



TESIS DE GRADO DE LA LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA

**Universidad de la República
Facultad de Ciencias**

**Identificación de microorganismos termodúricos
provenientes de leche cruda productores de
enzimas de deterioro, y evaluación de su
actividad en biofilms**

María Eugenia Calvo Gómez

**Tutor: MSc. Marcela González
Co-Tutor: Dra Stella Reginensi**

**Unidad de Tecnología de los Alimentos
Facultad de Agronomía
Montevideo, Uruguay
2018**

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora Marcela, por haberme orientado y aconsejado, por su paciencia, su disposición y por todo su apoyo y conocimiento brindado durante este proceso compartido.

A Stella, por transmitirme entusiasmo por la Microbiología mediante su pasión por esta materia.

A Jorge, Jimena y Nancy por dedicar parte de su tiempo en enseñarme con paciencia y entusiasmo a desenvolverme en el laboratorio.

A mi madre, por su ejemplo, guía, cercanía y por acompañarme durante este camino como profesional y más importante como mamá.

A mi familia y amigas por apoyarme, escucharme y tirarme para adelante durante todos estos años de carrera.

A mis amigos de la FCien por estos años compartidos tirando para el mismo lado.

A mi compañero de carrera, Andresito, el que siempre supo hacerme reír, con el que compartimos más logros que fracasos y horas de estudio pasando por estrés, odio y alegría. Por su compañía, presencia, escucha, paciencia y por haber confiado en mí más que yo misma.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN.....	5
2. INTRODUCCIÓN.....	6
2.1 LA LECHE Y LA IMPORTANCIA DE LA INDUSTRIA LÁCTEA EN URUGUAY	6
2.1.1 Importancia de la Industria láctea a nivel nacional.....	6
2.1.2 Aspectos generales de la leche	6
2.1.3 Microbiología de la leche	7
2.2 <i>BACILLUS</i> spp. TERMODÚRICOS ESPORULADOS Y SU IMPORTANCIA EN LA INDUSTRIA LÁCTEA.....	8
2.2.1 Incidencia de esporulados aerobios como contaminantes en leche en polvo.....	10
2.2.2 Incidencia de esporulados aerobios como contaminantes en leche UHT	11
2.3 GÉNERO <i>BACILLUS</i>	11
2.3.1 Generalidades microbiológicas del Género <i>Bacillus</i>	11
2.3.2 Producción de enzimas de deterioro: proteasas y lipasas	13
2.3.3 Capacidad de adhesión y producción de biofilms	15
2.4 OBJETIVOS.....	17
2.4.1 Objetivo general.....	17
2.4.2 Objetivos específicos	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1 MUESTREO.....	19
3.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	19
3.3 RECUENTO Y SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS.....	19
3.4 CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA Y LIPOLÍTICA	20
3.5 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ADHESIÓN	20
3.5.1 Determinación de la capacidad de adhesión en placas de poliestireno	20

3.5.2 Observación de la evolución de la formación de biofilm mediante microscopía de contraste de fase en placas de poliestireno.....	21
3.5.3 Determinación de la capacidad de adhesión en acero inoxidable	21
3.6 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EN BIOFILM.....	21
3.6.1 Ensayo de coagulación.....	21
3.6.2 Evaluación de actividad proteolítica en sobrenadantes	22
3.7 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLAMIENTOS.....	22
3.7.1 Aislamiento de ADN.....	22
3.7.2 Análisis RAPD-PCR.....	22
3.7.3 Análisis de la secuencia del gen 16S rADN para la identificación de aislamientos.....	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
4.1 CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA DE MICROORGANISMOS TERMODÚRICOS PRESENTES EN LECHE CRUDA Y SU VARIACIÓN EN LAS DISTINTAS ESTACIONES DEL AÑO	24
4.2 SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS TERMODÚRICOS PRODUCTORES DE ENZIMAS: PROTEASAS Y LIPASAS	28
4.3 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ADHESIÓN: EN PLACAS DE POLIESTIRENO Y EN ACERO INOXIDABLE	32
4.3.1 Ensayo de adhesión en poliestireno	32
4.3.2 Ensayo de adhesión en acero inoxidable	34
4.4 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROTEOLÍTICA EN BIOFILM	37
4.5 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LOS AISLAMIENTOS.....	39
5. CONCLUSIONES.....	43
6. BIBLIOGRAFÍA	45
7. ANEXO.....	57

1. RESUMEN

Uruguay es el séptimo exportador a nivel mundial de leche, por lo que es de suma importancia contar con estándares de calidad e inocuidad acordes a los mercados más exigentes. Los microorganismos termodúricos son de especial interés por su capacidad de resistir los tratamientos térmicos utilizados en la industria y formar parte de la microflora del producto final. En este trabajo se evaluó la microflora termodúrica mesófila, termófila y psicrótrofa presente en leche cruda, obtenida a partir de cuatro tambos ubicados en la cuenca lechera sur. Se monitoreó la microflora termodúrica de forma bimensual, a lo largo del año 2017. La presencia de microorganismos termodúricos esporulados fue detectada en todas las muestras, evidenciando el hecho de que corresponden a un contaminante constante presente en leche cruda. Se realizaron ensayos para determinar el potencial de deterioro de estos microorganismos en cuanto a la producción de exoenzimas proteolíticas y lipolíticas, así como también se evaluó su capacidad de adherirse y formar biofilms en diferentes sustratos, como poliestireno y acero inoxidable, y utilizando caldo nutritivo y leche como matrices. Al menos siete de los 45 aislamientos productores de exoenzimas seleccionados, fueron capaces de adherirse al acero inoxidable en presencia de leche formando biofilm y producir enzimas proteolíticas capaces de coagular la leche. Estos aislamientos presentan un posible riesgo como contaminantes de deterioro de productos lácteos, no sólo por su potencial capacidad de adhesión a las superficies de la industria láctea, sino también por la producción de exoenzimas causantes de deterioro. Mediante análisis de RAPD-PCR y secuenciación del gen 16S rADN, se logró caracterizar e identificar esta microflora termodúrica. Se encontraron diferentes especies pertenecientes al género *Bacillus*, siendo *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus megaterium* las que presentaron mayor potencial de deterioro relacionado con la producción de enzimas proteolíticas y/o lipolíticas y a su capacidad de adhesión en acero inoxidable. A su vez, se encontraron otras especies como *Bacillus safensis* y *Bacillus licheniformis*, capaces de producir enzimas proteolíticas y lipolíticas pero con una capacidad de adhesión menor que las anteriores.

Palabras clave: Microorganismos termodúricos; *Bacillus*; leche; exoenzimas proteolíticas; exoenzimas lipolíticas; biofilm.

1. INTRODUCCIÓN

2.1 LA LECHE Y LA IMPORTANCIA DE LA INDUSTRIA LÁCTEA EN URUGUAY

2.1.1 Importancia de la Industria láctea a nivel nacional

Uruguay es el séptimo exportador a nivel mundial de leche (INALE, 2017). Se producen 2.026 millones de litros por año de los cuales el 90% es remitido a plantas industriales con una capacidad de procesamiento de 11.720 miles de litros por día. Los principales productos elaborados por año a partir de esta leche remitida a planta corresponden a 121.967 ton de leche en polvo, 65.421 ton de queso, 16.942 ton de manteca y otras grasas, y 84 millones de litros a leche pasteurizada y ultra pasteurizada (UHT). Con respecto al destino de esta leche industrializada, el 70% corresponde a exportaciones y un 30% al consumo interno (MGAP-DIEA, 2017).

Es necesario contar con estándares de calidad e inocuidad acordes a los mercados más exigentes ya que existen una serie de peligros transmitidos por alimentos que ponen en riesgo la salud del consumidor y plantean obstáculos al comercio internacional. En la industria láctea se aplican tratamientos térmicos de diferente intensidad y duración a lo largo del proceso de elaboración de los productos, que contribuyen a la disminución o eliminación de microorganismos.

2.1.2 Aspectos generales de la leche

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, destinada al consumo en forma de leche líquida o a la elaboración de productos lácteos (CODEX STAN 206-1999). Es un líquido blanco y opaco de sabor dulce con un pH próximo a la neutralidad, 6,6 y 6,8 (Alais, 1985). La leche está compuesta por un 87 % de agua, 4,6 % lactosa, 4,0% grasa, 3,25% proteína, y un 1% de minerales.

En cuanto a las proteínas que componen la leche, el 20% corresponden a las llamadas proteínas del suero como la β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, e inmunoglobulinas, entre otras. Algunas de estas corresponden a enzimas capaces de catalizar reacciones en las cuales se generan productos que funcionan como bactericidas (lactoperoxidasa), y otras simplemente pueden actuar complementando y estimulando al sistema inmune (lactoferrina, IgG), pero se encuentran en concentraciones bajas. El 80% de las proteínas restantes corresponden a las caseínas (α -, β -, y κ -caseína). Estas se encuentran formando, en conjunto con minerales como el calcio y el fósforo, lo que se conoce como micelas de caseína. La estabilidad de la micela se ve afectada a pH ácidos y debido a la proteólisis por parte de ciertas enzimas producidas por microorganismos contaminantes de la leche. La ruptura de la micela de caseína por proteólisis produce la desestabilización de la micela y su

posterior agregación, a este proceso se lo conoce como coagulación. A diferencia de las proteínas del suero, la micela de caseína es estable a tratamientos térmicos como la pasteurización.

La grasa de leche se presenta en forma de glóbulos rodeados de una membrana de naturaleza lipoproteica compuesta principalmente por fosfolípidos y glicoproteínas y cuyo núcleo constituido mayoritariamente (95 %) por triglicéridos, posee carácter hidrofóbico. En su composición figuran además otros lípidos simples (diglicéridos, monoglicéridos), lípidos complejos (mayoritariamente fosfolípidos), colesterol, y antioxidantes especialmente tocoferoles). Igualmente los lípidos de la leche constituyen el vehículo para las vitaminas liposolubles (A, D, E y K), de las que la leche es una buena fuente, así como carotenoides. La hidrólisis enzimática de los triglicéridos por acción de lipasas provoca un incremento en la concentración de los ácidos grasos libres en la leche. Estos ácidos grasos libres, particularmente los que tienen entre 4 y 12 átomos de carbono, son responsables de la aparición de sabores anormales en los productos terminados (rancio, jabón, etc.). Los di- y monoglicéridos que también aparecen como resultado de la alteración provocan gustos amargos. Por último, como los ácidos grasos libres son más sensibles a la oxidación que los ácidos grasos esterificados, los productos presentan menor tiempo de conservación y vida útil.

Desde el punto de vista fisicoquímico, la leche es una emulsión de glóbulos grasos en agua, una suspensión de micelas de caseína, y por otro lado, las proteínas séricas, la lactosa, minerales (Ca y P) y vitaminas (A, D, B2) que se encuentran como componentes solubles (Walstra, 2001). En definitiva, la leche constituye un buen sustrato para la multiplicación de diversos microorganismos y más aún si se conserva de manera inapropiada.

2.1.3 Microbiología de la leche

La leche es un medio ideal para el crecimiento de microorganismos, fundamentalmente bacterias, debido a su gran valor nutricional, su pH cercano a la neutralidad y a su elevada actividad de agua.

La diversidad de microorganismos presentes en la leche cruda está determinada por la salud e higiene de la vaca, la alimentación, el ambiente en que se encuentra y se ordeña, los procedimientos utilizados en la limpieza y desinfección de los equipos posterior al ordeño, las condiciones de almacenamiento y el transporte, entre otros (Quigley et al., 2013). La presencia de estos microorganismos contaminantes suelen alterar la calidad de la leche, por lo que se busca lograr una calidad higiénico-sanitaria adecuada tanto para preservar la salud humana, como para asegurar la producción de productos lácteos de calidad.

La microflora de la leche cruda está compuesta por un amplio rango de bacterias tanto Gram negativas como Gram positivas. Entre las Gram negativas se destacan los géneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*,

Enterobacteriaceae, mientras que entre las Gram positivas se encuentran géneros como *Bacillus*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Microbacterium*, *Lactococcus* y *Lactobacillus* (Quigley et al., 2013; Vithanage et al., 2014). Esta gran diversidad se ve influenciada por diferentes factores como la estacionalidad, las prácticas de manejo en el tambo y las rutinas de higiene a lo largo de la cadena de producción desde el tambo hasta la industria, así como también las condiciones de almacenamiento (Mallet et al., 2012).

En la gran diversidad de microorganismos presentes en la leche encontramos algunos que pueden ser capaces de deteriorarla (*Pseudomonas*), otros que pueden presentar patogenicidad y afectar al consumidor (*Staphylococcus*, *Listeria*), y otros como las bacterias ácido lácticas que son deseadas y utilizadas, bajo condiciones controladas, para producir productos lácteos fermentados con valor agregado.

La industria láctea utiliza tratamientos térmicos para reducir la carga bacteriana y evitar el crecimiento de microorganismos contaminantes no deseados y asegurar la inocuidad de los productos. El tratamiento térmico denominado pasteurización, consiste en tratar la leche a 72°C durante 15 segundos. Es un proceso eficiente para la eliminación de microorganismos patógenos y la reducción del número de aquellos que provocan deterioro, por lo que de esta manera es posible proporcionar un producto seguro para el consumo (Knight et al., 2004). Este proceso es muy utilizado en la industria láctea, pero únicamente destruye las células vegetativas de los microorganismos, siendo las esporas estructuras resistentes al mismo (Soni et al., 2016). Existen bacterias termodúricas y formadoras de esporas que pueden llegar a sobrevivir estos tratamientos y causar cambios organolépticos o disminuir la vida útil de la leche y sus productos (Christiansen et al., 2006). Estos microorganismos termodúricos y formadores de esporas resisten temperaturas de pasteurización, e incluso tratamientos de mayor temperatura, que se realizan habitualmente en el procesamiento de algunos productos. Si bien su presencia en la leche cruda es relativamente baja, tienen una ventaja especial entre la microflora total de la leche debido a su resistencia térmica, incluso 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, pudiendo representar un problema en la calidad de este producto (Reginensi et al., 2011).

2.2 BACILLUS spp. TERMODÚRICOS ESPORULADOS Y SU IMPORTANCIA EN LA INDUSTRIA LÁCTEA

La presencia de esporas bacterianas en leche puede ocasionar problemas en la industria láctea debido a que dichas esporas pueden sobrevivir tratamientos térmicos como la pasteurización y causar el deterioro de la leche (Collins 1981). Estas bacterias formadoras de esporas, son capaces de sobrevivir frente a diferentes tipos de estrés y luego germinar, soportando distintos valores de pH, temperatura y actividad de agua (van Netten y Kramer, 1992).

Estos microorganismos esporulados pueden ser anaerobios estrictos como los pertenecientes al género *Clostridium*, o anaerobios facultativos pertenecientes

al género *Bacillus*. Entre los anaerobios estrictos las especies más importantes son *Clostridium butyricum*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium sporogenes* y *Clostridium botulinum*, pero su abundancia es relativa debido a la necesidad de nichos con ausencia de oxígeno. Sin embargo, estas especies son las responsables de defectos de “hinchazón tardía” en quesos madurados, y son responsables de enfermedades origen alimentario como es el caso de la neurotoxina producida por *C. botulinum* causante de botulismo.

