b>No. animales*</b>	<b>Raza</b>	<b>Destino leche</b>
1	Flia. Aíta	Progreso-Canelones	60	Holando	Remite a Conaprole
2	CRS	Progreso-Canelones	120-130	Holando	Remite a Conaprole
3	Flia. Pérez	Kiyú- San José	90- 100	Holando	Remite a Conaprole
4	Flia. Lecchini	Kiyú- San José	40- 50	Jersey-Holando	Elaboración de quesos artesanales

\* Numero promedio de animales en ordeño para los períodos analizados.

Los 4 tambos fueron coincidentes con respecto al manejo de la alimentación ya que el pastoreo se suplementaba en todos los períodos analizados con raciones diferentes, presentando diferencias entre tambos. Las raciones concentradas variaron desde granos, afrechillos, pellets, silo de grano húmedo (Cebada). Ejemplos de las mismas se presentan en 9.3 de los anexos.

#### **3.2 MUESTREO**

Las muestras se colectaron durante tres épocas del año 2010: otoño (mayo), invierno (agosto) y primavera (noviembre). Las principales fuentes de contaminación analizadas fueron: los animales (hisopado exterior de la ubre), el suelo, la ración, las heces, el ambiente y la leche de entrada al tanque de frío.

Para la extracción de muestras se utilizó en todos los casos material esterilizado en autoclave a 121°C por 15 min.

### **3.2.1 Muestras de ambiente**

Placas de Petri con medio Agar Extracto de Malta (AEM) se colocaron abiertas durante aprox. 5 minutos en sitios expuestos dentro de la sala cercanos a los animales en ordeño. Las placas se incubaron a 28°C durante 48 a 72hs.

### **3.2.2 Hisopados de ubre**

Se seleccionaron 4 vacas al azar en cada tambo, en cada uno de los muestreos, con la condición de que estuvieran con la ubre lavada y el órgano de ordeño colocado. Se tomaron las muestras utilizando hisopos estériles mojados en agua peptonada bufferada y raspando por la ubre de la vaca a unos 10-15 cm por encima de los pezones, del lado posterior o lateral. Se utilizaron dos hisopos por vaca, dentro del mismo tubo de agua peptonada. Como se contaba con doble inóculo por animal los datos de hisopados se dividieron a la mitad en el análisis.

### **3.2.3 Muestras de heces y suelo**

Las muestras se colectaron en frascos estériles dentro del corral de espera de cada tambo de manera aséptica. Se seleccionaron al azar heces recién depositadas (fresca) por las vacas antes de ser ordeñadas. Para la colecta de suelo se tuvo especial cuidado en eliminar las capas superficiales, asegurando la colecta de suelo en los alrededores del corral de espera y las instalaciones de ordeño.

### **3.2.4 Muestras de leche**

Las muestras de leche fueron obtenidas en frascos estériles de 100 ml a la entrada del tanque de frío durante el ordeño en el momento que la leche fluye desde la máquina de ordeño.

### **3.2.5 Muestras de ración**

La muestra fue obtenida asépticamente del recipiente donde deposita el alimento en la sala de ordeño.

En cada establecimiento, las muestras fueron mantenidas bajo refrigeración (4°C) para su transporte y hasta el momento de procesamiento en la Unidad de Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Agronomía.

### **3.3 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

#### **3.3.1 Procesamiento de muestras de leche**

Las muestras de leche previamente homogenizadas y pasadas por vortex por 1 min. se sometieron a un tratamiento térmico, 80°C durante 10 min en baño maría (Coorevits et al., 2008); se sembraron previamente homogenizado en placas de Petri utilizando el método de siembra en superficie. Los distintos medios utilizados fueron:

- PCA (Plate count agar) adicionado de 1% de Caseína.
- PCA adicionado de 1% de Caseína y de Azul de Bromotimol (1mg L<sup>-1</sup>).

El azul de bromotimol es un indicador de pH. variaciones en el color de la placa verifican los cambios en el pH que provocan los organismos que están creciendo dentro de la placa. El azul de bromotimol en medio ácido (pH<6.6) vira a color amarillo, en medio básico (pH>7.6) vira a azul mientras que si se mantiene en medio neutro su color (original) es verde. Estos cambios se visualizan en la Figura No. 1 de los anexos.

Las muestras sembradas se incubaron de 24 a 48 hs. en estufa a 37°C.

El recuento de mesófilas totales se analizó exclusivamente para leche cruda en los mismos medios mencionados anteriormente.

#### **3.3.2 Procesamiento de muestras de heces, suelo y ración**

Se pesó de manera estéril y se diluye 1g. de muestra en un tubo conteniendo 9 ml de solución salina fisiológica (SSF). Luego de realizado el tratamiento térmico arriba descrito realizan diluciones seriadas y luego se siembran en los medios previamente mencionados a 37°C durante 24 a 48 horas.

#### **3.3.3 Procesamiento de hisopados de ubre**

Los hisopos correspondientes al muestreo de las 4 vacas en cada período, fueron retiados y escurridos. Posteriormente los tubos con solución de transporte fueron sometidos a tratamiento térmico, y luego se sembraron en placas utilizando el método de diluciones seriadas.



### **3.4. ESTUDIO MICROBIOLÓGICO**

Los recuentos se registraron en planillas electrónicas para su posterior análisis estadístico utilizando el paquete estadístico SAS.

El análisis estadístico de la información de los hisopados se realizó de acuerdo a un modelo completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos (4 productores y 3 períodos). El análisis se realizó utilizando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS.

#### **3.4.1 Recuento, morfología de colonias y selección de aislamientos**

Finalizado el período de incubación, se realizaron los recuentos y el reconocimiento morfológico de la colonia según los criterios de tamaño, color, tipo de superficie, forma, elevación y tipo de márgenes. Asimismo se consideraron aspectos accesorios como la formación de goma (producción de exopolisacáridos) y la presencia de actividad proteolítica en medio (formación de halos de proteólisis). Se seleccionaron un total de 319 aislamientos para su posterior caracterización. Finalmente, se seleccionaron colonias en forma aleatoria considerando la abundancia relativa de cada tipo de morfología.

Las cepas aisladas fueron sometidas a pruebas bioquímicas de rutina (catalasa, oxidasa y tinción de Gram).

### **3.5 PRUEBAS MOLECULARES**

Para la identificación de las especies de éste trabajo se utilizaron las técnicas de RAPD-PCR y secuenciación del gen 16S rADN.

#### **3.5.1 Aislamiento de ADN**

Cultivos puros de cada aislamiento se sembraron en caldo Triptona Soya (TSB, Oxoid Ltd. UK) y se incubaron a 37°C durante 24 hs. Se observaron y registraron las peculiaridades del crecimiento en tubo. Las células se cosecharon a 10.000 rpm durante 5 minutos en una centrifuga de mesa Spectrofuge 7M (Labnet International Inc. USA), los paquetes celulares se resuspendieron en 200 µL de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0). El ADN fue purificado utilizando un Kit comercial de ADN genómico (Fermentas International Inc. USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, el ADN se resuspendió en 40 µL de buffer TE y se utilizó como molde en las reacciones de amplificación.

### **3.5.2 Análisis RAPD-PCR**

El análisis RAPD se realizó en 25 µL de reacción que contenía: 1X Thermo buffer (Fermentas USA), 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP (Fermentas USA), 1U Taq polimerasa (Fermentas USA), 1mM primer OPR13 (Rominus et al., 1997) y 20 ng de ADN molde. La amplificación se realizó en un termociclador Corbett CG1-96 (Corbett Research UK) con los siguientes parámetros: desnaturalización a 94°C por 3 min y 45 s; 35 ciclos cada uno de 94°C por 15 s, 36°C por 15 s y 72°C por 2 min; y un paso de extensión final de 72°C por 4 min (Rominus et al. 1997). Se incluyeron controles negativos sin ADN molde. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1.8% utilizando buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) y 10 V/cm para la corrida. Los geles se tiñeron con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio y se visualizaron y fotografiaron en un transiluminador UV.