El género *Bacillus* representa un grupo taxonómico heterogéneo, en el cual dichas bacterias se caracterizan por ser Gram positivas y formadoras de endoesporas (Huck et al., 2007). Las especies pertenecientes al género *Bacillus* tienen la capacidad de crecer tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Este género presenta un amplio espectro de características fisiológicas distintas que se aprecia en la variedad de especies mesófilas, termófilas y psicrótrofas existentes. *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus subtilis* son las especies mesófilas predominantes en leche, mientras que *Bacillus cereus* es la especie psicotolerante más importante ya que es patógena para el ser humano, siendo causante de síndromes heméticos y diarreicos de origen alimentario (Granum y Lund, 1997). Por otro lado están los termófilos obligados, como *Anoxybacillus flavithermus* y *Geobacillus* spp. (Ronimus et al., 2003; Scott et al., 2007), importantes en los polvos lácteos.

Los microorganismos esporulados aerobios pueden tener un gran impacto sobre la vida útil y calidad de la leche pasteurizada y ultra pasteurizada, así como también en algunos productos lácteos de importancia económica como la leche en polvo. Los principales efectos perjudiciales sobre la inocuidad y la calidad de la leche y sus productos son: i) la producción de toxinas, ii) la producción de enzimas hidrolíticas, y iii) la interferencia en la fabricación de quesos o subproductos (DeJonghe et al., 2010). A esto debe agregarse que la mayoría de estos microorganismos son capaces de adherirse a superficies de acero inoxidable comúnmente utilizado en la industria láctea, formando biofilms (Van Houdt et al., 2010) en conjunto con aquellos causantes de deterioro como los psicrótrofos, capaces de producir enzimas proteolíticas y lipolíticas (Marchand et al., 2009). Estas enzimas tienen el potencial de resistir tratamientos térmicos, lo cual genera un problema en la industria lechera. Una vez que estas enzimas se encuentran presentes en la leche, ningún tratamiento térmico es lo suficientemente severo para eliminarlas (Rowe y Gilmour, 1982). A su vez, estas pueden resistir procesos UHT (ultra high temperature), e incluso a bajas concentraciones, reducir la vida útil de leche UHT (Chen et al., 2003).

El almacenamiento a bajas temperaturas en el tambo y en plantas industriales condujo a una disminución en el deterioro de la leche por parte de microorganismos mesófilos. Sin embargo, esto genera un crecimiento de la microflora psicrótrofa lo cual es de particular preocupación para la industria. Estos microorganismos son capaces de crecer a una temperatura de 7°C o menos, indistintamente de su temperatura óptima de crecimiento.

2.2.1 Incidencia de esporulados aerobios como contaminantes en leche en polvo

Como se ha visto previamente, la contaminación bacteriana en leche cruda es debida a diferentes factores como la higiene, estacionalidad, especies de animales y su salud, entre otros (Quigley et al., 2013). De todos los microorganismos que pueden llegar y contaminar la leche, las bacterias formadoras de esporas son las de mayor importancia para la industria láctea en la producción de polvos lácteos (Watterson et al., 2014). Estas bacterias pueden ser caracterizadas como termófilas, mesófilas y psicrotolerantes, siendo las primeras las predominantes en el producto final. Burgess et al. (2010) han visto que estas bacterias termófilas son de especial interés en la industria debido a su habilidad de crecer y adherirse a la superficie de equipos utilizados en la línea de elaboración de polvos lácteos.

La leche en polvo se caracteriza por ser un derivado lácteo no perecedero con una baja actividad de agua, lo cual asegura una vida útil extensa (Hill y Smythe, 2012). A su vez es considerada un ingrediente alimenticio indispensable como componente de diferentes productos debido a sus propiedades funcionales tales como la rehidratación, higroscopicidad, fluidez y su capacidad emulsificante (Sharma et al., 2012). Es producida mediante el secado de leche cruda o descremada e involucra etapas de pasteurización, separación, evaporación y secado spray (McHugh et al., 2017).

El crecimiento bacteriano en este producto es mínimo debido al bajo contenido de agua (Chen et al., 2003). Sin embargo, los microorganismos esporulados aerobios son capaces de soportar procesos como la pasteurización y evaporación, aplicados en la producción de leche en polvo, por lo que han sido identificados como contaminantes industriales importantes durante la producción de polvos lácteos (Ronimus et al., 2003, Reginensi et al., 2011). Si bien se encuentran en bajo número en leche cruda (10^1 - 10^2 u.f.c./ml) pueden llegar a concentraciones elevadas en polvos lácteos debido a su capacidad de crecer en la línea de proceso formando biofilms, pudiendo desprenderse luego y alcanzar el producto final generando un impacto negativo a nivel de las propiedades organolépticas del mismo debido a la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares (Chen et al., 2003). Se ha visto que tanto los intercambiadores de calor como los evaporadores son los principales sitios de formación de biofilm y liberación de esporas (Scott et al., 2007). Dichas esporas pueden soportar las etapas siguientes en el proceso de producción de leche en polvo como los concentradores de calor y el secado en spray (Hill y Smythe, 2012), llegando al producto final.

Diferentes estudios han demostrado la presencia de bacterias aerobias o anaerobias facultativas formadoras de esporas en leche en polvo. Especies del género *Bacillus* se caracterizan por ser el principal contaminante de polvos lácteos seguido de especies pertenecientes a los géneros *Geobacillus* y *Anoxybacillus*. Se han encontrado las especies *B. licheniformis*, *B. subtilis*

(Reginensi et al., 2011; Zain et al., 2016), *Bacillus amyloliquefaciens* (VanderKelen et al. 2016), *B. cereus* (Miller et al., 2015), *Bacillus coagulans* (Ronimus et al., 2006), *Bacillus megaterium* (Reginensi et al., 2011; Buehner et al., 2015), *B. pumilus* (Zain et al., 2016), *Geobacillus stearothermophilus* (Sadiq et al., 2016a), entre otras.

2.2.2 Incidencia de microorganismos esporulados aerobios como contaminantes en leche UHT

La leche UHT es obtenida por medio de un tratamiento térmico de alta temperatura, entre 135 y 150°C durante 1-8 segundos, en un flujo continuo, seguido del empaquetamiento en contenedores pre-esterilizados. Con este tratamiento se entiende que prácticamente todos los microorganismos son destruidos, creando un producto comercialmente estéril con una vida útil prolongada (más de 6 meses a temperatura ambiente). Sin embargo, existen algunas especies bacterianas perteneciente al género *Bacillus* capaces de soportar las temperaturas utilizadas en el proceso UHT, generando un producto no estéril que podría ser deteriorado posteriormente (Esteban et al., 2013). *Bacillus sporothermodurans*, es una bacteria aerobia mesófila formadora de esporas, cuyas esporas tienen la habilidad de soportar altas temperaturas, 140°C durante 5 s y a pesar de su pobre crecimiento en leche cruda, *B. sporothermodurans* sí es capaz de crecer en leche UHT debido a la ausencia de competencia con otros microorganismos (Klijn et al., 1997). Otras especies como *B. licheniformis*, *B. subtilis* y *B. pumilus*, han sido descritas como contaminantes en leche UHT con una alta presencia de cepas con capacidad proteolítica y lipolítica, lo que aumenta su potencial de deterioro (Pinto et al., 2018). Las esporas de *Paenibacillus lactis* también son capaces de sobrevivir temperaturas superiores a 120°C (Scheldeman et al. 2004a) y han sido encontradas en leche UHT, aunque en una baja proporción (Kmiha et al., 2017).

2.3 GÉNERO BACILLUS

2.3.1 Generalidades del género *Bacillus*

El género *Bacillus* pertenece al phylum Firmicutes. Son bacterias Gram positivas en forma de bastón, capaces de formar endoesporas y poseen metabolismo aerobio o anaerobio facultativo. Se han identificado más de 142 especies pertenecientes a este género (Logan y De Vos, 2015), y estas habitan una gran cantidad de nichos, como agua, aire, suelo, rizosfera de plantas y tracto gastrointestinal de animales (Pignatelli et al., 2009). La morfología y tamaño de colonia es muy variable entre las especies, al igual que sus características fisiológicas. En cuanto a la temperatura de crecimiento, este género presenta un amplio espectro y se aprecia una gran variedad de especies mesófilas, termófilas y psicrotóficas existentes. *B. licheniformis*, *B. pumilus* y *B. subtilis* son las especies mesófilas predominantes, mientras que

B. cereus es la especie psicotolerante más relevante por ser patógena para el ser humano (Sutherland y Murdoch, 1994). Por otro lado, están los termófilos obligados como *Anoxybacillus flavithermus* y *Geobacillus* spp. aislados frecuentemente de leche en polvo (Ronimus et al., 2003; Scott et al., 2007). Algunas especies son consideradas termófilos facultativos ya que pueden crecer tanto a temperaturas que corresponden a organismos mesófilos como termófilos. Esta última condición es cepa dependiente y comprende especies como *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *B. pumilus* y *B. subtilis* (Crielly et al., 1994; Ronimus et al., 2003, Scheldeman et al., 2005).

Una de las características más relevantes de este género es la capacidad de formar esporas. La esporulación es un mecanismo de supervivencia que presentan ciertos grupos bacterianos, que ocurre cuando los microorganismos se encuentran bajo condiciones de estrés como variaciones de pH y temperatura extremos, presencia de agentes químicos o radiación, escasez de nutrientes, entre otros. Las esporas son formadas al final de la fase exponencial de crecimiento del microorganismo y consisten de un núcleo rodeado por una membrana cortical y una corteza, los cuales están en conjunto encerradas por una envoltura externa (Burgess et al., 2010). Se ha visto que la presencia de ciertos minerales como calcio, potasio y magnesio contribuyen de manera positiva con el desarrollo de las esporas (Vinter ,1969). Estos minerales se encuentran presentes en la leche por lo cual la estimulación de la formación de esporas en las bacterias presentes es posible que ocurra.

Si bien la presencia de microorganismos esporulados aerobios en leche cruda no es elevada, <10 a 10^2 ufc/ml para mesófilas (Coorevits et al., 2008) y alrededor de 1 ufc/ml para psicrótrofas (Masiello et al., 2014), en la industria colonizan nichos específicos donde son capaces de sobrevivir y proliferar.

La mayoría de los formadores de esporas aerobios en leche cruda pertenecen al género *Bacillus*, siendo las especies predominantes *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. circulans*, *B. subtilis*, y especies pertenecientes al grupo de *B. cereus* (Coorevits et al., 2008). En un relevamiento realizado en el año 2011 en cuatro tambos de Canelones y San José, se encontró que las especies de esporulados aerobios predominantes en leche cruda fueron: *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. megaterium* y *B. amyloliquefaciens* en ese orden según sus proporciones (Moreno E., 2011).

B. licheniformis es una de las especies más encontrada en leche cruda, así como también a lo largo de la cadena de producción de productos derivados (Scheldeman et al., 2006). Esta especie tiene una amplia distribución en el ambiente del tambo, pudiéndose encontrar en la materia fecal del ganado, suelo, alimentación y exterior de la ubre de la vaca (Crielly et al. 1994; Moreno, 2011). *B. licheniformis* presenta una gran variación genética intraespecie, y no está caracterizada como patógena (Dhakal et al., 2013). Sadiq et al. (2016) evaluaron la capacidad de esta especie de secretar exoenzimas, y vieron que los niveles de proteasas y lipasas producidos son altos. Adicionalmente, Parkar

et al. (2001) demostraron que esta especie, tiene la capacidad de adherirse al acero inoxidable formando biofilms, incluso en su forma esporulada. *B. licheniformis* fue encontrada como la especie predominante en el ambiente del tambo tanto en invierno como en verano (Buehner et al., 2014), además de ser uno de las principales especies contaminantes asociado a la producción de leche en polvo en nuestro país (Reginensi et al., 2011).

B. subtilis es otra de las especies, pertenecientes al género *Bacillus*, predominantes en leche cruda. Estudios del genoma de esta especie han establecido que no corresponde a un microorganismo patógeno, ya que no se encontraron genes codificantes de factores de virulencia (Kunst et al., 1997). Sin embargo, su amplia distribución en diversos ambientes incluyendo suelo, plantas y el tracto gastrointestinal de animales, puede conducir a que estas bacterias alcancen la leche cruda. Esta especie puede ser causante de deterioro debido a su capacidad de producir exoenzimas proteolíticas (Sadiq et al., 2016). A su vez, se ha visto que al igual que *B. licheniformis*, tiene la propiedad de adherirse formando biofilms.

Otras especies pertenecientes a este género como *B. pumilus* o *B. amyloliquefaciens*, comparten las mismas características que las ya mencionadas, y se ha demostrado que estas también tienen la capacidad de adherirse a superficies de acero inoxidable (Parkar et al. 2001), así como producir enzimas proteolíticas (Lücking et al., 2013). *B. megaterium* también presenta la característica de producir exoproteasas capaces de hidrolizar ciertas proteínas como la caseína (Asker et al., 2013).

En lo que tiene que ver con microorganismos patógenos, existe una especie de este género capaz de producir intoxicación al consumidor si está presente en el alimento. *B. cereus* es un ejemplo de bacteria formadora de esporas capaz de crecer tanto aerobia como anaeróbicamente, comúnmente encontrada en la industria. Esta bacteria tiene la habilidad de producir dos tipos de toxinas: una enterotoxina causante de diarrea, que es producida durante el crecimiento vegetativo de *B. cereus* en el intestino delgado (Granum, 1994), mientras que la toxina emética es producida por las células bacterianas en el alimento y es ingerida por el consumidor (Kramer y Gilbert, 1989). Una característica importante de *B. cereus* es la ocurrencia de cepas psicrótrofas, capaces de soportar temperaturas de refrigeración y así afectar la vida útil de la leche pasteurizada y comprometer la inocuidad del producto (Griffiths, 1992).

2.3.2 Producción de enzimas de deterioro: proteasas y lipasas

Anteriormente se ha mencionado que la leche posee las condiciones ideales, para que diferentes microorganismos puedan crecer en ella. Estas bacterias, además de descalificar a la leche por recuentos microbianos elevados, pueden producir deterioro, tanto de la leche cruda como de productos procesados en la industria. Una de las principales causas de deterioro es la producción de enzimas extracelulares, como las lipasas y proteasas. Algunas de estas

enzimas son capaces de soportar tratamientos térmicos como el de la pasteurización y UHT (Chen et al., 2003; Marchand et al., 2009). La acción de estas enzimas sobre la leche o sus productos lleva a la producción de gustos amargos y rancidez. Este problema es mayor en productos con una vida útil prolongada, como leche en polvo y UHT, en las cuales las enzimas proteolíticas pueden incrementar la viscosidad y el gusto amargo (Datta y Deeth, 2003), mientras que las lipasas pueden hidrolizar la grasa incrementando la presencia de sabores rancios (Deeth y Fitz-Gerald, 2006).

Muchas especies del género *Bacillus* son capaces producir enzimas extracelulares que son excretadas al medio circundante. Las enzimas más comunes dentro del género *Bacillus* son las amilasas y proteasas, aunque muchas especies son capaces de producir también lipasas. Normalmente, la producción de estas enzimas ocurre en la fase de crecimiento exponencial tardía o estacionaria temprana, antes de la esporulación (Priest, 1977). Aunque la pasteurización y los procesos de UHT logran eliminar o bajar la carga de estos microorganismos en los productos lácteos, sus exoenzimas pueden ser termoestables (ej. proteasas y lipasas), siendo inactivadas en forma parcial por estos tratamientos y causando defectos en los productos (Chen et al., 2003).

Las enzimas proteolíticas pueden actuar sobre las micelas de caseína, provocando la hidrólisis del enlace peptídico y de esta manera producir péptidos pequeños los cuales le confieren el gusto amargo a la leche (Cromie, 1992 ; Datta y Deeth, 2003). Pueden comenzar con la hidrólisis de la k-caseína, causando la formación de para-k-caseína, siguiendo por la β -caseína (Cox, 1993). Esto provoca la desestabilización de la micela y por lo tanto la coagulación de la leche (Chen et al., 2003). Muchas de estas enzimas, permanecen activas en un amplio rango de temperaturas y en actividades de agua bajas después del tratamiento térmico.