### **3.5.3 Identificación de aislamiento por análisis de la secuencia del gen 16S**

#### **rADN**

Los aislamientos que presentaron distintos perfiles de OPR13 RAPD se identificaron por análisis de secuencia del gen 16S rADN. Se realizaron 25µl de reacción conteniendo 1X Thermo buffer (Fermentas, USA), 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP (Fermentas, USA), 1U Taq polymerase (Fermentas USA), 0.2 mM de cada cebador (fD1 and rD1) y 20 ng ADN molde. Los cebadores fD1 y rD1 se usaron para amplificar un fragmento de 1540 bp del gen 16S rADN (Weisburg et al. 1991). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización de 94°C por 7 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 56°C por 1 min y 72°C por 1 min y una extensión final de 72°C por 10 min. Todos los experimentos incluyeron un control negativo sin ADN molde. Los amplicones fueron purificados y 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 database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para la identificación de aislamientos basados en la similitud de secuencia.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 RECIENTOS

#### 4.1.1 Recuentos según fuente por período

Cuadro No. 3 Recuentos de microorganismos termodúricos ( $\log_{10}$  UFC,  $\mu \pm$  d.e.) en heces, suelos, ración y leche cruda en los diferentes períodos de muestreos

Período	Otoño	Invierno	Primavera
Heces	6.145 $\pm$ 0.356	5.677 $\pm$ 0.838	5.767 $\pm$ 0.852
Suelo	6.388 $\pm$ 0.219	6.171 $\pm$ 0.388	6.414 $\pm$ 0.323
Ración	4.033 $\pm$ 0.580	4.379 $\pm$ 0.977	4.678 $\pm$ 0.401
Leche	0.674 $\pm$ 0.135	1.938 $\pm$ 0.376	0.006 $\pm$ 0.769

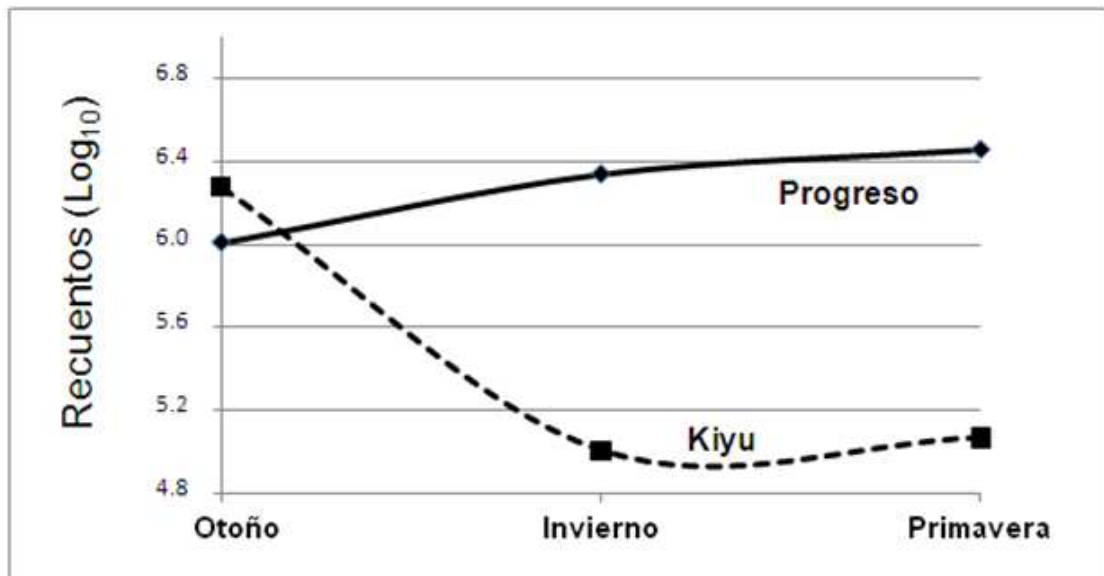
El Cuadro No. 3 muestra los recuentos de microorganismos termodúricos encontrados en las fuentes de contaminación analizadas para los 3 períodos. Para las heces se visualizan conteos promedios elevados en contraste con lo encontrado por otros autores citados en la revisión bibliográfica. Distintos autores mencionan recuentos máximos de  $10^4$  UFC/g, mientras que en este trabajo exceden esa cifra ampliamente en los 3 períodos llegando a alcanzar en promedio  $10^6$  UFC/g en los meses de otoño.

En cuanto al suelo y la ración los datos indican que no existieron diferencias entre los 3 períodos analizados ni entre las 2 zonas de muestreo ( $p < 0.05$ ). Las dos zonas de muestreo se corresponden con Progreso y Kiyú. El suelo y la ración son fuentes de contaminación primaria que están presentes siempre, independientemente del período del año.

En leche si existe una variación entre los 3 períodos siendo mayores los recuentos de microorganismos termodúricos en el invierno.

#### 4.1.2 Recuento en heces

Figura No. 2 Recuento en heces para los 3 períodos en las 2 zonas



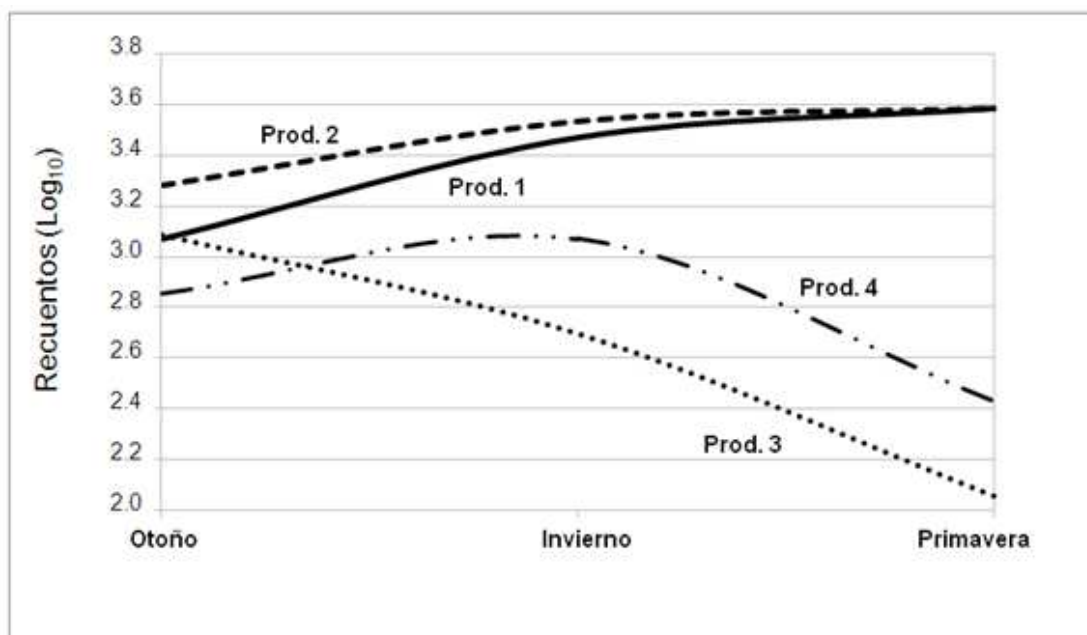
En la Figura No. 2 se visualizan los recuentos de microorganismos en heces en los 3 períodos analizados. Como se comentó en el Cuadro No. 3 los recuentos son elevados en comparación con los encontrados por otros autores.

Para la zona de Progreso los recuentos fueron más elevados que para la zona da Kiyú. Al analizar éstos datos se encuentran correspondencias con los presentados a continuación (recuentos en hisopados), pudiendo establecer a las heces como fuente de contaminación primaria sumamente relevante. A diferencia de lo expresado anteriormente, varios autores Sutherland y Murdoch (1993), Vaerewijck et al. (2001), Scheldeman et al. (2005), De Jonghe et al. (2009) mencionan al suelo como principal fuente de contaminación, sin embargo en éste trabajo parecerían aportar más contaminación las heces.

Coorevits et al. (2007) plantea que los cambios de alimentación conducen a una fuerte reducción en la consistencia de las heces incrementando su potencial de contaminación de las ubres. En el período invernal las pasturas reducen sustancialmente su contenido de materia seca y con eso una fuerte reducción en la consistencia de heces.

#### 4.1.3 Recuentos en hisopados

Figura No. 3 Recuentos de hisopados por período para los 4 productores



En la Figura No. 3 se resume la información de los conteos de microorganismos en los hisopados de ubre. El análisis estadístico de la información indicó diferencias significativas entre productores y la interacción productor\*período.

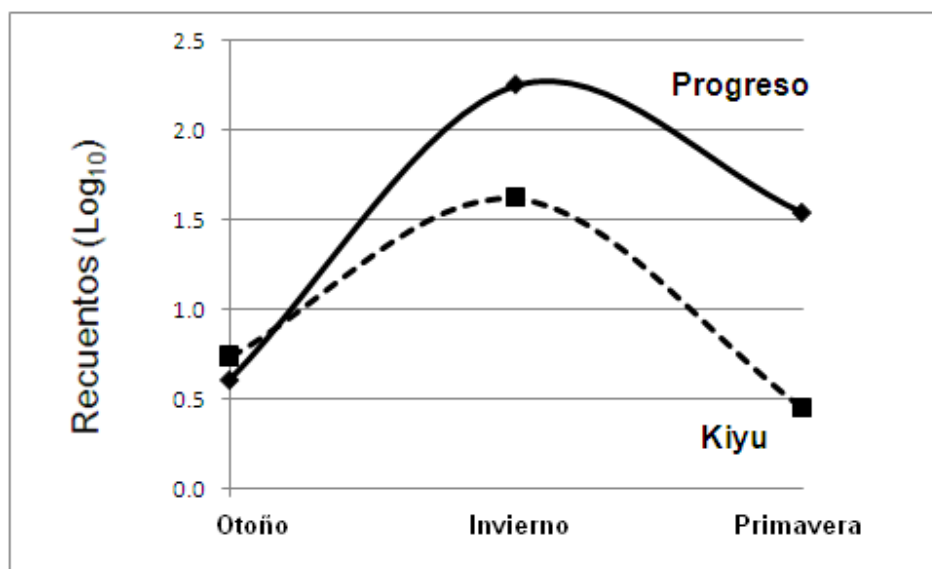
Los productores 1 y 2 que se ubican en la zona de Progreso presentaron mayor concentración de microorganismos en hisopados cuando se contrastaron con los productores 3 y 4 que se ubican en la zona de Kiyú. El análisis de la interacción indicó que esas diferencias entre productores no se visualizan en el otoño mientras que en invierno y primavera se hicieron significativas ( $P < 0.01$ ).

Las características del suelo descritas en el compendio de suelos del Uruguay (URUGUAY. MGAP. DSA, 2001) indican las diferencias que existen en el tamaño de partícula en los suelos de los distintos establecimientos trabajados. Los suelos de Progreso son de textura franco - arcillosa, mientras que los de Kiyú son franco - limosas, lo anterior condiciona las características de drenaje y la propensión de éstos suelos a generar barro en las cercanías de la sala de ordeño. Desde éste enfoque las diferencias encontradas pueden explicarse por una mayor presencia en el tiempo de suelos con mayor contenido de humedad y con ello mayor nivel de contaminación.

Carlin (2010) menciona que el suelo se compone por diferentes fracciones constituyendo una gran diversidad de nichos ecológicos donde se desarrollan diversos microorganismos.

#### 4.1.4 Recuentos en leche

Figura No. 4 Recuentos en leche dentro de los 3 períodos para las 2 zonas



La Figura No. 4 muestra los recuentos de microorganismos termofílicos en la leche en los 3 períodos analizados y por zona de trabajo. Es en la leche donde se refleja la contaminación proveniente de las distintas fuentes de contaminación analizadas; tanto de las fuentes primarias (suelo, heces y ración) como de las fuentes de transmisión (hisopados).

Tal como se vió en las Figuras anteriores en la zona de Progreso se obtuvieron recuentos más elevados en las fuentes de contaminación analizadas y por lo tanto más contaminación llega a la leche obtenida. A su vez, se visualiza claramente que en el invierno ambas zonas presentaron los recuentos más altos disminuyendo hacia la primavera.

Finalmente es importante mencionar que las diferencias encontradas en recuentos en leche y suciedad de los animales (hisopados) coincidieron con una mayor escala de suciedad asociada a la zona de Progreso en todos los períodos analizados (Ver sistema de puntuación de la limpieza de Schreiner y Ruegg (2003) en Anexos).

Los niveles de contaminación ambiental fueron similares para todos los períodos en las dos zonas correspondiéndose con hongos y levaduras.

## 4.2 GELES

Figura No. 5 Perfiles de RAPD obtenidos de aislamientos en distintas muestras

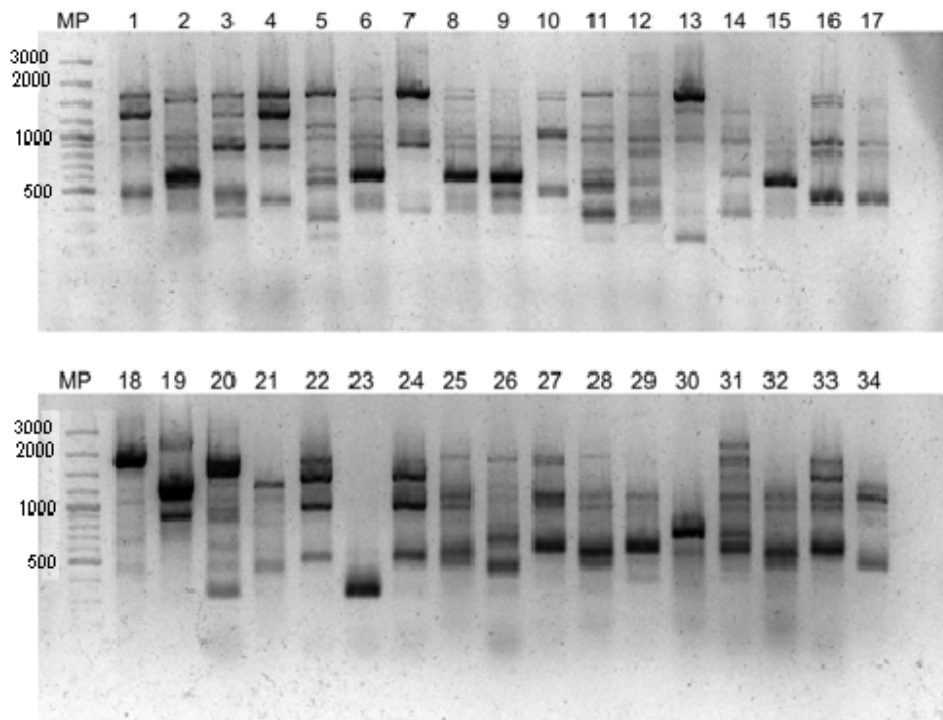


Figura No. 5: Perfiles de RAPD de aislamientos obtenidos de distintas muestras. Carriles: 1, 3, 4, 12, 24, 26, 33 *Bacillus subtilis*, 6, 8, 9, 25, 28, 32 *Bacillus licheniformis*, 2, 7, 10, 13, 18, 20, 22, 27, 34 *Bacillus megaterium*, 5, 11 *Bacillus pumilus*, 16, 17 *Paenibacillus barcinonensis*, 14, 21 *Bacillus thuringiensis*, 15, 31 *Bacillus niacini*, 19 *Bacillus amyloliquefaciens*, 29 *Bacillus pseudomycoides*, 23, 30 No esporulado. Marcador de peso molecular (MP). 3000 pb, 2000 pb, 1500 pb, 1200 pb, 1000 pb, 900 pb, 800 pb, 700 pb, 600 pb, 500 pb, 400 pb, 300 pb, 200 pb, 100 pb.

Se agruparon los perfiles de RAPD por similitudes en el bandeo. A partir de los perfiles de cada grupo y evaluando características fenotípicas de cada una se identificó la especie, enviando los perfiles específicos a secuenciación de 16s rDNA a Macrogen (Corea) uno o dos aislamientos representativos de cada grupo para mayor seguridad en la identificación.

### 4.3 DIVERSIDAD Y ABUNDANCIA RELATIVA

CUADRO No. 4 Abundancia relativa (%) de aislamientos de microorganismos esporulados aeróbicos en diferentes fuentes de contaminación en el tambo

	RACIÓN	HECES	SUELO	HISOPADOS	LECHE
<i>B. licheniformis</i>	62	72	52	94	76
<i>B. subtilis</i>	28	22	24	4	9
<i>B. pumilus</i>	0.5	2.5	13	0.4	7
<i>B. megaterium</i>	nd	1.5	5	0.1	5
<i>B. amyloliquefaciens</i>	2	0.5	0.5	0.5	1
<i>B. circulans</i>	nd	0.5	nd	0.1	nd
<i>B. barbaricus</i>	0.5	nd	nd	0.1	nd
<i>B. cereus</i>	nd	nd	0.5	nd	nd
<i>B. arbutinovorans</i>	nd	nd	0.2	nd	nd
<i>B. niacini</i>	nd	0.8	0.5	0.2	nd
<i>B. psychrodurans</i>	nd	nd	0.8	nd	nd
<i>B. thuringiensis</i>	nd	nd	0.5	nd	nd
<i>B. pseudomycoides</i>	nd	0.2	0.5	nd	nd
<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	nd	nd	0.5	nd	nd
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	nd	nd	nd	0.1	nd
No identificadas	7	0	2	0.5	2

nd: no detectada

En el Cuadro No. 4 se aprecia la diversidad relativa de las especies del género *Bacillus* encontradas y las fuentes donde fueron localizadas las mismas.