Por otra parte, las enzimas lipolíticas son capaces de hidrolizar la grasa de la leche liberándose así ácidos grasos (Santos et al., 2003), los cuales provocan el sabor rancio en la leche. La mayoría de las lipasas bacterianas encontradas en la leche son extracelulares y son producidas durante la fase exponencial tardía o al comienzo de la fase estacionaria de crecimiento. Las condiciones de temperatura, pH, nitrógeno, fuentes lipídicas, concentración de sales inorgánicas y la disponibilidad de oxígeno, son todos factores que influyen los niveles de lipasa producida (Aires-Barros et al., 1994). Teh et al (2013) reafirmaron el hecho de que son diversos los factores que afectan la producción de lipasas por parte de las bacterias, siendo uno de ellos las condiciones en las cuales estas crecen. Las lipasas producidas por *Bacillus* spp. también mostraron tolerancia al tratamiento térmico, reportando niveles incluso mayores que las proteasas. Algunos representantes del género *Bacillus* tienen la capacidad de producir lipasas y proteasas (Chen et al., 2004). Estudios realizados por Celestino et al. (1997a, b) confirmaron que estas enzimas encontradas en leche pasteurizada pueden sobrevivir todos los tratamientos térmicos utilizados durante el proceso de producción de leche en

polvo (como la concentración y el secado spray) y UHT. Se pudo ver que estas enzimas permanecieron activas en leche UHT luego de 6 meses de almacenamiento a 25°C. Al mismo tiempo, diferentes cepas bacterianas pueden producir diferentes niveles de enzimas cuya estabilidad térmica también varía.

Además de producir enzimas, los microorganismos esporulados aerobios pueden formar biofilms en las superficies en contacto con la leche cruda, que se suman a la carga enzimática producida por las células planctónicas presentes en la leche. Se ha visto que la expresión génica en bacterias es diferente para estos dos estados (Schembri et al., 2003), lo que podría provocar cambios en la producción y actividad de estas enzimas de deterioro.

2.3.3 Capacidad de adhesión y producción de biofilms

Los biofilms en la industria láctea son una preocupación importante, ya que pueden encontrarse en prácticamente todos los tipos de superficie de contacto con la leche como pezoneras en el equipo de ordeño, tanques de almacenamiento y transporte, intercambiadores de calor en la planta de procesamiento (Burgess et al., 2010; Flint et al., 1997; Scheldeman et al., 2005).

Un biofilm puede definirse como una comunidad de microorganismos que se encuentra fijada a una superficie por medio de su adhesión debido a la producción de una matriz extracelular, que rodea a estas células bacterianas, la cual incluye exopolisacáridos (EPS), proteínas y ADN. Estos pueden estar formados por poblaciones tanto de microorganismos de una misma, como de múltiples especies adheridos sobre una misma superficie (O'Toole et al., 2000). Se ha visto que algunas especies son incapaces de formar biofilms de una única especie sin la ayuda de otros microorganismos co-adherentes (Castonguay et al. 2006). La formación de biofilms representa una manera de proteger el crecimiento bacteriano, lo cual les confiere ventajas como la supervivencia en diferentes ambientes. Existen diversos factores que pueden influenciar la formación de biofilms como el tipo de superficie sobre la cual el microorganismo se adhiere, la disponibilidad nutricional y la matriz circundante, la temperatura, y la disponibilidad de oxígeno (O'Toole et al., 2000).

La formación de biofilms en la industria láctea puede ocasionar pérdidas económicas debido a la liberación de bacterias en el producto lácteo, lo que genera cargas bacterianas excesivas, problemas relacionados con el deterioro y la seguridad de los alimentos, y dificultades para limpiar y mantener la higiene del equipamiento. La adhesión bacteriana y la formación de biofilms pueden ocurrir en cualquier etapa de la cadena láctea, desde los equipos de ordeño en el tambo hasta las tuberías de acero inoxidable en las plantas de elaboración. La formación de biofilms dentro del equipo de ordeño en el tambo ha sido identificada como uno de los reservorios o puntos de entrada para

microorganismos esporulados que contaminan la leche cruda (Scheldeman et al., 2005).

Los microorganismos esporulados pueden contaminar la leche en su forma vegetativa, esporas, o adheridos al acero inoxidable formando biofilms (Brooks y Flint 2008). La formación de estos últimos en las zonas de procesamiento y producción lleva a un incremento de oportunidades de los microorganismos de contaminar los productos lácteos procesados ya que los biofilms están protegidos contra los sanitizantes debido a la presencia de sustancias extracelulares (EPS). Se ha demostrado que los biofilms a nivel industrial se pueden formar no solo en los tanques de almacenamiento, silos o tuberías (Shaheen et al., 2010), sino que también en los intercambiadores de calor (Flint et al., 2000) y en membranas de ósmosis inversa utilizadas en el proceso de ultrafiltración (Tang et al., 2010). A nivel de los intercambiadores de calor, utilizados en el proceso de pasteurización, se van acumulando sobre la superficie de acero inoxidable proteínas de la leche que han sido desnaturalizadas debido a las temperaturas del proceso, acelerando así la adhesión de las bacterias. La β -Lactoglobulina de la leche se desnaturaliza y se acumula en esta zona del proceso, así como también se deposita fosfato de calcio sobre la superficie (Rosmaninho y Melo 2006). Previamente se ha reportado que cuanto más residuos se encuentran en la superficie mayor es la actividad bacteriana sobre esta (Hinton et al., 2002), por lo que estos residuos protegen de cierta manera a los microorganismos presentes en el biofilm lo cual los hace más resistentes a protocolos regulares de limpieza. Una vez que estos biofilms son formados sobre las superficies de los equipamientos pueden afectar de forma negativa ya que disminuyen la transferencia de calor (Sandu y Singh, 1991) y las superficies se pueden corroer (Bryers, 1987). La mayoría de las superficies en la industria láctea son de acero inoxidable por la facilidad que brinda para su limpieza y su resistencia a agentes químicos. Sin embargo, se ha detectado que los mecanismos de limpieza mecánica pueden ocasionar pequeñas fisuras o grietas en la superficie que podrían funcionar como sitios de colonización para los microorganismos y depósitos de materiales orgánicos remanentes (Wirtanen et al., 1996).

Debido a lo anteriormente mencionado, debe ser de suma importancia el control y la remoción de los biofilms para prevenir la contaminación de los productos procesados a nivel industrial. Así como para evitar el bloqueo y fallas en los equipamientos. Existen diversos enfoques para el control y remoción de biofilms a nivel industrial como por ejemplo la alteración química de la superficie para prevenir la adhesión celular, tratamiento de las superficies con agentes antimicrobianos, o uso de regímenes intensos de limpieza (Bower et al., 1996). Los sistemas de limpieza más utilizados en la industria se denominan CIP (cleaning – in place process), el cual implica enjuagar las líneas de producción de leche con químicos de limpieza y sanitizantes y posteriormente sustancias antimicrobianas (Bremer et al., 2009).

En la industria láctea, los microorganismos más relevantes en la formación de biofilm son *Streptococcus* spp. y los pertenecientes al género *Bacillus*. Debido a la selección microbiana que producen los distintos procesos, estos biofilms

generalmente están dominados por una especie en particular, con una densidad celular baja de aproximadamente 10^6 - 10^7 células por cm^2 (Parkar et al. 2003). Los estudios demuestran que los biofilms brindan una protección extra a las células luego de las limpiezas CIP y que éstas permanecen adheridas en las superficies (Hinton, 2003).

Tanto las esporas como las células vegetativas son capaces de adherirse al acero (Flint et al., 2001, Parkar et al., 2001). Una vez adheridas, las esporas probablemente germinan y crecen (Scott et al. 2007), así *Bacillus* spp. pueden prosperar en los equipamientos. Las especies bacterianas más comúnmente encontradas en la industria láctea formando biofilms son *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *B. cereus*, *B. pumilus*, y *Geobacillus* sp (Murphy et al., 1999; Parkar et al., 2001; Scott et al., 2007; Burgess et al., 2010; Shaheen et al., 2010). También se ha establecido que las esporas poseen una capacidad de adhesión sobre el acero inoxidable mayor que las células vegetativas, debido a que las primeras tienen mayor hidrofobicidad, y su capacidad de resistir el calor y químicos es mayor (Hüsmark y Rönner, 1992).

La presencia de microorganismos esporulados capaces de adherirse a superficies de la industria y formar biofilms es de gran importancia ya que estas bacterias pueden producir enzimas extracelulares termoresistentes como lipasas, proteasas y lecitinasas, las cuales contribuyen de forma negativa provocando deterioro (Marchand et al., 2009). Debido a que estas enzimas pueden ser liberadas a la leche por las bacterias adheridas sin que estas células sean liberadas, la contaminación puede no ser detectada hasta que problemas relacionados con el deterioro aparezcan recién en los productos finales.

En resumen, la rentabilidad y la reputación en la industria láctea dependen de la calidad y seguridad de los productos generados. Es por esto que el control de microorganismos patógenos y causantes de deterioro es de vital importancia, por lo que se utilizan procesos como la pasteurización y refrigeración para combatirlos. Sin embargo, el éxito de estos puede estar restringido debido a la presencia de bacterias aerobias formadoras de esporas capaces de soportar tratamientos térmicos, formar biofilms y producir exoenzimas.

2.4 OBJETIVOS

2.4.1 Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es cuantificar y caracterizar la microflora termodúrica presente en leche cruda proveniente de establecimientos queseros artesanales de la cuenca lechera sur.

2.4.2 Objetivos específicos

- Cuantificar la carga de microorganismos termofílicos presentes en leche cruda, y su variación en las distintas estaciones del año.
- Seleccionar e identificar aislamientos termofílicos productores de enzimas de deterioro: proteasas y lipasas.
- Determinar la capacidad de adhesión: en placas de poliestireno y en acero inoxidable.
- Evaluar la capacidad proteolítica en biofilm.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MUESTREO

Para la obtención de muestras de leche cruda, se seleccionaron cuatro productores queseros artesanales localizados en el departamento de Colonia. Las muestras se colectaron en forma bimensual entre los meses de mayo y noviembre del año 2017. A los efectos de realizar un análisis estacional las muestras se asignaron a otoño (correspondiente al mes de Mayo), invierno (en el mes de Julio) y primavera (Setiembre y Noviembre).

Las muestras fueron obtenidas de manera aséptica, directamente del tanque de frío al momento del ordeño en frascos estériles de 100 mL, y se mantuvieron refrigeradas hasta su procesamiento en el laboratorio.

3.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Las muestras de leche se homogeneizaron a 40°C durante 20 minutos, invirtiendo el frasco de muestreo periódicamente, para realizar posteriormente diluciones decimales seriadas en solución salina fisiológica (SSF, NaCl 0,85%). Para el recuento de microorganismos termodúricos, las muestras fueron tratadas térmicamente a 80°C durante 10 minutos, y se sembraron 100 µL en superficie en placas de PCA (Plate Count Agar) adicionado con caseinato al 1%. Las placas se incubaron a 37°C, 55°C y 5°C para evaluar el crecimiento de microorganismos termodúricos mesófilos, termófilos y psicrótrofos, respectivamente. Las placas se incubaron entre 24 y 48 hs. Por otro lado, 10 mL de muestra de leche tratada térmicamente se conservó durante 5-7 días a 5°C para obtener una muestra enriquecida en microorganismos termodúricos psicrótrofos. Luego de este período de tiempo se realizaron diluciones decimales seriadas en SSF y se sembraron en superficie PCA+Caseína 1%. Las placas se incubaron en estufa a 37°C durante 24-48 hs y a 5°C durante 5-7 días. Paralelamente se realizó el recuento de mesófilas y psicrótrofos totales a partir de diluciones decimales seriadas en SSF de muestras de leche cruda homogenizada sin tratamiento térmico. Las diluciones se sembraron en superficie en placas de PCA+caseína 1% y se incubaron a 37°C por 24-48 hs para el recuento de bacterias mesófilas, y a 5°C por 5-7 días para psicrótrofos.

3.3 RECUESTO Y SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS

Una vez finalizados los períodos de incubación, se realizó el recuento total y recuento de colonias con actividad proteolítica (formación de halos de proteólisis en el medio PCA+Caseína) en todas las condiciones ensayadas. Los aislamientos termodúricos que presentaron halo de proteólisis se seleccionaron y se aislaron nuevamente a un medio PCA+Caseína incubando a 37°C durante 24-48 hs. Se realizó la descripción morfológica y microscópica de las colonias a partir de las cuales se realizaron los aislamientos tomando en

cuenta los criterios de tamaño, forma, color, tipo de superficie, márgenes y producción de exopolisacáridos. Todos los aislamientos se conservaron en medio crioscópico, constituido por caldo TS (Tryptona Soya) con glicerol 15%.

3.4 CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA Y LIPOLÍTICA

La actividad proteolítica y lipolítica de los aislamientos seleccionados se evaluó en medio PCA adicionado con caseína al 1% y agar Spirit Blue (Difco), respectivamente. Las placas se incubaron a 37°C durante 24-48 horas. La presencia de una zona clara de hidrólisis alrededor de la colonia se interpretó como positivo para la actividad ensayada. Se utilizó el programa ImageJ 1.42q (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EEUU, <http://rsb.info.nih.gov/ij>) para medir la superficie de la colonia y de la colonia con su respectivo halo de actividad enzimática, se calculó la relación entre ambos como medida de cuantificación relativa de la actividad enzimática correspondiente.

3.5 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ADHESIÓN

Se seleccionaron aquellos aislamientos termodúricos que presentaron alta actividad proteolítica y lipolítica tomando en cuenta el diámetro de los halos tanto en medio PCA+Caseína como Spirit Blue respectivamente. También se tuvo en cuenta la procedencia de los mismos, procurando que representaran muestras de las diferentes épocas del año y de los distintos establecimientos. Se seleccionaron un total de 26 aislamientos para la determinación de su capacidad de adhesión.

La determinación de la capacidad de adhesión se realizó en placas de poliestireno de 96 pocillos y en acero inoxidable 304/316 (utilizados en los equipamientos de plantas lácteas) usando como matriz tanto caldo TS como leche UHT descremada. La cuantificación se realizó por un método colorimétrico con Cristal violeta (Auger et al., 2006). La medida utilizada para la cuantificación fue el índice de biofilm que se obtuvo para cada aislamiento, sobre la base de un control de medio de cultivo sin inocular, como la relación $\text{AbsorbanciaBiofilm}/\text{AbsorbanciaControl}$ (Li et al., 2007).

3.5.1 Determinación de la capacidad de adhesión en placas de poliestireno

Se crecieron los aislamientos en caldo TS por 16-24 hs. a 37°C, estos preinóculos se ajustaron a una $D.O_{600nm}$ de 0.1 y se inocularon al 1% en una placa de poliestireno de 96 pocillos conteniendo cada pocillo 150 μL de caldo TS. Las placas se incubaron por 24 hs con agitación leve a 37°C. Luego de 24 hs de incubación se midió la densidad del biofilm formado según la metodología propuesta por Auger et al. (2006), usando duplicados por cada aislamiento. Luego del período de incubación, se descartó el sobrenadante y se realizan dos lavados con 180 μL de PBS (Buffer fosfato salino) estéril. Las células adheridas se tiñeron con cristal violeta al 1% estéril durante 20 minutos a temperatura ambiente con agitación. Luego los pocillos se lavaron tres veces

con 200 μ L de PBS estéril y se secaron al aire. El colorante se solubilizó con 180 μ L de etanol 74% y se midió la absorbancia a 490 nm. La absorbancia a 490 nm del colorante solubilizado se utilizó como medida indirecta de la cantidad de células capaces de adherirse a la superficie.

3.5.2 Observación de la evolución de la formación de biofilm mediante microscopía de contraste de fase en placas de poliestireno

Se seleccionan aislamientos con baja, media y alta capacidad de adhesión de acuerdo a los resultados obtenidos con el ensayo anterior. Estos se incuban a 37°C en caldo TS por 16-24 hs. Luego de este período de tiempo, se inoculan placas de poliestireno de 6 pocillos conteniendo 5 mL de caldo TS y 50 μ L de inóculo con una *D.O_{600nm}* 0.1 en cada uno de los pocillos. Las placas se incubaron durante 24 hs y 48 hs, ambas a 37°C con agitación leve. Luego de la incubación, se lavaron los pocillos con PBS y se observaron en microscopio de contraste de fase Olympus CX41 con un aumento de 100X. Las imágenes del biofilm fueron tomadas con un sistema de captura y archivo de imágenes INFINITY 1-1 (Lumenera Corp.).

3.5.3 Determinación de la capacidad de adhesión en acero inoxidable

Preinóculos en caldo TS crecidos por 16-24 hs a 37°C, y ajustados a una *D.O_{600nm}* de 0.1, se utilizaron para inocular tubos conteniendo 5 mL de caldo TS estéril y un cupón de acero inoxidable 304/316 previamente esterilizado (Faille et al., 2010). Los tubos se incubaron a 37°C durante 48 hs, transcurrido este período, se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con 5 mL de PBS (Buffer fosfato salino) estéril. Posteriormente se tiñó con cristal violeta al 1% estéril durante 20 min. a temperatura ambiente con agitación, se enjuagó tres veces con 5 mL de PBS estéril y se dejó secar al aire. El cristal violeta se solubilizó con 5 mL de etanol 74% y se midió la absorbancia a 490 nm. Paralelamente se realizó el mismo ensayo pero utilizando leche UHT descremada en lugar de caldo TS. Los controles se realizaron en caldo TS y leche UHT con el cupón de acero inoxidable estéril sin inóculo.

3.6 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EN BIOFILM

Para evaluar la capacidad de producción de proteasas de microorganismos adheridos se realizó un ensayo de coagulación de leche (Teh et al., 2012).

3.6.1 Ensayo de coagulación

Para esto, se utilizaron aquellos aislamientos cuyo índice de biofilm fuera mayor o igual a 1.5, es decir, que tuvieran alta capacidad de adhesión. Fueron un total de 8 aislamientos seleccionados que se inocularon en un tubo conteniendo 5 mL de caldo TS estéril y un cupón de acero inoxidable 304/316 estéril, y se incubó a 37°C durante 24 hs. Posteriormente se descartó el sobrenadante y el cupón de acero se lavó dos veces con PBS, para luego colocarlo en un tubo conteniendo leche UHT descremada. Los tubos se

incubaron a 37°C durante 5 días. La coagulación de la leche se tomó como positivo para la producción de proteasas por parte de las células adheridas al cupón de acero inoxidable. Paralelamente se realizaron dos controles: un control únicamente con leche UHT y otro control con leche UHT y cupón de acero inoxidable estéril.

3.6.2 Evaluación de actividad proteolítica en sobrenadantes

Para comprobar la presencia de enzimas proteolíticas producidas por los microorganismos adheridos al cupón de acero inoxidable, se repitió el ensayo de adhesión a placas de acero previamente descrito (punto 3.6.1), pero luego de ser lavado el cupón con las células adheridas se colocó en un nuevo tubo con caldo TS y se incubó a 37°C durante 5 días. Transcurrido este período de tiempo, se colectó el sobrenadante conteniendo las enzimas producidas por los microorganismos adheridos y células libres. El sobrenadante se centrifugó a 1000 rpm durante 1 minuto para eliminar las células bacterianas y se filtró utilizando filtro millipore de 0.22 µm. Para comprobar la presencia de enzimas proteolíticas, 100 µL de sobrenadante se inocularon en pocillos realizados en placas de PCA+Caseína 1%. Las placas se incubaron a 37°C durante 24hs. y se evaluó la formación de halos alrededor del pocillo.

3.7 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLAMIENTOS

Para la identificación de los aislamientos seleccionados se utilizaron las técnicas de RAPD-PCR y secuenciación del gen 16S rADN.

3.7.1 Aislamiento de ADN

Cultivos puros de los aislamientos seleccionados se sembraron en caldo TS y se incubaron a 37°C durante 24 hs. Luego se centrifugaron las células en una centrífuga de mesa Spectrofuge 7M (Labnet International Inc. USA) a 10.000 rpm durante 5 minutos y los paquetes celulares obtenidos 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 (GeneJet Fermentas International Inc. USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este ADN fue luego resuspendido en 40 µL de buffer TE y fue utilizado como molde en las reacciones de amplificación.

3.7.2 Análisis RAPD-PCR

El análisis RAPD-PCR se realizó en 25 µL de reacción que contenía: 1X Thermo buffer (Fermentas International Inc. USA), 0.2 mM de cada dNTP (Fermentas, USA), 2.5 mM de MgCl₂, 1 µM de cebador OPR13 (5'-GGACGACAAG-3') (Rominus et al., 1997), 1U Taq polimerasa (Fermentas, USA) y 20 ng de ADN molde. La amplificación se realizó en un termociclador Corbett CG1-96 (Corbett Research UK) tomando en cuenta los siguientes parámetros: desnaturalización a 94°C durante 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 durante 4 min (Rominus et al., 1997). Se incluyó un control negativo sin ADN molde. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa 1% utilizando buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) y 100 V/cm para la corrida electroforética. Los geles se tiñeron con GoodView (3%v/v), y fueron visualizados y fotografiados en un transiluminador UV. Se incluyeron en el ensayo cepas patrón pertenecientes al género *Bacillus* spp. provenientes de la colección del laboratorio. Los perfiles de bandas obtenidos por la técnica de RAPD-PCR para los aislamientos estudiados fueron comparados entre sí y con las cepas patrón.

3.7.3 Análisis de la secuencia del gen 16S rADN para la identificación de aislamientos

Se realizó el análisis de la secuencia del gen 16S rADN de aquellos aislamientos que no pudieron ser identificados por comparación de perfiles con las cepas patrón. A su vez se eligió un aislamiento representativo de cada perfil de RAPD-PCR observado. Para la amplificación se realizaron 25 µL de reacción conteniendo: 1X Thermo buffer (Fermentas, USA) ,0.2 mM de cada dNTP (Fermentas, USA), 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 M de cada cebador (tanto del fD1 como del rD1), 1U de Taq polimerasa (Fermentas, USA) y 20 ng de ADN molde. Los cebadores fD1 y rD1 se utilizaron para amplificar un fragmento de 1540 pb correspondientes al gen 16S rADN (Weisburg et al., 1991). Los parámetros para la amplificación fueron los siguientes: un proceso de desnaturalización a 94°C durante 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 durante 10 min. Se incluyó un control negativo sin ADN molde. La purificación y secuenciación de los amplicones fue realizada por MacroGen Sequencing Service, Korea, utilizando un secuenciador capilar ABI PRISM 3730XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) utilizando el cebador fD1. Una vez obtenidas las secuencias de ADN, estas fueron comparadas con secuencias presentes en bases 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 CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA DE MICROORGANISMOS TERMODÚRICOS PRESENTES EN LECHE CRUDA Y SU VARIACIÓN EN LAS DISTINTAS ESTACIONES DEL AÑO

El estudio de bacterias termodúricas es de interés ya que estos microorganismos contaminantes de la leche cruda son capaces de soportar tratamientos a altas temperaturas utilizados en la industria, como la pasteurización, pudiendo llegar así a los productos finales elaborados y afectar su calidad. Estas bacterias pueden alcanzar la leche cruda recién ordeñada debido a suciedad en la ubre de la vaca, lo cual es provocado por el ambiente del tambo, ya sea por el polvo, heces o el suelo. Es necesario un correcto manejo en las prácticas de ordeño por parte del tambero así como también una buena limpieza de los equipos utilizados para esta rutina, de manera de evitar la contaminación de la leche y obtener recuentos reducidos de microorganismos.

En este trabajo se evaluó la carga de microorganismos termodúricos en leche cruda proveniente de 4 tambos diferentes ubicados en el departamento de Colonia, Uruguay. Las muestras fueron tomadas de forma bimensual entre los meses de mayo y noviembre del año 2017. En la tabla 1 se observan los valores de recuentos obtenidos para distintos grupos microbianos evaluados. La carga de microorganismos termodúricos se discriminó de acuerdo a sus características mesófilas, termófilas y psicrótrofas. Del mismo modo se incluyó el recuento de microorganismos mesófilos y psicrótrofos aerobios totales como medidas de calidad microbiológica de la leche.

De acuerdo a lo establecido en el decreto 359/013 y las modificaciones realizadas en 2016 el valor máximo para recuento bacteriano será de 100.000 ufc/mL para la leche cruda previo a su recolección o transformación en el establecimiento artesanal. Valor referido a la media geométrica de los resultados obtenidos ponderada por volumen de leche remitida, durante un período móvil de tres meses, con un mínimo de tres muestras por mes.

Se puede notar que los recuentos de mesófilos aerobios totales se encuentran en su mayoría por debajo del límite que establece el decreto. Sin embargo, en el mes de noviembre se pudieron observar valores que llegan a 10^7 para ciertos productores. Si bien lo permitido son valores menores a 1×10^5 ufc/mL, se toma un promedio, y en el caso de este estudio se tienen valores puntuales por lo que este promedio no es realizado.

Por otro lado, el recuento de microorganismos termodúricos en los distintos establecimientos lecheros fue generalmente bajo, tanto para los mesófilos (10^1 - 10^3 ufc/ml) como los termófilos ($\leq 10^1$ ufc/ml) en todos los meses analizados.

Esto indicaría bajos niveles de microflora resistente a tratamientos térmicos capaces de provocar un problema posterior a nivel industrial.

Se debe considerar que las variaciones observadas en los recuentos bacterianos entre los distintos productores pueden ocasionarse por diversos factores propios de cada productor. La rutina de ordeño y de limpieza del tambo son factores que inciden directamente en el desarrollo bacteriano y la consiguiente contaminación de la leche. Por otra parte, el factor climático, principalmente la ocurrencia de lluvias, el aumento del barro y la suciedad de las ubres también deben tenerse en cuenta. De todos modos se debe destacar que en el presente trabajo las muestras de todos los productores fueron obtenidas el mismo día, por lo que el factor clima fue común para todas las muestras.

En cuanto a los recuentos iniciales de microorganismo termodúricos psicrótrofos, para todas las muestras se encontraron valores por debajo del límite de detección de la técnica utilizada ($< 10^1$ ufc/ml), incluso en aquellas muestras con recuentos elevados de psicrótrofos totales. Por lo que para confirmar la presencia o ausencia de microorganismos termodúricos psicrótrofos, se realizó un enriquecimiento conservando las muestras de leche, previamente tratadas térmicamente, durante 5-7 días a 5°C. Como se observa en la tabla 1, luego del enriquecimiento se obtuvieron valores de recuento de microorganismos termodúricos psicrótrofos. Este grupo microbiano es de crucial importancia ya que pueden ser productores de enzimas proteolíticas termoestables capaces de degradar ciertos componentes de la leche y así afectar su calidad y la de productos derivados, aun así encontrándose a temperaturas de refrigeración.

Tabla 1: Valores de recuento (ufc/mL) de los distintos grupos microbianos estudiados para cada muestra de leche cruda analizada.

	Recuento TD mesófilos (ufc/mL)	Recuento TD termófilos (ufc/mL)	Recuento TD psicrótrofos (ufc/mL)	Recuento total mesófilos (ufc/mL)	Recuento total psicrótrofos (ufc/mL)	Enriquecimiento a 5°C (ufc/mL)
Mayo						
Productor 1	$2,1 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	$6,0 \times 10^4$	n.d	n.d
Productor 2	$9,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^4$	n.d	n.d
Productor 3	$5,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^4$	n.d	n.d
Productor 4	$6,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	$3,0 \times 10^3$	n.d	n.d
Julio						
Productor 1	$6,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	$1,5 \times 10^4$	$2,45 \times 10^3$	$1,4 \times 10^2$
Productor 2	$9,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	$3,4 \times 10^3$	$6,9 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$
Productor 3	$4,3 \times 10^2$	$1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	$8,3 \times 10^5$	$9,0 \times 10^4$	$1,9 \times 10^3$
Productor 4	$2,0 \times 10^2$	$6,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	$2,7 \times 10^3$	$1,7 \times 10^2$	$5,7 \times 10^4$
Setiembre						
Productor 1	$2,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	$1,1 \times 10^5$	$1,3 \times 10^3$	$3,0 \times 10^4$
Productor 2	$4,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	$1,9 \times 10^4$	$< 1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$
Productor 3	$5,0 \times 10^1$	$3,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	$1,5 \times 10^4$	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$
Productor 4	$4,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	$3,8 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$
Noviembre						
Productor 1	$1,9 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	$3,0 \times 10^7$	$3,3 \times 10^5$	$3,0 \times 10^4$
Productor 2	$5,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	$2,6 \times 10^4$	$< 1,0 \times 10^1$	$2,5 \times 10^2$
Productor 3	$5,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^5$	$4,3 \times 10^2$	$3,7 \times 10^3$
Productor 4	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	$3,0 \times 10^7$	$3,3 \times 10^5$	$1,4 \times 10^3$

TD: bacterias termodúricas. n.d: no determinado.

Para cada muestra se obtuvo el recuento de microorganismos termodúricos proteolíticos identificado por la presencia de un halo traslúcido alrededor de la colonia producto de la hidrólisis de la caseína agregada al medio. En la figura 1, a modo comparativo, se observa la carga de microorganismos aerobios totales, termodúricos mesófilos totales y proteolíticos, para los diferentes productores en los distintos meses del año 2017.