En coincidencia con Sutherland y Murdoch (1993), Vaerewijck et al. (2001), Scheldeman et al. (2005), De Jonghe et al. (2009) la ubicación natural de las bacterias aerobias formadoras de esporas se corresponde con las fuentes potenciales de contaminación de la leche. El suelo es considerado la principal fuente de contaminación y la que aporta la mayor diversidad de microorganismos, tal como se aprecia en el Cuadro No. 4. Pero es de destacar que hay especies que se encuentran en todas las fuentes de contaminación y



en un porcentaje elevado, mientras que otras especies se presentan pero en proporciones escasas.

La especie presente por excelencia es *B. licheniformis*, encontrándose en todas las fuentes primarias en altas proporciones, se transmite por los animales llegando a la leche y siendo la principal especie encontrada en la misma. Vissers (2007) establece que las fuentes primarias de contaminación son: suelo, heces y ración, mencionando también la transmisión de microorganismos por lo animales. Crielly et al. (1994) menciona a *B. licheniformis* como la especie de mayor importancia en la industria para la manufactura de algunos productos.

Las especies halladas en menor proporción fueron identificadas en las fuentes primarias de contaminación y en pocos casos en los animales pero ninguna de ellas llegó a la leche. *B. cereus* posee una proporción llamativamente baja con referencia a Crielly et al. (1994) que menciona a ésta especie con particular importancia en la industria láctea por ser patógena. Lo anterior se justifica con la metodología de trabajo ya que las condiciones de toma de muestra y de procesamiento no fueron adecuadas para permitir su crecimiento. Como se mencionó en materiales y métodos las muestras de leche se tomaron justo a la entrada del tanque de leche (temperatura de la leche aprox. 37° C), según Christiansson et al. (1998) *B. cereus* se caracteriza por ser un microorganismo psicrotófo y crecer en el tanque de leche formando parte del biofilm del equipo cuando la leche se refrigera para su conservación.

A su vez, se observa que cuando los animales consumen alimentos (concentrados comerciales) contaminados, grandes cantidades de esporas son capaces de sobrevivir en el trayecto del tracto digestivo apareciendo y concentrándose en heces. Según Vaerewijck et al. (2001), Scheldeman et al. (2005), Vissers (2007) el suelo y las heces se adhieren a la ubre de los animales, siendo éstos una fuente de transmisión de la contaminación que finalmente alcanza la leche.

En el producto final las especies encontradas fueron: *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. megaterium* y *B. amyloliquefaciens* en ese orden según sus proporciones. Otros autores Vaerewijck et al. (2001), Coorevits et al. (2008), Reginensi et al (2011) también reportan alguna de éstas especies como componentes principales de la diversidad de microorganismos aerobios formadores de esporas en la leche cruda.

CUADRO No. 5 Abundancia relativa (%) de las especies principales según fuente de contaminación en los períodos analizados

	Período	RACIÓN	HECES	SUELO	HISOPADOS	LECHE
<i>B. licheniformis</i>	Otoño	65	89	44	83	47
	Invierno	19	40	34	57	40
	Primavera	76	68	73	96	96
<i>B. subtilis</i>	Otoño	34	11	27	14	37,5
	Invierno	58	43	45	24	16
	Primavera	24	29	13	4	1,5
<i>B. pumilus</i>	Otoño	1	nd	28	1,5	12,5
	Invierno	nd	12	20	4	25
	Primavera	nd	1	5	nd	1,5
<i>B. megaterium</i>	Otoño	nd	nd	nd	nd	nd
	Invierno	nd	2	1	1	19
	Primavera	nd	1,5	9	nd	1
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Otoño	nd	nd	1	1,5	3
	Invierno	23	3	nd	14	nd
	Primavera	nd	0,5	nd	nd	nd

nd: no detectada

Como se mencionó antes las especies principales encontradas en las distintas fuentes de contaminación primarias y de transmisión fueron las 5 que aparecen el Cuadro No. 5. Sutherland y Murdoch (1993) coinciden en que las especies mesófilas aisladas en leche cruda son principalmente las mencionadas a excepción de *B. amyloliquefaciens*.

En términos generales se observa que *B. licheniformis* es la especie encontrada en mayor proporción en todas las fuentes y también se verifica su presencia en cantidades importantes en leche en los 3 períodos analizados. Estos resultados coinciden con los reportes de Crielly et al. (1994) donde *B. licheniformis* es la especie del género *Bacillus* más comúnmente aislada en leche cruda.

En cuanto a la estacionalidad de la misma se puede notar en el Cuadro No. 5 que existe una tendencia a incrementarse hacia la primavera ya que se visualiza un aumento substancial con referencia al otoño e invierno. *B. licheniformis* es una especie termófila, siendo este factor el que justifica su

abundancia en los meses con mayores temperaturas. Diversos autores hacen referencia a la distribución estacional de ésta especie presentando resultados similares y discordantes con éste trabajo. Hanus et al. (2004) encontraron que hacia el verano se incrementa significativamente ( $P < 0.05$ ) la media de *B. licheniformis*. Por otro lado, Logan (1988) menciona que los recuentos de *B. licheniformis* en la leche tratada térmicamente fueron generalmente más altos durante los meses de invierno, haciendo referencia también a que para ésta especie no existe una fuente única de contaminación sino que es ubicua en todo el ambiente del tambo. Sutherland y Murdoch (1993) coinciden con Logan (1988) y justifican el hecho expresando que es debido al incremento de la contaminación de la ubre con microorganismos provenientes del suelo y de las heces.

Por lo anterior, se sabe que existen dos posiciones en torno a los cambios estacionales con respecto a ésta especie, y por ello el tema amerita a profundizar los estudios.

En un segundo orden de importancia se encuentran *B. subtilis* y *B. pumilus*, con proporciones notablemente inferiores a *B. licheniformis*. La importancia de *B. subtilis* radica en que es una especie ubicua en todos los ambientes del tambo analizados. Lo anterior coincide con los datos obtenidos por Kolter et al. (2008) donde mencionan que *B. subtilis* es una especie bacteriana que exhibe una diversidad genómica considerable siendo capaz de crecer en ambientes heterogéneos incluyendo el tracto gastrointestinal de los animales, sobreviviendo al mismo y apareciendo también en heces. En cambio *B. pumilus* fue encontrada principalmente en el suelo, por ende se entiende que los contaminantes que aparecen en leche provienen principalmente de dicha fuente primaria de contaminación.

Como se ve en el Cuadro No. 5 para ambas especies se visualiza una tendencia a encontrarse en mayor proporción en los meses de invierno. En invierno es mayor el barro formado con las precipitaciones perdurando más tiempo el suelo húmedo, facilitándose el crecimiento y la dispersión (a través de los animales) de las esporas. Aparentemente bajo las condiciones que se dan en el invierno las poblaciones de estas especies se favorecerían.

En tercer orden de importancia dentro de las especies principales encontradas en éste trabajo se presentan: *B. megaterium* y *B. amyloliquefaciens*. Estas especies se presentan en bajas proporciones y no se encuentran en todas las fuentes de contaminación. *B. megaterium* fue principalmente encontrada en suelo tal como lo menciona Vary (1994). En cuanto a *B. amyloliquefaciens* se notó mayor proporción en ración.

Para englobar las especies encontradas se presenta un cuarto orden donde se están las especies que aparecieron en muy baja proporción. Es relevante aclarar que el objetivo de este trabajo no fue la búsqueda y evaluación de la diversidad de especies que forman parte del ambiente del tambo como si se lo plantearon otros autores. En este trabajo se encontraron: *B. circulans*, *B. barbaricus*, *B. cereus*, *B. arbutinovorans*, *B. niacini*, *B. psychrodurans*, *B. thuringiensis*, *B. pseudomycoides*, *Paenibacillus barcinonensis* y *Lysinibacillus sphaericus*. Por otro lado, Crielly et al. (1994) estudiaron la flora de *Bacillus* en leche y productos en busca de diversidad encontrando las siguientes especies: *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. firmus*, *B. subtilis*, *B. coagulans* y *B. sphaericus*.