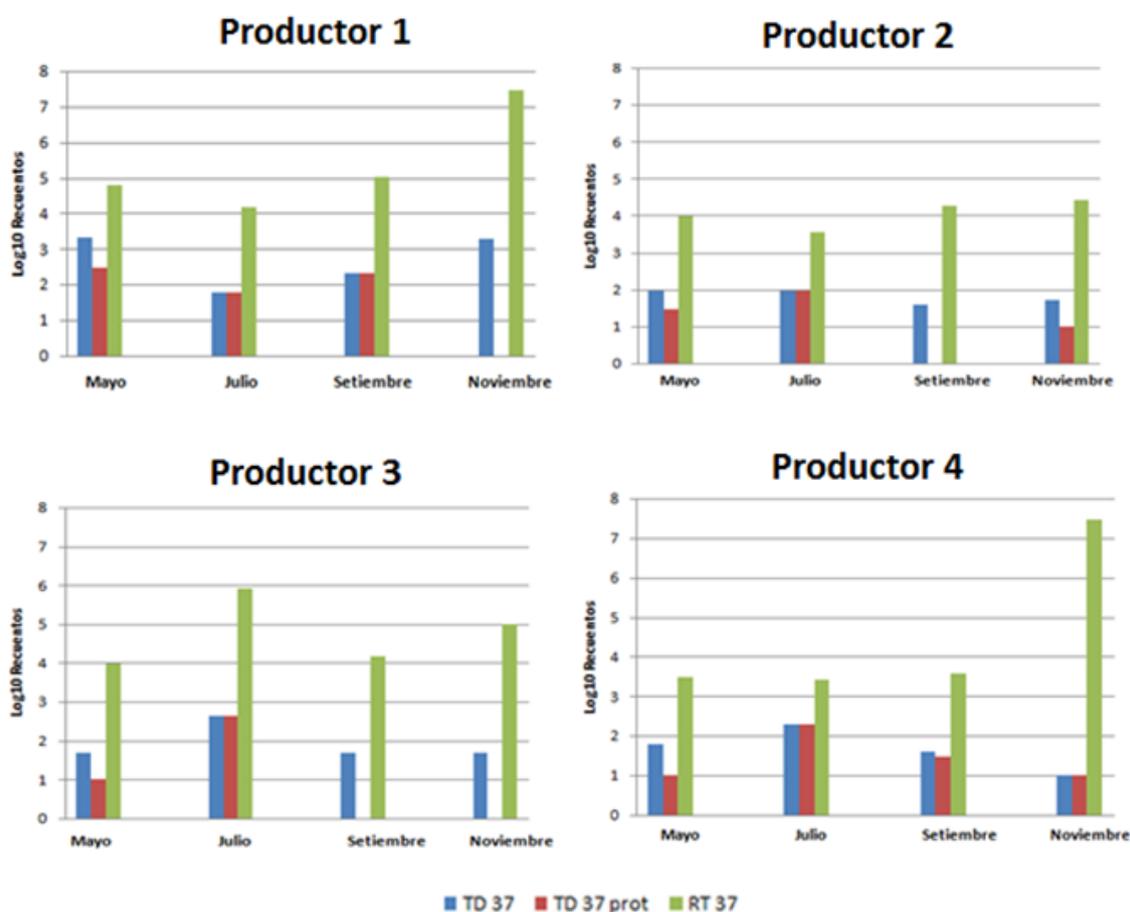


Figura 1: Recuento bacteriano en PCA+Caseína para diferentes meses del año 2017 y distintos productores. En azul se expresa el recuento de las bacterias termodúricas mesófilas (incubadas a 37°C), en rojo termodúricas mesófilas proteolíticas y en verde se indica el recuento total de la microflora bacteriana mesófila.

Se puede observar que existe variabilidad entre los distintos productores en los diferentes meses del año en cuanto a los valores de recuentos aerobios totales y de termodúricos mesófilos totales. Del mismo modo, se pueden ver cambios en las poblaciones termodúricas en cuanto a su capacidad proteolítica, es decir, varía para un mismo productor y para los productores entre sí el recuento de microorganismos termodúricos mesófilos totales en comparación con aquellos proteolíticos (Fig. 1). A su vez, estas bacterias resistentes a tratamientos térmicos, muestran en todos los productores, salvo en el productor 1, un pico máximo en el mes de julio. En este mes se observa que los termodúricos en su totalidad son proteolíticos, lo cual difiere para la mayoría de los meses restantes.

El productor 4 muestra valores de recuentos de termodúricos menores al resto a lo largo del año, pero esta población es casi en su totalidad proteolítica. Para el resto de los productores la porción proteolítica de la población termodúrica varía en los distintos meses, siendo nula en los meses de setiembre y noviembre para algunos productores. El productor 2 es el que presenta valores de recuento total de microorganismos mesófilos y termodúricos más constante

a lo largo del año si bien se observaron pequeños cambios. Para el caso del productor 3, se pudo ver un pico en el recuento total de mesófilos en el mes de julio a diferencia de los productores 1 y 4 cuyo valor máximo fue en noviembre.

Si bien se observaron cambios en la población proteolítica de la microflora termodúrica entre productores y en los distintos meses del año, los valores de recuento de microorganismos termodúricos totales se mantuvieron en el entorno de 10^2 ufc/mL. Esto indica que este grupo microbiano es un contaminante constante presente en la leche cruda. Pero esta población presenta cambios en su composición cuando observamos su capacidad proteolítica. Esto es claro si comparamos los productores 3 y 4, la población termodúrica de todas las muestras obtenidas del productor 4 es casi en su totalidad proteolítica, mientras que en el 50% de las muestras obtenidas del productor 3 no se obtuvieron microorganismos termodúricos proteolíticos. Estas variaciones en la composición de la población termodúrica es importante desde el punto de vista del riesgo de deterioro potencial de esta población microbiana. Li et al., (2018) realizaron un estudio en el cual analizaron la variación de la microflora de la leche cruda a lo largo de un período de 12 meses. Se demostró que la composición bacteriana fue diversa a lo largo de este período indicando que los factores ambientales como la temperatura y la humedad tienen un rol importante en este hecho. En los meses correspondientes a primavera y verano hallaron que existía una mayor riqueza de especies y esto puede deberse a un aumento en los riesgos que llevan a la contaminación. Se encontró que ciertos microorganismos termodúricos pertenecientes al género *Bacillus* corresponde a uno de los más abundantes en leche cruda. A su vez, los filos *Firmicutes* y *Proteobacteria* presentaron diferencias en su abundancia en los distintos meses lo cual lo relacionaron con cambios ambientales en la temperatura y la humedad propios de las diferentes estaciones del año.

Otros estudios realizados por Kmiha et al. (2017) han analizado la ocurrencia estacional de bacterias formadoras de esporas resistentes al tratamiento térmico utilizado en procesos UHT durante las estaciones de verano, invierno y primavera. Los resultados indicaron que el recuento total de microorganismos viables disminuyó una vez tratada la leche a altas temperaturas, lo cual es de esperarse. No obstante, la persistencia de ciertas bacterias formadoras de esporas indica su elevada resistencia a estos tratamientos, especialmente en las estaciones de primavera y verano.

4.2 SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS TERMODÚRICOS PRODUCTORES DE ENZIMAS: PROTEASAS Y LIPASAS

Es importante conocer qué tipo de microorganismos son productores de enzimas extracelulares debido a que la hidrólisis de proteínas y lípidos presentes en la leche puede ocasionar alteraciones de interés tecnológico tanto en el sabor como en el olor y la textura del producto.

Se seleccionaron un total de 44 aislamientos termodúricos proteolíticos provenientes de las muestras de leche cruda tomadas de los distintos productores en las distintas épocas del año. Del total, 32 aislamientos presentaban la característica de ser mesófilos, 7 termófilos y 5 psicrótrofos. La producción de exoproteasas se observó en placas de PCA+Caseína. La presencia de un halo traslúcido alrededor de la colonia es debido a la hidrólisis de caseína por parte de enzimas proteolíticas producidas por el microorganismo (Fig. 2A). También se estudió la capacidad de producir lipasas utilizando el medio Spirit Blue, en el cual se observa un halo de lipólisis alrededor de la colonia por acción de estas enzimas sobre la tributirina que contiene el medio de cultivo (Fig. 2B).

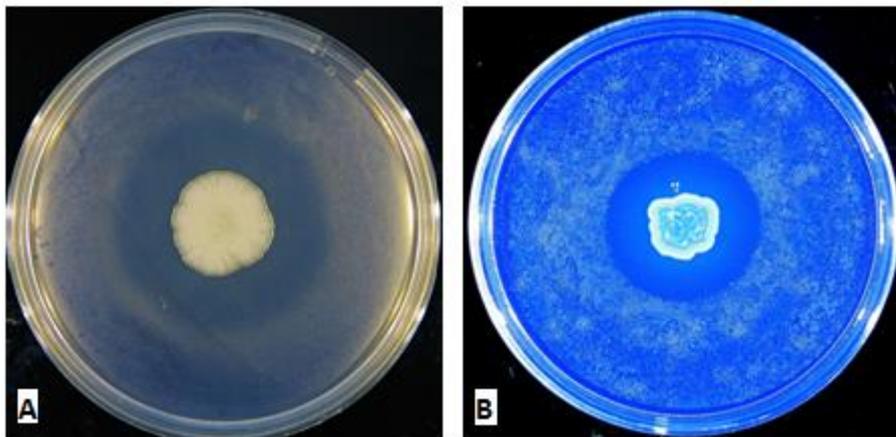
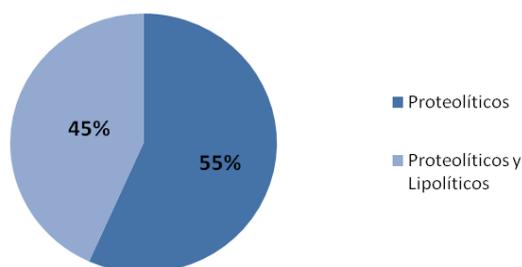


Figura 2: A: Halo de proteólisis en medio PCA+Caseína. B: Halo de lipólisis en medio Spirit Blue.

En la figura 3 se observa el porcentaje de aislamientos termodúricos mesófilos, que presentaron únicamente capacidad proteolítica como aquellos que exhibieron un potencial tanto proteolítico como lipolítico. Como se puede ver, el 45% de estos se caracterizan por ser productores de proteasas y lipasas. Por otra parte, se puede observar también que el 100% de los aislamientos termodúricos termófilos presentaron actividad proteolítica y lipolítica.

Termodúricos a 37°C



Termodúricos a 55°C

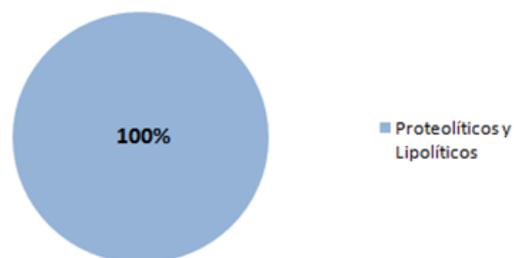


Figura 3: Porcentaje de aislamientos termodúricos mesófilos (izquierda) y termófilos (derecha) con capacidad de producir proteasas y lipasas.

Como se mencionó anteriormente, no se observó crecimiento de microorganismos termodúricos psicrótrofos con la técnica de recuento utilizada, pero sí se obtuvieron aislamientos termodúricos psicrótrofos luego del enriquecimiento a 5°C. De este enriquecimiento se seleccionaron solo 5 aislamientos con capacidad proteolítica, de los cuales 3 también mostraron capacidad lipolítica. Las enzimas proteolíticas y lipolíticas, en especial aquellas provenientes de bacterias psicrótrofas de la leche, por lo general permanecen activas luego de ser sometidas a tratamientos térmicos (Marchand et al., 2009). Este hecho es de especial importancia a nivel del almacenamiento de los productos tratados térmicamente en la industria. Esto es debido a que estas bacterias psicrótrofas son capaces de crecer a temperaturas de 7°C o menores, provocando así una reducción en la calidad de estos productos durante su refrigeración. Matta y Punj (1999) han identificado bacterias psicrótrofas formadoras de esporas y productoras de enzimas hidrolíticas provenientes de leche cruda pertenecientes al género *Bacillus*, como por ejemplo *B. cereus*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa* y *B. subtilis*.

Se seleccionaron aquellos aislamientos termodúricos que fueron tanto proteolíticos como lipolíticos para seguir trabajando, de los cuales 26 corresponden a microorganismos mesófilos. A su vez se eligieron 4 aislamientos psicrótrofos, 3 de ellos con el potencial de producir ambas exoenzimas. Por otra parte, como los microorganismos termodúricos incubados a 55°C fueron en su totalidad productores de proteasas y lipasas, se decidió continuar trabajando con estos 7 aislamientos. Para obtener una medida cuantitativa relativa de la actividad enzimática (proteolítica y lipolítica), se utilizó el programa ImageJ. Para el total de los 37 aislamientos seleccionados, se midió la superficie de la colonia y de la colonia con su respectivo halo de actividad enzimática y se calculó la relación entre ambos como medida de cuantificación relativa (Tabla 1 del Anexo).

En la figura 4 se observan estas medidas de cuantificación de la actividad enzimática agrupadas de acuerdo a los meses de muestreo

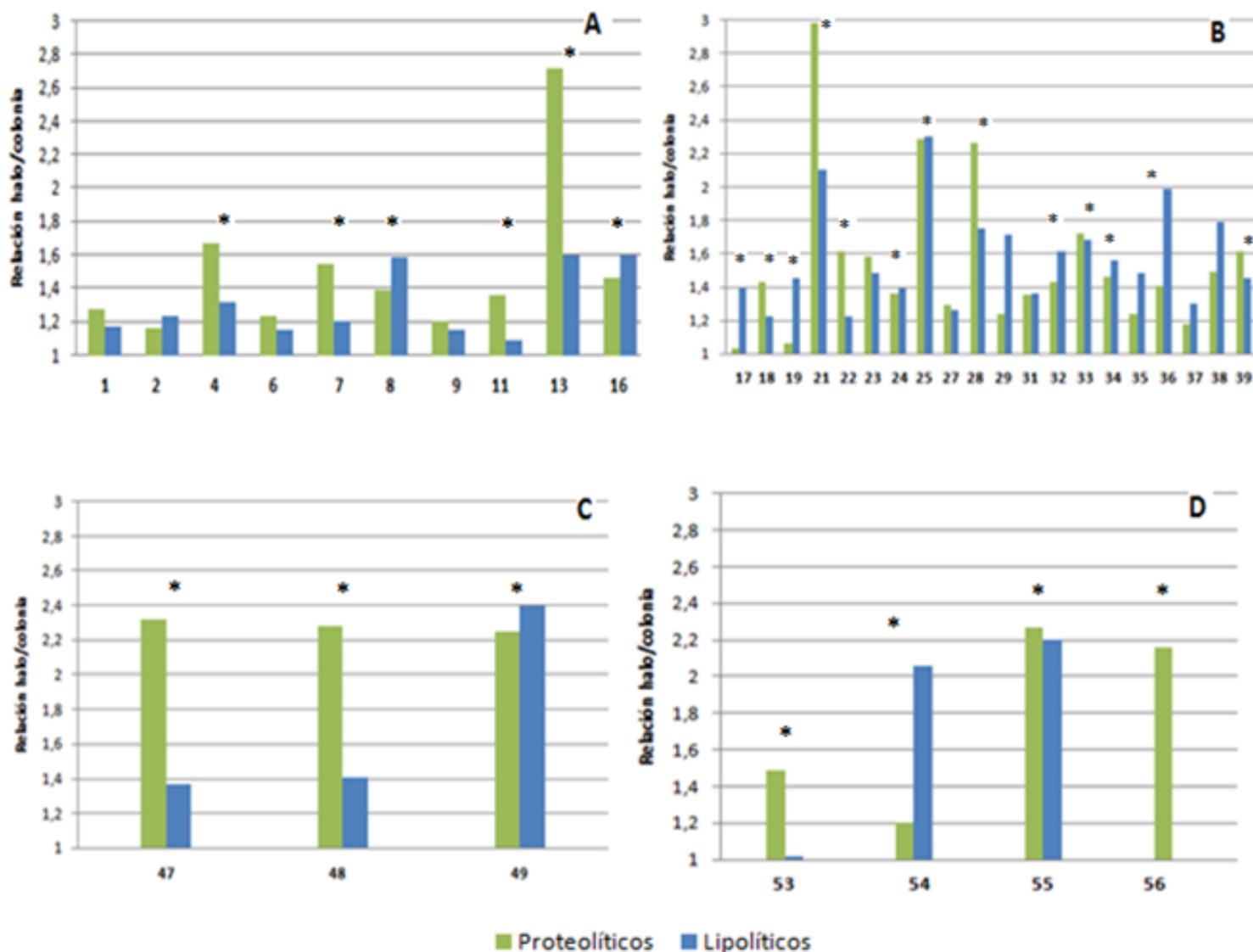


Figura 4: Relación halo/colonia para los distintos aislamientos proteolíticos y lipolíticos. En verde se representa la capacidad proteolítica y en azul la lipolítica de los diferentes aislamientos agrupados en los distintos meses del año 2017: A. Mayo, B. Julio, C. Setiembre, D. Noviembre. (*) Aislamientos a los cuales se les realizó ensayo de biofilm.