Scheldeman et al. (2005) enfatizaron su estudio en la incidencia de la diversidad potencial de las esporas resistentes al calor en distintos tambos obteniendo las siguientes especies: *B. barbaricus*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. farraginis*, *B. flexus*, *B. fordii*, *B. fortis*, *B. licheniformis*, *B. oleronius*, *B. pallidus*, *B. smithii*, *B. sphaericus*, *B. sporothermodurans*, *B. subtilis*, *B. thermoamylovorans*, *Brevibacillus agri*, *Brevibacillus brevis*, *Paenibacillus lactis*, *Paenibacillus thiaminolyticus*, *Aneurinibacillus aneurinilyticus*, *Aneurinibacillus thiaminolyticus*, *Ureibacillus thermosphaericus*, *Virgibacillus sp.*, entre otras.

A nivel industrial existen distintas fases en la manufactura de los productos especialmente de alta temperatura que generan ambientes con las condiciones ideales para el crecimiento de microorganismos termófilos del género *Bacillus*. La mayoría de las bacterias termófilas no son patógenas sin embargo, a nivel industrial se generan condiciones que permiten la germinación de las esporas, con la consiguiente producción de enzimas (proteolíticas y lipolíticas) y alteración del producto final.

La importancia radica en que éstos “contaminantes industriales” son difíciles de eliminar del ambiente de manufactura debido a la gran resistencia de sus esporas al calor, a productos químicos y a la capacidad de formar biofilms. Las esporas son capaces de sobrevivir a baja actividad de agua, altas temperaturas de procesamiento o de secado y hasta incluso al proceso de CIP (Cleaning in Place).

Según Reginensi et al. (2011) existen microorganismos en la industria que no provienen del ambiente del tambo. Este tipo de microorganismos cuya fuente es la propia industria son sumamente importantes. Es el caso de *Anoxybacillus flavithermus*.

## **5. CONCLUSIONES**

La presencia de *Bacillus* como contaminantes industriales es una problemática recurrente en la manufactura de algunos productos lácteos.

Los componentes de la leche constituyen un buen sustrato para la multiplicación de diversos microorganismos de deterioro que persisten los distintos tratamientos térmicos aplicados en la elaboración de los productos afectando su calidad y seguridad. Sin embargo, la contaminación industrial puede incrementarse dentro de los mismos procesos y por inadecuada limpieza.

Las especies que se encontraron principalmente fueron las siguientes: *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. megaterium* y *B. amyloliquefaciens*. Dentro de éstas se destaca a *B. licheniformis* por ser ubicua en todas las fuentes de contaminación analizadas y por presentarse en altas proporciones.

De todas las fuentes de contaminación trabajadas, se puede concluir que el suelo es la que presenta mayor diversidad de especies como: *B. circulans*, *B. barbaricus*, *B. cereus*, *B. arbutinovorans*, *B. niacini*, *B. psychrodurans*, *B. thuringiensis*, *B. pseudomycooides*, *Paenibacillus barcinonensis* y *Lysinibacillus sphaericus*. Destacando que estas no persisten finalmente en la leche.

El suelo y las heces son las principales fuentes contaminantes en cuanto a la cantidad de microorganismos por gramo. La ración presentó menor concentración de microorganismos por gramo pero si se la establece como fuente de contaminación constante en los distintos períodos analizados.

Los recuentos de heces y de hisopados presentan una clara asociación a las zonas de trabajo (Progreso y Kiyú), reduciendo el potencial contaminante en invierno y primavera. Lo anterior se asocia a la presencia de suelos arcillosos y más inundables en la zona de Progreso.

En cuanto a los recuentos de microorganismos termodúricos en leche, se presentó un pico en invierno que es coincidente con los cambios señalados previamente y también asociado fuertemente a un cambio en la consistencia de las heces en ese período.

## 6. RESUMEN

La leche es un producto complejo en su composición, constituyendo un sustrato adecuado para la multiplicación de diversos microorganismos. Previo al procesamiento existen varias fuentes de contaminación de la leche con microorganismos. A nivel de tambo las fuentes principales son: las heces, el suelo, la ración, los animales y el aire. Este trabajo se focaliza en microorganismos el género *Bacillus* por su importancia como contaminantes industriales, afectando la calidad de los productos finales. Como objetivo principal se planteó la identificación de distintas fuentes de contaminación de microorganismos termodúricos aerobios en cuatro tambos ubicados en Canelones y San José en tres períodos del año 2010 (otoño, invierno y primavera). Más específicamente se planteó, el análisis de la diversidad de especies esporuladas aeróbicas encontradas en los distintos tambos haciendo referencia a la fuente de contaminación y al período de muestreo. Y la evaluación de la abundancia relativa de dichas especies también en relación a cada período y a la fuente de contaminación. La metodología de trabajo consistió en la toma de muestras en los 3 períodos analizados para los 4 tambos. Procesadas las muestras en el laboratorio se identificaron las especies encontradas en cada fuente y en cada período. Las 5 especies principales encontradas son: *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. megaterium* y *B. amyloliquefaciens*. Entre las anteriores se destaca a *B.licheniformis* por ser una especie ubicua en todas las fuentes evaluadas y presentarse en mayor proporción que las demás. A su vez, se encontraron otras especies minoritarias como: *B. circulans*, *B. barbaricus*, *B. cereus*, *B. arbutinovorans*, *B. niacini*, *B. psychrodurans*, *B. thuringiensis*, *B. pseudomycoides*, *Paenibacillus barcinonensis* y *Lysinibacillus sphaericus* que provienen principalmente del suelo. Sin embargo éstas especies no fueron encontradas en leche. El suelo y las heces son los contaminantes principales en cuanto a la cantidad de microorganismos por gramo. La ración presentó menor concentración de microorganismos por gramo siendo una fuente de contaminación constante en los distintos períodos analizados. Las heces y los hisopados presentan una clara asociación a las zonas de trabajo (Progreso y Kiyú), reduciendo el potencial contaminante en invierno y primavera. Lo anterior se asocia a la presencia de suelos inundables en la zona de Progreso. Asimismo la leche presentó un pico de esporulados en invierno que es coincidente con los

cambios señalados previamente y también asociado fuertemente a un cambio en la consistencia de las heces en ese período.

Palabras clave: Leche cruda; Fuentes de contaminación en tambo; Microorganismos Termodúricos; *Bacillus*.

## **7. SUMMARY**

Milk is synthesized in specialized cells of the mammary gland and is virtually sterile when secreted into the alveoli of the udder, beyond this stage of milk production microbial contamination can occur. Bacterial contamination of raw milk can originate from different sources: air, feed, feces, soil, animals and milking equipment (environmental contaminants). The majority of spore-formers in milk belong to the genus *Bacillus*. The aim of this study was to identify different sources of contamination of the raw milk with thermophilic aerobic microorganisms in four dairy farms located in Canelones and San José in three periods of the year 2010 (autumn, winter and spring). This objective was performed by qualitative and quantitative analysis of contaminants from different sources taking in account different farmers and sampling seasons. Feces, soil, feed concentrate, udder swabs, and milk were sampled and analyzed for each farmer and sampling season to quantify (UFC/ml or UFC/g) species identification. Five main species were found in this study; *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. megaterium* and *B. amyloliquefaciens*. *B. licheniformis* was the most important due to its abundance and also because it is ubiquitous in all sources analyzed. Soil is the main source of species diversity and we found species such as: *B. circulans*, *B. barbaricus*, *B. cereus*, *B. arbutinovorans*, *B. niacini*, *B. psychrodurans*, *B. thuringiensis*, *B. pseudomycooides*, *Paenibacillus barcinonensis* y *Lysinibacillus sphaericus*. None of this species survives and appears in milk. In our study, soil and feces were the main contaminants with the higher colony former units concentrations. Feed concentrate had a lower contribution and it was fairly constant among seasons. On the other side, feces spore-formers concentration decrease from autumn to spring only for farmers located at Kiyú. The same pattern of contamination was found for udder swab counts. Milk spore-formers contaminants showed a peak during winter, meanwhile spore count decrease during both autumn and spring. Basic information about contaminant primary sources allow the development of effective strategies for reducing or eliminating their presence in raw milk. Cow cleanness seems to be a key management tool for reducing microbial load, particularly in clay soils during the winter season.

Keywords: Raw milk; Sources of contamination on dairy's farms; Spore-formers; *Bacillus*.



## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. ADAMS, D.M.; BARACH, J.T.; SPECK, M. 1974. Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. *Journal of Dairy Science*. 58(6). 828-834.
2. BANYKÓ, J.; VYLETELOVÁ, M. 2008. Determining the source of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* isolated from raw milk, pasteurized milk and yoghurt. *The Authors Journal Compilation. Letters in Applied Microbiology*. 48. 318-323.
3. BURGUESS, S.; LINDSAY, D.; FLINT, S., 2010. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. Palmerston, New Zeland. Fonterra Research 52 p.
4. CARBALLO, A.V.; ILUNDAIN, M.; INCIARTE, J.L.; LATASTE, J.M. 1999. Estudio de la contaminación microbiana en la leche en seis tambos del departamento de Flores en dos épocas del año. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 61 p.
5. CARLIN, F., 2010. Origin of bacterial spores contaminating foods. *Food Microbiology*. 28. 177-182.
6. CENIS, J. L. 1997. Identificación varietal de plantas. Nuevas técnicas moleculares. (en línea). Madrid, España, s.e. Consultado ene. 2011. Disponible en <http://www.terraia.com/articulo.php?recordID=1208>
7. COOREVITS, A.; DE JONGHE, V.; VANDROEMME, J.; REEKMANS, R.; HEYRMAN, J.; MESSENS, W.; DE VOS, P.; HEYNDRICKX, M. 2008. Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. *Applied Microbiology*. 31: 126-140.
8. CRIELLY, E.M.; LOGAN, N.A.; ANDERTON, A. 1994. Studies on the *Bacillus* flora of milk and milk products. *Journal of Applied Bacteriology*. 77: 256-263.
9. CHRISTIANSSON, A.; BERTILSON, J.; SVENSSON, B. 1998. *Bacillus cereus* in raw milk; factors affecting the contamination of milk during the grazing period. *Journal of Dairy Science*. 82: 305-314.

10. DE JONGHE, V.; COOREVITS, A.; DE BLOCK, J.; VAN COILLIE, E.; GRIJSPEERDT, K.; HERMAN, L.; DE VOS, P.; HEYNDRICKX, M., 2009. Toxigenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. *International Journal of Food Microbiology*. 136. 318-325.
11. FOLTYS, V., KIRCHNEROVÁ, K. 2006. Mesophilic and psychrotrophic aerobe sporulating microorganisms in raw cow's milk. *Central European Journal of Biology*. 1. 545-560.
12. FRIONI, L. 2006. *Microbiología básica, ambiental y agrícola*. Montevideo, Facultad de Agronomía. 464 p.
13. GUAMIS, B.; HUERTA, T.; GARAY, E. 1987. Heat- inactivation of bacterial proteases in milk before UHT- treatment. *Milchwissenschaft*. 42. 651-653.
14. HANUS, O.; FRELICH, J.; VYLETELOVÁ, M.; ROUBAL, P.; VORLICEK, Z.; JEDELSKA, R. 2004. Technologically difficult, pathogenic and food risky bacterial contamination of raw milk and other materials from dairy herds. *Czech Journal of Animal Science*. 49. 489-499.
15. HOLT, J.; KRIEG, N.; SNEATH, P.; STALEY, J.; WILLIAMS, S. 1994. *Bergey's manual or determinative bacteriology*. 9<sup>th</sup>. ed. s.l., Williams y Wilkins. 787 p.
16. HUCK, J.R.; HAMMOND, B.H.; MURPHY, S.C.; WOODCOCK, N.H.; BOOR, K.J. 2007. Tracking spore-forming bacterial contaminants in fluid milk-processing systems. *Journal of Dairy Science*. 90. 4872-4883.
17. \_\_\_\_\_; SONNEN, M.; BOOR, K. J. 2008. Tracking heat-resistant, cold-thriving fluid milk spoilage bacteria from farm to packaged product. *Journal of Dairy Science*. 91. 1218-1228.
18. KENNETH, T. 2011. The Genus *Bacillus*. Online textbook of bacteriology. (en línea). Madison, Wisconsin, s.e. Consultado feb. 2011. Disponible en [http://www.textbookofbacteriology.net/kt\\_contact.html](http://www.textbookofbacteriology.net/kt_contact.html)

19. KOLTER, R.; EARL, A.; LOSICK, R. 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. Trends Microbiology. 16(6): 269.
20. LOGAN, N. A. 1988. Bacillus species of medical and veterinary importance. Journal of Medical Microbiology. 25. 157-165.
21. MAGNUSSON, M.; CHRISTIANSSON, A.; SVENSSON, B.; KOLSTRUP, C. 2006. Effect of different premilking manual teat-cleaning methods on bacterial spores in milk. American Dairy Science Association. 89. 3866-3875.
22. MARTIN, J.H.; HARPER, W.J.; GOULD, I.A. 1966. Ultra- high temperature effects on selected *Bacillus* species. Journal of Dairy Science. 49. 1367-1370.
23. MURPHY, S.C; BOOR, K.J., 2000. Sources and causes of high bacteria counts in raw milk. Ithaca, NY. Dairy, Food and Environmental. 6 p.
24. PARKAR, S.G.; FLINT, S.H., BROOKS, J.D. 2003. Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel. Journal of Microbiology. 96. 110-116.
25. RASOLOFO, E.A; ST-GELAIS, D.; LAPOINTE, G. ROY, D.; 2010. Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated milk. International Journal of Food Microbiology. 138. 108-118.
26. REGINENSI, S.M.; GONZALEZ, M.; OLIVERA J.A.; SOSA, M.; JULIANO, P.; BERMUDEZ, J. 2011. Screening for spore-forming bacterial populations in Uruguay commercial powdered milk. International Journal of Food Microbiology. 148. 36-41.
27. SCOOT, S.A.; BROOKS, J.D.; RAKONJAC, J.; WALKER K.M.; FLINT, S.H. 2007. The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder. International Journal of Dairy Technology. 60. 109-117.
28. SCHELDEMAN, P.; PIL, A.; HERMAN, L.; DE VOS, P.; HEYNDRIKX, M. 2005. Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farms. Applied and Environmental Microbiology. 71. 1480-1494.

29. SCHREINER, D. A.; RUEGG, P. L. 2003. Relationship between udder and leg hygiene scores and subclinical mastitis. *Journal Dairy of Science*. 86. 3460–3465.
30. SLAGHUIS, B. A.; TE GIFFEL, M. C.; BEUMER, R.R.; ANDRE, G. 1997. Effect of pasturing on the incidence of *Bacillus cereus* Spores in raw milk. *International Dairy Journal*. 7. 201-205.
31. SUTHERLAND, A.D.; MURDOCH, R. 1993. Seasonal occurrence of psychrotrophic *Bacillus* species in raw milk, and studies on the interactions with mesophilic *Bacillus* sp. *International Journal of Food Microbiology*. 21. 279-292.
32. UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA (URUGUAY). FACULTAD DE AGRONOMÍA. 2005. Guía de clase. Curso de Microbiología. Montevideo. 149 p.
33. URUGUAY. MINISTERIO DE GANADERIA AGRICULTURA Y PESCA. DIRECCIÓN DE ESTADÍSTICAS AGROPECUARIAS. 2011. Anuario estadístico agropecuario 2010. Montevideo. 240 p.
34. \_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. DIRECCION GENERAL DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES. 1994. Índice de productividad de Suelos CONEAT. Montevideo. 182 p.
35. \_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. DIVISION DE SUELOS Y AGUAS. 2001. Compendio de Suelos del Uruguay. Montevideo. 1 disco compacto.
36. VAEREWIJCK, M.J.M.; DE VOS, P.; LEBBE, L.; SCHELDEMAN, B.; HOSTE, B.; HEYNDRICKX, M. 2001. Occurrence of *Bacillus sporothermodurans* and other aerobic spore-forming in feed concentrate for dairy cattle. *Journal of Applied Microbiology*. 91. 1074-1084.
37. VARY, P. 1994. Prime time for *Bacillus megaterium*. Review article. *Microbiology*. 140. 1001-1013.
38. VISSERS, M. M. M.; TE GIFFEL, M. C.; DRIEHUIS, F.; DE JONG, P.; LANKVELD, J. M. G. 2007a. Minimizing the level of *Bacillus cereus* spores in farm tank milk. *Journal of Dairy Science*. 90. 3286-3293.