En los meses de mayo y julio la cantidad de aislamientos termotóxicos proteolíticos y lipolíticos fue mayor (Figura 4A y 4B). Sin embargo, los aislamientos obtenidos de las muestras procesadas en setiembre y noviembre, (Figura 4C y 4D) a pesar de ser pocos, exhibieron una capacidad proteolítica y/o lipolítica mayor a los aislados en el primer semestre del año 2017.

Como se puede observar en la figura 4, existe una gran variabilidad entre los diferentes aislamientos en cuanto a su capacidad para producir proteasas y lipasas (Tabla 1 del Anexo). Utilizando estos datos, los aislamientos se

clasificaron como con alta (relación halo/colonia $\geq 1,5$) o media ($1 < \text{relación halo/colonia} < 1,5$) capacidad de producción de enzimas.

En base a los resultados obtenidos, se seleccionaron aquellos aislamientos con alta capacidad de producir proteasas y/o lipasas (señalados con * en la Figura 4), procurando mantener en lo posible la representatividad de los distintos momentos de muestreo y de la diversidad fenotípica observada.

4.3 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ADHESIÓN: EN PLACAS DE POLIESTIRENO Y EN ACERO INOXIDABLE

La presencia de microorganismos capaces de adherirse a superficies formando biofilms implica un problema a nivel industrial. Su crecimiento y formación resultan perjudiciales debido a que causan diversos problemas como la obstrucción de tuberías y deficiencia en la transmisión de calor en ciertos equipamientos industriales (Storgards et al, 1999; Flint et al., 2000; Shaheen et al., 2010), elevando los costos de limpieza y mantenimiento. Estos biofilms también sirven como reservorio de distintas especies bacterianas, entre ellas las bacterias formadoras de esporas, las cuales pueden germinar, crecer y contaminar o deteriorar los alimentos (Brooks y Flint 2008).

Se seleccionaron 26 aislamientos que, de acuerdo a su capacidad de producir proteasas o lipasas, podrían llegar a través de la leche a la industria, colonizar las superficies y ocasionar la contaminación y deterioro de productos lácteos. La descripción morfológica y microscópica, así como la procedencia de los 26 aislamientos seleccionados se encuentra en la Tabla 2 del Anexo. En su mayoría se trata de bacilos, Gram positivos formadores de esporas, presumiblemente pertenecientes al género *Bacillus*.

4.3.1 Ensayo de adhesión en poliestireno

Se determinó la capacidad de adhesión en placas de poliestireno de un total de 26 aislamientos. La medida utilizada para la cuantificación fue el índice de biofilm, el cual se obtiene a partir de la relación de la absorbancia del aislamiento formador de biofilm sobre la absorbancia de un control de medio de cultivo sin inocular (Li et al., 2007). En la figura 5 se muestra el agrupamiento de los aislamientos de acuerdo al valor de su índice de biofilm (I.B) sobre el poliestireno. El 38% de los aislamientos se caracterizaron por tener un $I.B \leq 1$, lo cual indica que estos aislamientos no se adhieren al sustrato ensayado. El 62% de los aislamientos fueron capaces de adherirse al poliestireno y se clasificaron según su IB como aislamientos con media ($1 < I.B < 2$) y buena ($I.B \geq 2$) capacidad de adhesión, representando el 54% y 8% de los aislamientos, respectivamente.

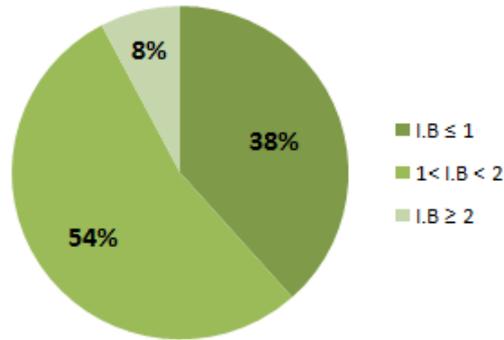


Figura 5: Índice de biofilm (I.B) de un total de 26 aislamientos seleccionados. Se muestran 3 categorías: $I.B \leq 1$ (38%), $1 < I.B < 2$ (54%) y $I.B \geq 2$ (8%).

Por microscopía de contraste de fase se observó la formación de biofilm a lo largo del tiempo. Para esto se escogieron aislamientos representativos con capacidad de adhesión medianamente buena ($1 < I.B < 2$) y buena ($I.B \geq 2$), y se observó la formación a biofilm a las 24 y 48 horas.

En la figura 6 se puede ver al aislamiento 17 (Figura 6 A y B), cuya capacidad de adhesión al poliestireno es medianamente buena, y al aislamiento 47 (Figura 6 C y D) que presentó un índice de biofilm superior a 2. Para ambos aislamientos se observó que a las 48 horas (Figura 6 B y D) la formación de biofilm es notoriamente mayor que a las 24 hs (Figura 6 A y C). Del mismo modo se observó que la densidad del biofilm formado a las 24 hs. de incubación fue mayor para el aislamiento 47. Con esto se puede ver la influencia del tiempo en la formación del biofilm, dado que a medida que transcurre el tiempo el número de microorganismos se ve aumentado. Seguramente exista una relación con la velocidad de crecimiento de cada microorganismo pero esto no fue evaluado en este trabajo. Es importante señalar la formación de esporas en estos microorganismos formadores de biofilm que se observan a las 48 hs. de incubación (Figura 6 B y D). Las esporas observadas a partir de las 48 horas de cultivo pueden provenir de las células adheridas, que frente a condiciones desfavorables como la escasez de nutrientes, entran en estado de dormancia, o bien pueden ser esporas que originariamente se encontraban en suspensión. Las esporas son más hidrofóbicas que las células vegetativas y esto favorece su capacidad de adhesión (Flint et al., 2001, Parkar et al., 2001). La ocurrencia simultánea de la formación de biofilm y la esporulación ha sido reportada para varias especies del género *Bacillus* contaminantes de la industria láctea (Burguess et al., 2009, Flint et al., 2001). Estas características hacen que este tipo de microorganismos sean indeseables para la industria.

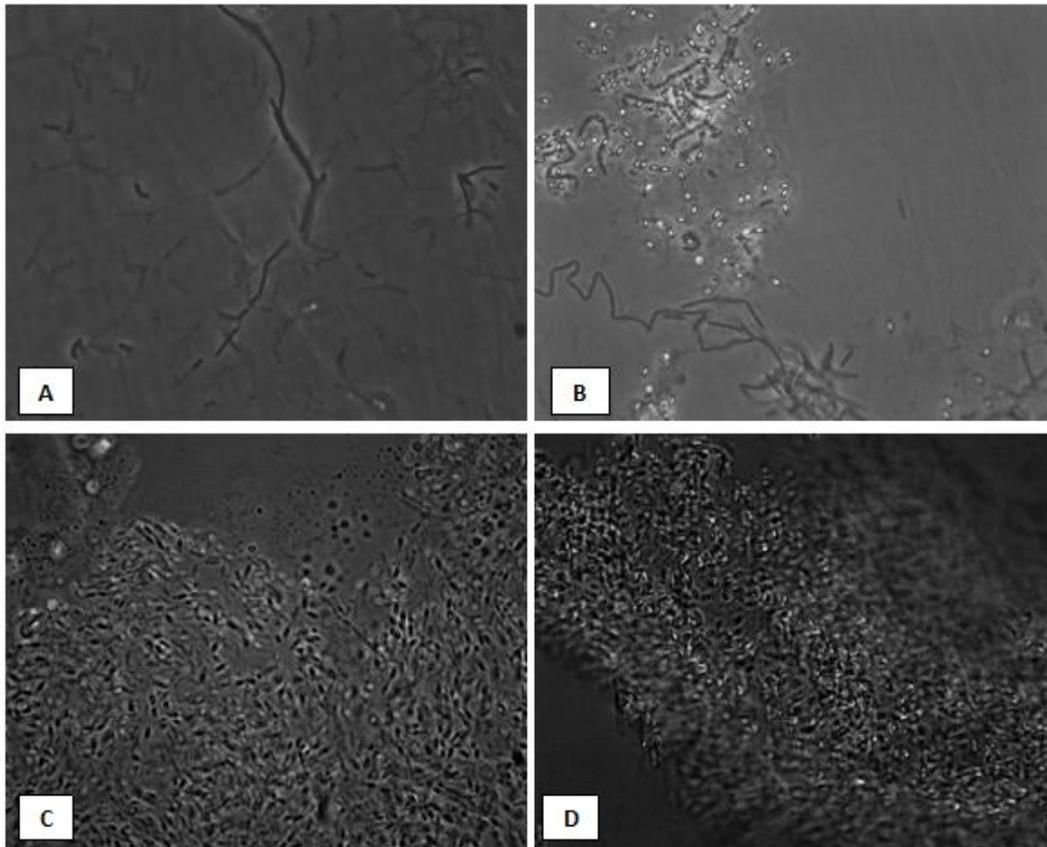


Figura 6: Microscopía de contraste de fase 100x de la formación de biofilm de los aislamientos 17 y 47 en placas de poliestireno a las 24 y 48 hs de incubación a 37°C en caldo Triptona Soya. **A y B:** Aislamiento 17 a las 24 y 48 hs respectivamente. **C y D:** Aislamiento 47 a las 24 y 48 hs respectivamente.

4.3.2 Ensayo de adhesión en acero inoxidable

La adhesión bacteriana es un proceso complejo afectado por muchos factores, incluyendo características propias del microorganismo (hidrofobicidad, producción de EPS, presencia de flagelos), las propiedades de las superficies (composición química, carga superficial, hidrofobicidad, rugosidad y textura) y por factores del medio ambiente (matriz, temperatura, pH, tiempo de exposición, presencia de inhibidores y condiciones de flujo de fluidos). Muchos de los factores antes mencionados inciden directamente en la adhesión de los microorganismos en las superficies de la planta de procesamiento láctea, principalmente los que tienen que ver con las superficies y el ambiente. Se ha visto que el “acondicionamiento” de superficies de acero inoxidable expuestas al pasaje de leche aumenta entre 10 y 100 veces la capacidad de adhesión de esporas y células vegetativas (Flint et al., 2001). Este acondicionamiento se refiere a la presencia de residuos orgánicos provenientes de la matriz, los que favorecen la adhesión de dichas células sobre el sustrato. Como previamente se evaluó la capacidad de adhesión sobre poliestireno y pudo comprobarse que ciertos aislamientos eran potencialmente formadores de biofilm, se optó por realizar el mismo ensayo pero utilizando acero inoxidable 304/316 como sustrato. Este material es utilizado en el equipamiento de la industria láctea.

Para este ensayo se seleccionaron los 8 aislamientos cuyo índice de biofilm en poliestireno fuera elevado ($\geq 1,5$). Con la finalidad de evaluar el efecto de la matriz, el ensayo se realizó utilizando caldo TS y leche UHT descremada como medio de cultivo. En la tabla 2 se indican los valores de índice de biofilm en acero inoxidable para todos los aislamientos estudiados en ambas matrices (caldo TS y leche UHT). Cuando evaluamos la capacidad de adhesión en el sustrato acero inoxidable, podemos ver que casi todos los aislamientos fueron capaces de adherirse y formar biofilm. La excepción fue el aislamiento 28 el cual presentó un índice de biofilm menor a 1 para ambas matrices. Esto indica que este aislamiento no es capaz de formar biofilm en acero inoxidable, cuando sí lo era en poliestireno como sustrato. Por otro lado, algunos aislamientos como los aislamientos 8, 19 y 56, parecen tener preferencia por la adhesión al acero inoxidable, mostrando valores de IB muy superiores a los observados en poliestireno.

Tabla 2: Índice de biofilm (I.B) en acero inoxidable 304/316 de los aislamientos seleccionados en caldo TS (CTS) y leche UHT descremada.

Aislamiento	I.B CTS	I.B Leche UHT
8	11,9	4,16
19	13,4	4,02
21	2,04	1,30
25	4,56	1,83
28	0,816	0,716
47	1,91	2,00
48	1,19	2,95
56	6,74	1,92

En cuanto al efecto de la matriz, se observó que la mayoría de los aislamientos analizados disminuyen su capacidad de adhesión cuando la matriz de crecimiento es leche UHT. En casi todos los aislamientos se observó un descenso del IB sobre acero inoxidable cuando la matriz de crecimiento fue leche UHT con respecto a lo observado en caldo TS. La excepción es el aislamiento 48, para el cual se observa un aumento de la adhesión cuando se utiliza leche UHT como medio. Es posible que los bajos valores de IB observados en leche se deban a un menor crecimiento bacteriano en esta matriz, comparado con el crecimiento en caldo TS. Esta hipótesis no se evaluó en el presente trabajo.

A modo comparativo, en la figura 7 se muestran los valores de índice de biofilm en las distintas matrices, es decir, en poliestireno (caldo TS) y en acero inoxidable (tanto en caldo TS como en leche UHT descremada), para los 8 aislamientos estudiados.

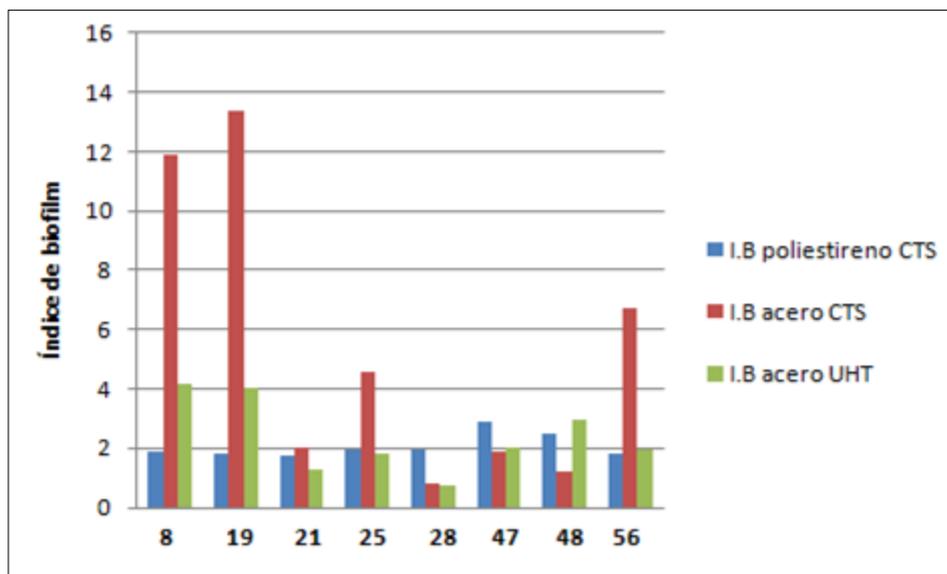


Figura 7: Índice de biofilm (I.B.) de los diferentes aislamientos en distintas matrices. En azul se muestra el I.B. en poliestireno y caldo TS; en rojo I.B. en acero inoxidable 304/316 y caldo TS; en verde I.B. en acero inoxidable 304/316 en leche UHT descremada.

En esta figura se puede observar cómo los distintos aislamientos se adhieren a los diversos sustratos y matrices con capacidades diferentes. Es notorio el hecho de que ciertos aislamientos presentan altos valores de índice de biofilm en acero inoxidable en caldo TS, siendo mayor a 10 para los aislamientos 8 y 19 y mayor a 4 para 25 y 56.