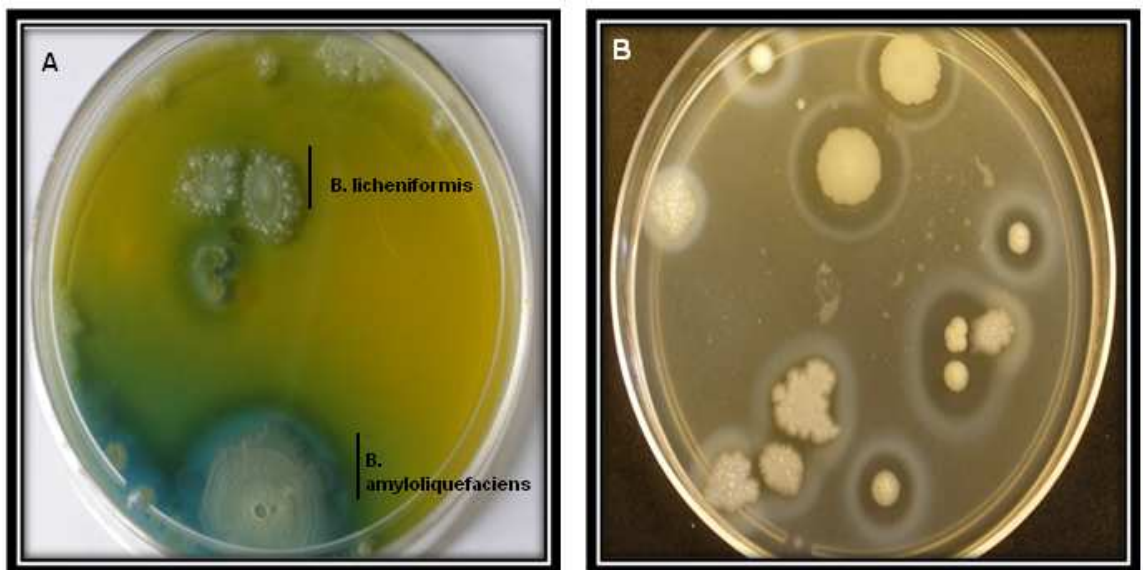
39. \_\_\_\_\_. 2007b. Modeling to control spores in raw milk. PhD. Tesis. Wageningen, The Netherlands. Wageningen University. 144 p.
40. YILMAZ, M.; SORAN, H.; BEYATLI, Y. 2005. Antimicrobial activities of some *Bacillus* spp. strains isolated from the soil. *Micobiological Research*. 161. 127-131.

## 9. ANEXOS

### 9.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS PRINCIPALES ESPECIES ENCONTRADAS DEL GÉNERO *BACILLUS*

Las principales especies del género *Bacillus* encontradas en éste trabajo fueron: *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium* y *B. pumilus*. Lo anterior es coincidente con los reportes de otros autores (Sutherland y Murdock 1993, Vaerewijck et al. 2001, Coorevits et al. 2008, Banykó y Vyletelová 2009, De Jonghe et al. 2010)

FIGURA No. 1 Características morfológicas de las especies en medios PCA-Caseína-Azul de Bromotimol (A) y PCA-Caseína (B)



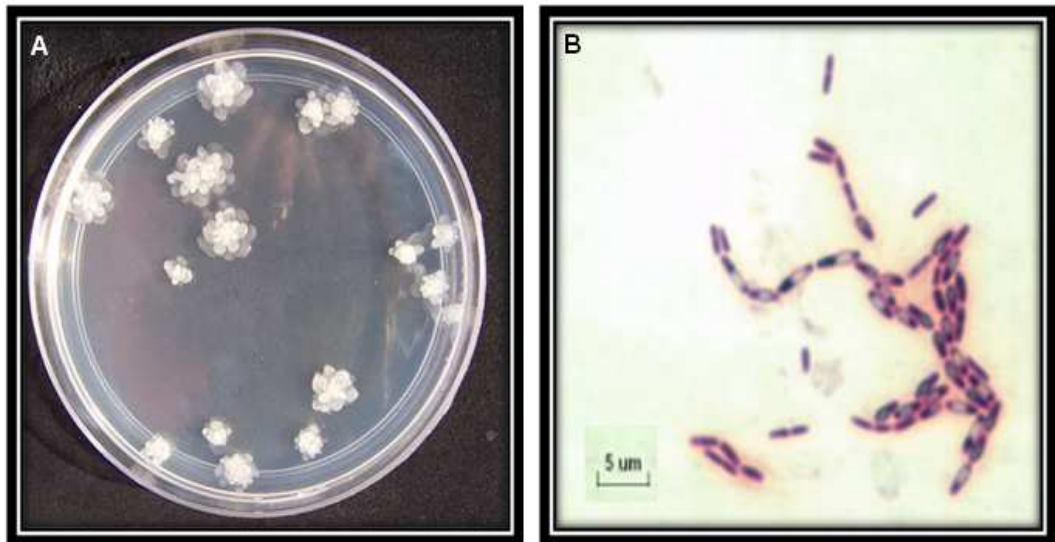
Descripción:

(A): Colonias correspondientes a las especies *B. licheniformis* y *B. subtilis*.

(B): Colonias varias donde se visualizan halos de proteólisis característicos de las especies bajo estudio.

### 9.1.1 Bacillus licheniformis

FIGURA No. 2 Características macroscópicas (A) y microscópicas (B)

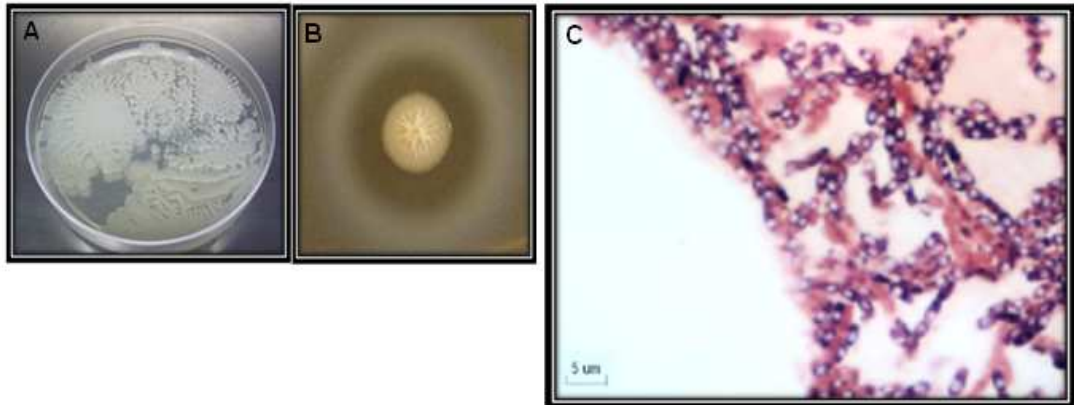


CUADRO No. 1 Descripción de las características macroscópicas, microscópicas y pruebas bioquímicas

<b>Características Macroscópicas</b>	Colonias de tamaño pequeño a mediano. Color blanco brillante. Textura rugosa y apariencia gomosa
<b>Características Microscópicas</b>	Bastones (3.0 a 3.5 µm). Gram +. Esporulados. Ubicación de esporas: central o sub-terminal (1.3 a 1.6 µm)
<b>Actividad Catalasa</b>	+
<b>Actividad Oxidasa</b>	-
<b>Actividad proteolítica</b>	+
<b>Exopolisacáridos</b>	+

### 9.1.2 *Bacillus subtilis*

FIGURA No. 3 Características macroscópicas (A y B) y microscópicas (C)



En la Figura No. 3 A y B se observa la morfología ramificada (A) o circular (B) que puede adoptar ésta especie.

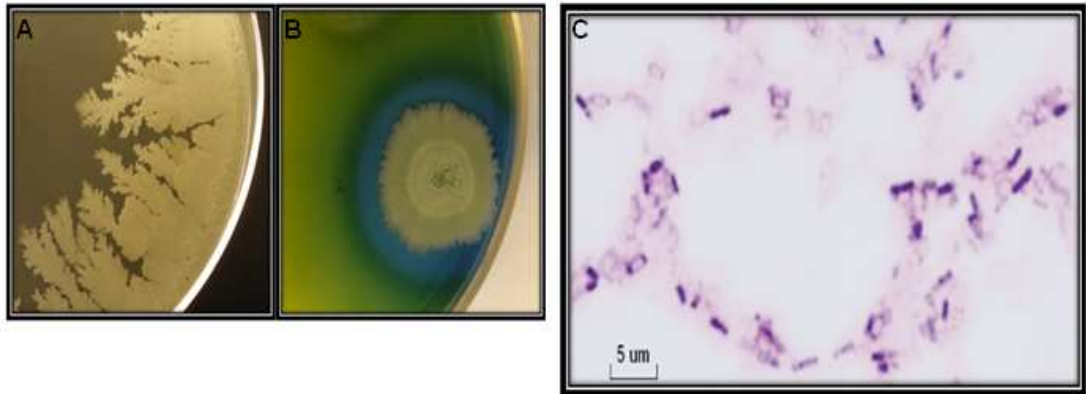
CUADRO No. 2 Descripción de las características macroscópicas, microscópicas y pruebas bioquímicas

<b>Características Macroscópicas</b>	Colonias de tamaño mediano a grande. Color blanco opaco. Textura rugosa y apariencia algo gomosa. Puede presentar crecimiento ramificado o concéntrico.
<b>Características Microscópicas</b>	Bastones (2.0 a 2.4 µm). Gram +. Esporulados. Ubicación de esporas: central (1.0 a 1.3 µm)
<b>Actividad Catalasa</b>	+
<b>Actividad Oxidasa</b>	-
<b>Actividad proteolítica</b>	+
<b>Exopolisacáridos</b>	+



### 9.1.3 *Bacillus amyloliquefaciens*

FIGURA No. 4 Características macroscópicas (A y B) y microscópicas (C)



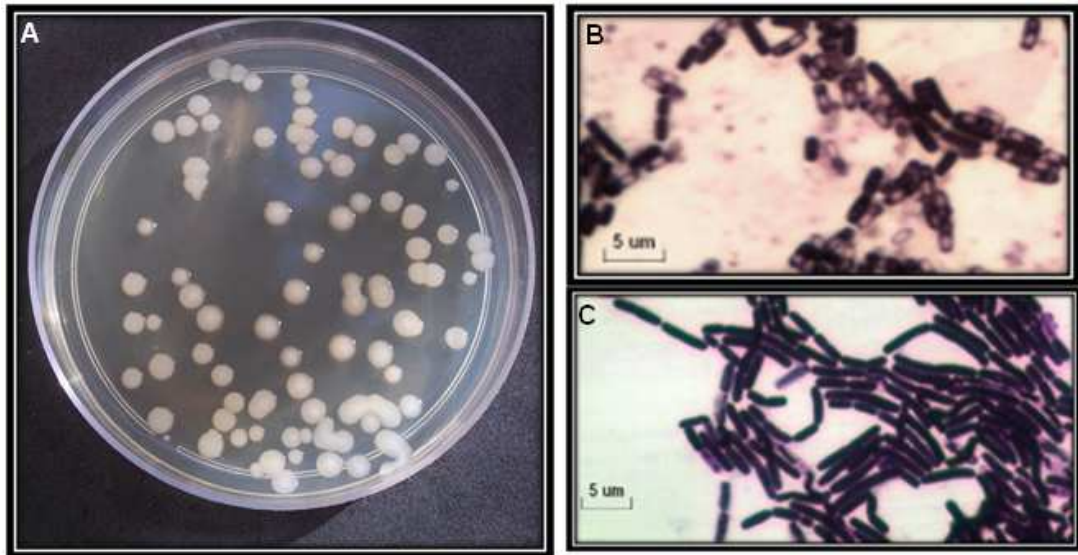
En la Figura No. 4 A y B se observa la morfología ramificada (A) o circular (B) que puede adoptar ésta especie. Cabe aclarar que según Priest et al. (1987), *B. amyloliquefaciens* está estrechamente relacionado desde el punto de vista fenotípico a *B. subtilis*, mencionando en muchos casos la imposibilidad de separar a éstos organismos a través de pruebas clásicas.

CUADRO No. 3 Descripción de las características macroscópicas, microscópicas y pruebas bioquímicas

<b>Características Macroscópicas</b>	Colonias de tamaño mediano a grande. Color blanco opaco. Textura rugosa y apariencia gomosa. Puede presentar crecimiento ramificado o concéntrico.
<b>Características Microscópicas</b>	Bastones (2.3 a 2.8 µm). Gram +.Esporulados. Ubicación de esporas: central (1.2 a 1.6 µm)
<b>Actividad Catalasa</b>	+
<b>Actividad Oxidasa</b>	-
<b>Actividad proteolítica</b>	+
<b>Exopolisacáridos</b>	+

#### 9.1.4 Bacillus megaterium

FIGURA No. 5 Características macroscópicas (A) y microscópicas (B y C)



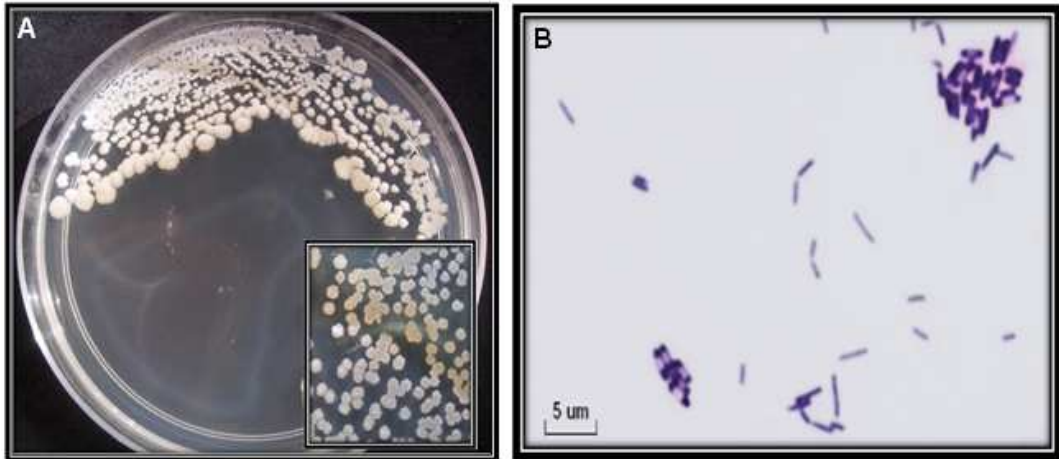
Se aprecian las esporas (B) y las células vegetativas (C).

CUADRO No. 4 Descripción de las características macroscópicas, microscópicas y pruebas bioquímicas

<b>Características Macroscópicas</b>	Colonias de tamaño grande. Color blanco brillante. Redondas. Con crecimiento concéntrico.
<b>Características Microscópicas</b>	Bastones grandes (4.6 a 6.0 µm). Gram +. Esporulados. Ubicación de esporas: central a sub-terminal (1.6 a 1.9 µm)
<b>Actividad Catalasa</b>	+
<b>Actividad Oxidasa</b>	-
<b>Actividad proteolítica</b>	+
<b>Exopolisacáridos</b>	+

### 9.1.5 *Bacillus pumilus*

FIGURA No. 6 Características macroscópicas (A) y microscópicas (B)



CUADRO No. 5 Descripción de las características macroscópicas, microscópicas y pruebas bioquímicas

<b>Características Macroscópicas</b>	Colonias pequeñas a medianas. Color blanco o beige brillante. Bordes irregulares.
<b>Características Microscópicas</b>	Bastones (1.4 a 2.5 µm). Gram +. Esporulados. Ubicación de esporas: central a sub-terminal (0,9 a 1,2 µm)
<b>Actividad Catalasa</b>	+
<b>Actividad Oxidasa</b>	-
<b>Actividad proteolítica</b>	+
<b>Exopolisacáridos</b>	-

## 9.2 SISTEMA DE PUNTUACIÓN DE LA LIMPIEZA

Se utilizó el sistema de puntuación de limpieza de los animales de Schreiner y Ruegg (2003). El mismo consta en la puntuación subjetiva de la suciedad que los animales presentan a nivel de ubre, vientre, pierna, muslo y posterior estableciendo una escala con 4 niveles.

Los criterios son:

- 1- Completamente libre de suciedad o con muy poca suciedad.
- 2- Un poco sucia.
- 3- Cubierta de suciedad en su mayor parte.
- 4- Completamente cubierta de suciedad.

FIGURA No. 7 Representación de cada punto de la escala



### 9.3 RACIONES UTILIZADAS EN EL PERIODO

Clasificación:

- 1- Pelleteada
- 2- No pelleteada (húmeda)
- 3- No Pelleteada (seca)

FIGURA No. 8 Clasificación de las raciones