En cuanto a la formación de biofilm en acero inoxidable y leche UHT descremada, todos los aislamientos (exceptuando el 28) presentaron valores mayores a 1, por lo que serían potencialmente formadores de biofilm en esta matriz. A pesar de ello, existe una diferencia con respecto al caldo TS y acero como sustrato. Algunos aislamientos (8, 19 y 56) exhibieron una mayor capacidad de formar biofilm en acero inoxidable (en ambas matrices) que en poliestireno, mientras que otros (28 y 47) mostraron lo contrario.

Diversos estudios demostraron diferencias en cuanto a la adherencia de bacterias sobre diversos sustratos y en diferentes matrices. Se ha visto que la formación de biofilm fue más pronunciada en polipropileno que en acero inoxidable, y a su vez se notó una elevada sobrevivencia de estos en leche esterilizada en comparación con caldo TS (Pagedar, Singh y Batish, 2010). Estos concluyeron que la hidrofobicidad y el contenido nutricional afectan los biofilms formados por *S. aureus*. Previamente, Barnes et al., (1999) encontraron que las proteínas de la leche son capaces de reducir la adhesión de ciertos microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fragi*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, entre otros.

Puede verse entonces que existen otros factores, además de los ya conocidos, capaces de afectar la adherencia de microorganismos. Estos son la naturaleza física y química y localización del sustrato y el tipo de microorganismo y materia orgánica en contacto con el sustrato (Verran y Whitehead, 2005).

Al menos 7 de los 8 aislamientos estudiados serían capaces de adherirse a las superficies de la industria láctea. Para determinar su capacidad como posible agente de deterioro se evaluó la capacidad de producir enzimas proteolíticas cuando las células bacterianas están adheridas.

4.4 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROTEOLÍTICA EN BIOFILM

Como se ha mencionado anteriormente la presencia de microorganismos potencialmente formadores de biofilm es de interés en la industria láctea ya que estos provocarán que la vida útil del producto se vea disminuida a causa de la formación de exoenzimas degradativas como lo son las proteasas (Marchand et al., 2009). Estas enzimas extracelulares producidas por las bacterias presentes en el biofilm tienen el potencial de degradar las proteínas presentes en la leche como las caseínas. La ruptura de la k-caseína debido a la proteólisis produce la desestabilización de la micela de caseína de la leche y por lo tanto su agregación (Chen et al., 2003). Esto genera sabores amargos que afectan la calidad del producto.

La capacidad proteolítica de los aislamientos en biofilm se evaluó con un simple ensayo de coagulación de la leche. Cupones de acero inoxidable, sobre los cuales se adherieron previamente las células bacterianas, se pusieron en contacto con leche UHT descremada y se incubaron a 37°C durante 5 días. Diariamente se observaron los tubos verificando la coagulación o no de la leche. Como control negativo se incluyeron: un tubo de leche sólo con el cupón de acero inoxidable, y un tubo sólo con leche. Se asumió que si se producía la coagulación de la leche, esto era debido a las proteasas producidas por cada uno de los microorganismos adheridos al cupón de acero inoxidable.

En la figura 8A se observa, a modo de ejemplo, el tubo inoculado con el biofilm del aislamiento 47, el tubo control con el cupón de acero inoxidable sin inocular y el tubo control de leche (de izquierda a derecha). Como se puede ver en la figura 8A, sólo se observa coagulación de la leche en el tubo inoculado con el biofilm del aislamiento 47, lo que indicaría la producción de exoproteasas por las células adheridas al cupón de acero inoxidable. No se observó coagulación en ninguno de los controles negativos. Todos los aislamientos evaluados presentaron dicha capacidad proteolítica en biofilm, con excepción del aislamiento 28 el cual previamente se había demostrado que no era capaz de adherirse al acero inoxidable. Por otra parte, se pudo observar que el aislamiento 19, el cual no presentaba gran capacidad proteolítica en el medio PCA+Caseína, sí lo hizo en este ensayo adherido al acero inoxidable produciendo exoenzimas proteolíticas que fueron capaces de coagular la leche.

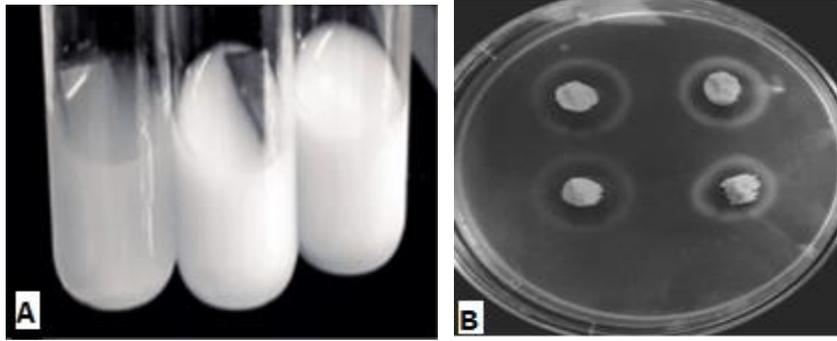


Figura 8: **A:** Coagulación de leche UHT descremada por parte del aislamiento 47 formador de biofilm sobre el acero inoxidable 304/316 (primer tubo) y dos controles; uno con acero inoxidable y leche UHT descremada estériles, y otro únicamente con leche UHT descremada estéril (segundo y tercer tubo respectivamente). **B:** Halos de proteólisis en medio PCA+Caseína generados por enzimas proteolíticas producidas por los aislamientos 8, 19, 21 y 25 formadores de biofilm sobre el acero inoxidable.

Para comprobar la presencia de dichas enzimas proteolíticas producidas por los microorganismos adheridos al acero inoxidable se evaluó la capacidad proteolítica de los sobrenadantes de estos tubos. Estos sobrenadantes, centrifugados y filtrados, se sembraron en PCA+Caseína. En la figura 8B se observa la formación de halos de proteólisis alrededor de los sobrenadantes obtenidos. Esto indicaría que efectivamente los aislamientos evaluados son potencialmente formadores de biofilm sobre el acero inoxidable y capaces de producir exoenzimas proteolíticas en esta condición.

Al menos 7 de todos los 45 aislamientos de microorganismos termodúricos seleccionados inicialmente son capaces de adherirse al acero inoxidable en presencia de leche formando biofilm, y producen enzimas proteolíticas capaces de coagular la leche. Estos aislamientos representarían un posible riesgo en cuanto a la calidad de los productos lácteos a nivel industrial. Sin embargo, se debe tener en cuenta que todos los ensayos realizados en el laboratorio son en condiciones ideales y a nivel industrial existen diversos factores que pueden llegar a modificar estos resultados. Estudios realizados por Teh et al., (2012) demostraron que las células bacterianas adheridas al acero inoxidable formando biofilm son capaces de producir enzimas proteolíticas. Notaron que en ciertos casos esta adherencia mejoraba la proteólisis en comparación con cultivos de células bacterianas en estado planctónico. Entre las bacterias utilizadas para este estudio, se encuentra una bacteria gram positiva formadora de esporas, *B. licheniformis*. Previamente, Teh et al., (2011), reportaron que estas enzimas pueden ser termoresistentes, soportando así temperaturas de pasteurización. Estos resultados previos y los del presente trabajo, reafirman la importancia de mantener rutinas de manejo y limpieza tanto en la industria como en el tambo de manera de evitar la contaminación con microorganismos capaces de producir estas enzimas degradativas adheridos al acero formando biofilm.

4.5 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LOS AISLAMIENTOS

Al momento de la selección de los aislamientos se realizó una descripción morfológica macro y microscópica (Tabla 2 del Anexo). De acuerdo a lo observado, si bien se observaron diferencias macroscópicas en las colonias, microscópicamente todos se correspondían con una descripción de bacilos, Gram positivos, y en la mayoría se pudo observar la presencia de esporas (20 de 26). La caracterización fenotípica ubica a los aislamientos como pertenecientes al género *Bacillus*.

Para confirmar esta presunción y lograr la identificación a nivel de especie se utilizaron las técnicas de RAPD-PCR con el cebador OPR13, y secuenciación del gen 16S rADN. La técnica de RAPD usando el cebador OPR-13 ha sido descrita y utilizada por varios autores para identificación y caracterización de aislamientos pertenecientes al género *Bacillus* (Ronimus et al., 1997). Esta técnica permitió una correcta discriminación entre los distintos genotipos presentes en la población de bastones esporulados contaminantes de polvos lácteos uruguayos (Reginensi et al. 2011), así como también fue utilizada para la identificación y caracterización de la población de microorganismos termodúricos contaminantes de tambos uruguayos (Moreno E., 2011).

En los ensayos de RAPD-PCR se incluyeron cepas de referencia, correspondientes a representantes de distintas especies del género *Bacillus*, pertenecientes a la colección del laboratorio. Se analizaron los perfiles de bandas obtenidos y se agruparon por similitud. A partir de los perfiles de cada grupo, evaluando características fenotípicas de cada aislamiento, y comparando con los perfiles obtenidos de las cepas de referencia incluidas en el ensayo, se logró identificar a nivel de especie algunos aislamientos. Aquellos a los que no se les pudo asignar especie por esta metodología fueron identificados por secuenciación del gen 16S rDNA. Del mismo modo, aislamientos representativos de cada grupo identificado a nivel de especie fueron confirmados por secuenciación.

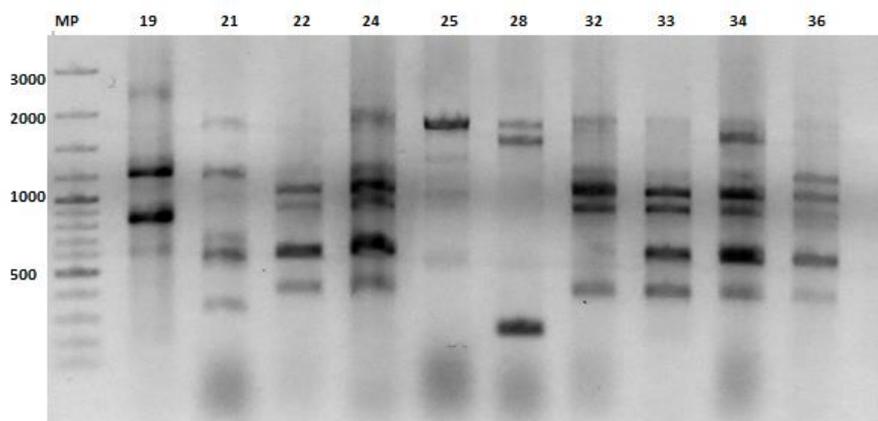


Figura 9: Perfiles de RAPD de aislamientos obtenidos de diferentes muestras. Arriba de cada carril se

muestra el número de aislamiento (19, 21, 22, 24, 25, 28, 32, 33, 34 y 36) y el marcador de peso molecular (MP). No se muestra el control negativo que se realizó sin ADN.

En la figura 9 se muestran los perfiles de RAPD-PCR de algunos de los aislamientos. Como se puede observar en la figura 9, los aislamientos 22, 24, 33, 34, 36, y también el 18 que no se muestra en esta figura, presentan perfiles de RAPD-PCR similares y conformarían el Grupo 1. Los perfiles de bandas de estos aislamientos fueron comparados con los obtenidos a partir del ADN de las cepas de referencia y fueron identificados como pertenecientes a la especie *Bacillus licheniformis* (Fig. 10). La identificación de este grupo fue confirmada por secuenciación del gen 16S rADN del aislamiento 24 y comparación de la secuencia obtenida con otras presentes en base de datos, NCBI BLAST database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Este fue identificado como *Bacillus licheniformis* (99% identidad). Los aislamientos 32 y 54 presentan perfiles de bandas y características fenotípicas similares, por lo que fueron agrupados conformando el Grupo 2. El aislamiento 54 fue identificado como *Bacillus subtilis* (100% identidad) por secuenciación.

Por otra parte, los aislamientos 19, 13, 17, 39 y 48 mostraron perfiles similares entre ellos y con una cepa de referencia correspondiente a *Bacillus amyloliquefaciens* (Fig. 10). Estos aislamientos conformaron el Grupo 3 y los aislamientos 19 y 48 fueron finalmente confirmados como *B. amyloliquefaciens* por secuenciación del gen 16S rADN (Tabla 3).

En lo que refiere a los aislamientos 21, 25 y 28 no pudieron incluirse en ninguno de los grupos genotípicos, ni ser comparados con cepas de referencia, pero presentaban características fenotípicas similares por lo que se les designó como Grupo 4. Estos tres aislamientos fueron identificados como *Bacillus pumilus* por secuenciación del gen 16S rADN (Tabla 3).

Otros agrupamientos realizados, los cuales no se muestran en esta figura, corresponden a los aislamientos 4, 16, 49 que presentaron un perfil de bandas característico y conformaron el Grupo 5. El aislamiento 16 fue identificado como *Bacillus safensis* (100% identidad). El Grupo 6 comprende a los aislamientos 5, 11 y 7 con su perfil de bandas característico, el aislamiento 7 fue seleccionado para su identificación por secuenciación pero la secuencia obtenida fue de mala calidad y no permitió asignar especie, por lo que los representantes de este grupo fueron identificados como *Bacillus* sp.

Los aislamientos 8, 47 y 56 no pudieron ser caracterizados genotípicamente, pero sí fueron identificados por secuenciación ya que eran aislamientos de importancia tecnológica por su capacidad de adhesión y potencial de deterioro. (Tabla 3).

A continuación, se muestran en la figura 10 a modo de ejemplo algunos perfiles de los aislamientos estudiados y de cepas de referencia de manera de poder compararlos y lograr su identificación.

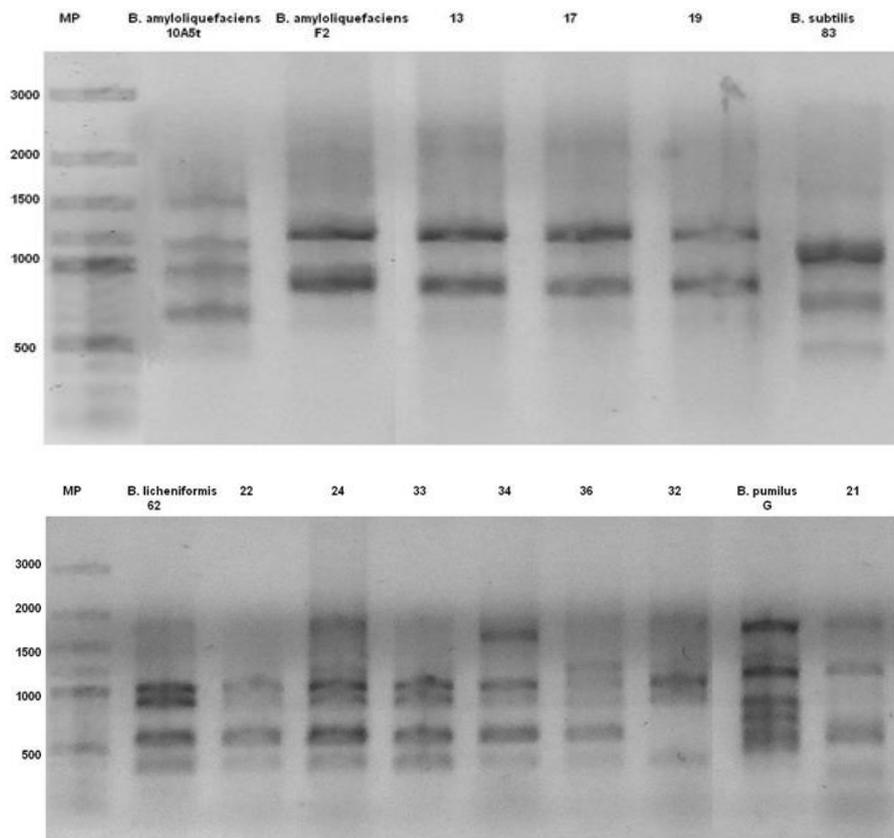


Figura 10: Comparación de perfiles de RAPD de aislamientos obtenidos de diferentes muestras con cepas de referencia. Se muestra arriba de cada carril el nombre de la cepa patrón o el número de aislamiento estudiado. MP corresponde al marcador de peso molecular utilizado. No se muestra el control negativo sin ADN realizado. Los aislamientos 22, 24, 33, 34 y 36 corresponden a *Bacillus licheniformis*; 13, 17 y 19 a *Bacillus amyloliquefaciens*, 21 a *Bacillus pumilus*.

En la tabla 3 se muestran los aislamientos identificados por secuenciación del gen 16S rADN y comparación con secuencias presentes en base de datos. Aquellos que presentaron una identidad < 97% no se los pudo identificar a nivel de especie debido a que las secuencias obtenidas fueron de mala calidad.

Si bien muchas de las secuencias bacterianas del gen 16S rADN analizadas pudieron ser asignadas a nivel de especie, se podría haber confirmado este resultado por secuenciación de otros genes constitutivos como el *rpoB* o *gyrA*. Esta confirmación pudo haber sido de gran interés ya que algunas de las especies del género *Bacillus* son muy cercanas filogenéticamente.

En la tabla 4 se muestran los ocho aislamientos obtenidos que podrían significar una amenaza para la industria. Estos aislamientos termodúricos y esporulados fueron seleccionados por su capacidad de producir enzimas de deterioro y de adherirse al acero inoxidable. La eficiencia para formar biofilms en acero con leche como matriz fue diferente para los distintos aislamientos pero todas ellas fueron capaces de producir enzimas proteolíticas y provocar la coagulación de leche.

Tabla 3: Aislamientos identificados por secuenciación del gen 16S rADN y su porcentaje de identidad comparado con base de datos.

Aislamiento	Identificación	% de identidad
7	<i>Bacillus</i> sp.	< 97% *
8	<i>B. subtilis</i>	98%
16	<i>B. safensis</i>	100%
19	<i>B. amyloliquefaciens</i>	99%
21	<i>B. pumilus</i>	99%
24	<i>B. licheniformis</i>	99%
25	<i>B. pumilus</i>	100%
28	<i>B. pumilus</i>	100%
47	<i>Bacillus</i> sp.	< 97%*
48	<i>B. amyloliquefaciens</i>	100%
54	<i>B. subtilis</i>	100%
56	<i>B. megaterium</i>	99%

*Aislamientos que no se los pudo identificar a nivel de especie debido a secuencias de mala calidad.

Tabla 4: Resumen de los aislamientos que presentaron mayor potencial de deterioro.

Aislamiento	Identificación	I.B poliestireno	I.B acero inoxidable UHT	Coagulación	Proteólisis (relación halo/colonia)	Lipólisis (relación halo/colonia)
8	<i>B. subtilis</i> (100%)	1,867	4,16	+	1,39	1,59
19	<i>B. amyloliquefaciens</i> (99%)	1,837	4,02	+	1,06	1,45
21	<i>B. pumilus</i> (99%)	1,757	1,3	+	2,98	2,10
25	<i>B. pumilus</i> (100%)	1,975	1,83	+	2,29	2,30
28	<i>B. pumilus</i> (100%)	1,929	0,716	+	2,26	1,75
47	<i>Bacillus</i> sp. (<97%)	2,861	2,0	+	2,32	1,37
48	<i>B. amyloliquefaciens</i> (100%)	2,514	2,95	+	2,28	1,41
56	<i>B. megaterium</i> (99%)	1,792	1,92	+	2,16	1,0

5. CONCLUSIONES

Se logró caracterizar la microflora termodúrica con mayor potencial de deterioro obtenida de leche cruda de diferentes tambos de Uruguay.

El recuento de microorganismos aerobios termodúricos mesófilos, termófilos y psicrótrofos fue generalmente bajo en los distintos establecimientos lecheros evaluados a lo largo del año 2017. A pesar de ello, se notó que el recuento de estas bacterias mantuvo un valor constante a lo largo del año lo que indicaría que la microflora termodúrica es un contaminante constante presente en leche cruda. Sin embargo, se observó cierta variabilidad de esta microflora en cuanto a su capacidad proteolítica entre los distintos productores en los distintos meses, lo cual podría deberse a diversos factores propios de cada productor, como la rutina de ordeño y limpieza del tambo.

Se pudo observar que el 45% de los aislamientos termodúricos mesófilos evaluados exhibieron la capacidad de producir enzimas proteolíticas y lipolíticas, a diferencia de aquellos termófilos que mostraron esta capacidad en su totalidad y los microorganismos psicrótrofos en un 60%. En los meses de mayo y julio la cantidad de aislamientos termodúricos proteolíticos y lipolíticos fue mayor. Sin embargo, los aislamientos obtenidos de las muestras procesadas en setiembre y noviembre, a pesar de ser pocos, exhibieron una capacidad proteolítica y/o lipolítica mayor a los aislados en el primer semestre del año 2017. La producción de estas enzimas termoestables por microorganismos termodúricos y esporulados son de interés a nivel industrial ya que podrían provocar un potencial deterioro en los productos obtenidos.

Se logró evaluar también el potencial de adhesión, sobre diferentes matrices y sustratos, de aquellos aislamientos con mayor potencial de deterioro en cuanto a la producción de enzimas. El 54% y 8% de los aislamientos fueron capaces de adherirse al poliestireno con media y buena capacidad de adhesión respectivamente. La mayoría de los aislamientos evaluados sobre acero inoxidable 304/316 como sustrato, utilizando leche y caldo TS como matrices, mostraron ser potencialmente formadores de biofilm. Sin embargo, se notó una disminución en cuanto a la capacidad de adhesión cuando la matriz es leche. Al menos 7 de los 45 aislamientos de microorganismos termodúricos y esporulados seleccionados serían capaces de adherirse a las superficies de la industria láctea en presencia de leche formando biofilm y producir enzimas proteolíticas capaces de coagular la leche, lo que implicaría su posible rol como contaminantes de deterioro de productos lácteos. Estos aislamientos corresponden en su mayoría a microorganismos mesófilos siendo uno de ellos psicrótrofo. Este último es de crucial importancia ya que presenta el potencial de producir enzimas de deterioro a temperaturas de refrigeración pudiendo afectar la calidad del producto final.

Las especies encontradas corresponden al género *Bacillus*, siendo *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus* y *B. megaterium* las que presentaron mayor potencial de deterioro relacionado con la producción de enzimas proteolíticas

y/o lipolíticas y a su capacidad de adhesión en acero inoxidable. A su vez, se encontraron otras especies de este género correspondientes a *B. safensis* y *B. licheniformis*, capaces de producir enzimas proteolíticas y lipolíticas pero a las que no se les estudió la capacidad de adhesión en acero inoxidable pero sí en poliestireno.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Aires-Barros, M. R., Taipa, M. A., & Cabral, J. M. S. (1994). Isolation and purification of lipases. *Lipases—their structure, biochemistry and application*. Cambridge University Press, Cambridge, 243-270.
2. Alais, C. (1985). *Ciencia de la leche: principios de técnica lechera*. Reverté.
3. Asker, M. M., Mahmoud, M. G., El Shebwy, K., & el Aziz, M. S. A. (2013). Purification and characterization of two thermostable protease fractions from *Bacillus megaterium*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 11(2), 103-109.
4. Auger, S., Krin, E., Aymerich, S., & Gohar, M. (2006). Autoinducer 2 affects biofilm formation by *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology*, 72(1), 937-941.
5. Barnes, L. M., Lo, M. F., Adams, M. R., & Chamberlain, A. H. L. (1999). Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. *Applied and environmental microbiology*, 65(10), 4543-4548.
6. Bower, C. K., McGuire, J., & Daeschel, M. A. (1996). The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. *Trends in Food Science & Technology*, 7(5), 152-157.
7. Bremer, P., Seale, B., Flint, S., & Palmer, J. (2009). Biofilms in dairy processing. In *Biofilms in the food and beverage industries*(pp. 396-431).
8. Brooks, J. D., & Flint, S. H. (2008). Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. *International journal of food science & technology*, 43(12), 2163-2176.
9. Bryers, J. D. (1987). Biologically active surfaces: processes governing the formation and persistence of biofilms. *Biotechnology Progress*, 3(2), 57-68.
10. Buehner, K. P., Anand, S., & Djira, G. D. (2015). Prevalence of thermophilic bacteria and spores in nonfat dry milk powders of Midwest origin. *Journal of dairy science*, 98(5), 2861-2866.

11. Buehner, K. P., Anand, S., & Garcia, A. (2014). Prevalence of thermophilic bacteria and spores on 10 Midwest dairy farms. *Journal of dairy science*, 97(11), 6777-6784.
12. 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(3), 1012-1018.
13. Burgess, S. A., Lindsay, D., & Flint, S. H. (2010). Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *International journal of food microbiology*, 144(2), 215-225.
14. Castonguay, M. H., Van der Schaaf, S., Koester, W., Krooneman, J., Van der Meer, W., Harmsen, H., & Landini, P. (2006). Biofilm formation by *Escherichia coli* is stimulated by synergistic interactions and co-adhesion mechanisms with adherence-proficient bacteria. *Research in Microbiology*, 157(5), 471-478.
15. Celestino, E. L., Iyer, M., & Roginski, H. (1997). Reconstituted UHT-treated milk: Effects of raw milk, powder quality and storage conditions of UHT milk on its physico-chemical attributes and flavour. *International Dairy Journal*, 7(2-3), 129-140.
16. Celestino, E. L., Iyer, M., & Roginski, H. (1997). The effects of refrigerated storage of raw milk on the quality of whole milk powder stored for different periods. *International Dairy Journal*, 7(2-3), 119-127.
17. Chen, L. D. R. M., Daniel, R. M., & Coolbear, T. (2003). Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International dairy journal*, 13(4), 255-275.
18. Chen, L., Coolbear, T., & Daniel, R. M. (2004). Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus* sp. isolated from milk powder production lines. *International dairy journal*, 14(6), 495-504.
19. Christiansen, P., Nielsen, E. W., Vogensen, F. K., Brogren, C. H., & Ardö, Y. (2006). Heat resistance of *Lactobacillus paracasei* isolated from semi-hard cheese made of pasteurised milk. *International dairy journal*, 16(10), 1196-1204.

20. Codex Alimentarius (1999). Codex Standard 206-1999. GENERAL STANDARD FOR THE USE OF DAIRY TERMS. CODEX STAN 206-1999.
21. Collins, E. B. (1981). Heat resistant psychrotrophic microorganisms. *Journal of Dairy Science*, 64(1), 157-160.
22. Coorevits, A., De Jonghe, V., Vandroemme, J., Reekmans, R., Heyrman, J., Messens, W., ... & Heyndrickx, M. (2008). Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. *Systematic and Applied Microbiology*, 31(2), 126-140.
23. Cox, J. M. (1993). The psignificance of psychrotrophic pseudomonads in dairy products. *Aust. J. Dairy Technol.*, 48, 108-113.
24. Crielly, E.M., Logan, N.A. and Anderton, A. (1994) Studies on the Bacillus flora of milk and milk products. *J Appl Bacteriol* 77, 256–263.
25. Cromie, S. (1992). Psychrotrophs and their enzyme residues in cheese milk. *Aust. J. Dairy Technol.*, 47, 96-100.
26. Datta, N., & Deeth, H. C. (2003). Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. *LWT-Food Science and Technology*, 36(2), 173-182.
27. De Jonghe, V., Coorevits, A., De Block, J., Van Coillie, E., Grijspeerdt, K., Herman, L., ... & Heyndrickx, M. (2010). Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. *International journal of food microbiology*, 136(3), 318-325.
28. Deeth, H. C., & Fitz-Gerald, C. H. (2006). Lipolytic enzymes and hydrolytic rancidity. In *Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids* (pp. 481-556). Springer, Boston, MA.
29. Dhakal, R., Chauhan, K., Seale, R. B., Deeth, H. C., Pillidge, C. J., Powell, I. B., ... & Turner, M. S. (2013). Genotyping of dairy Bacillus licheniformis isolates by high resolution melt analysis of multiple variable number tandem repeat loci. *Food microbiology*, 34(2), 344-351.
30. DIEA-MGAP. 2017. Anuario Estadístico Agropecuario 2017 [En línea]. Montevideo: MGAP. Consultado: 10 octubre 2018. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/diea-anuario2017web01a.pdf>

31. Esteban, M. D., Huertas, J. P., Fernández, P. S., & Palop, A. (2013). Effect of the medium characteristics and the heating and cooling rates on the nonisothermal heat resistance of *Bacillus sporothermodurans* IC4 spores. *Food microbiology*, 34(1), 158-163.
32. Faille, C., Lequette, Y., Ronse, A., Slomianny, C., Garénaux, E., & Guerardel, Y. (2010). Morphology and physico-chemical properties of *Bacillus* spores surrounded or not with an exosporium: consequences on their ability to adhere to stainless steel. *International journal of food microbiology*, 143(3), 125-135.
33. Flint, S. H., Bremer, P. J., & Brooks, J. D. (1997). Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control. *Biofouling*, 11(1), 81-97.
34. Flint, S. H., Brooks, J. D., & Bremer, P. J. (2000). Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. *Journal of Food Engineering*, 43(4), 235-242.
35. Flint, S., Palmer, J., Bloemen, K., Brooks, J., & Crawford, R. (2001). The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. *Journal of applied microbiology*, 90(2), 151-157.
36. Granum, P. E. (1994). *Bacillus cereus* and its toxins. *Journal of Applied Bacteriology*, 76, 61S-66S.
37. Griffiths, M. W. (1992). *Bacillus cereus* in liquid milk and other milk products. *Bull. Int. Dairy Fed.*, 275, 36-38.
38. Hill, B. M., & Smythe, B. W. (2012). Endospores of thermophilic bacteria in ingredient milk powders and their significance to the manufacture of sterilized milk products: an industrial perspective. *Food reviews international*, 28(3), 299-312.
39. Hill, B. M., & Smythe, B. W. (2012). Endospores of thermophilic bacteria in ingredient milk powders and their significance to the manufacture of sterilized milk products: an industrial perspective. *Food reviews international*, 28(3), 299-312.

40. Hinton, A. R., Trinh, K. T., Brooks, J. D., & Manderson, G. J. (2002). Thermophile survival in milk fouling and on stainless steel during cleaning. *Food and bioproducts processing*, 80(4), 299-304.
41. Hinton, A. R. (2003). *Thermophiles and fouling deposits in milk powder plants: a thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Food Engineering and Technology at Massey University, Palmerston North, New Zealand* (Doctoral dissertation, Massey University).
42. 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(10), 4872-4883.
43. Husmark, U., & Rönner, U. (1992). The influence of hydrophobic, electrostatic and morphologic properties on the adhesion of *Bacillus* spores. *Biofouling*, 5(4), 335-344.
44. INALE (2017). Datos del Uruguay lechero [En línea]. Consultado: 18 octubre 2018. Disponible en: <http://www.inale.org/innovaportal/v/6394/4/innova.front/datos-del-uruguay-lechero.html>.
45. Klijn, N., Herman, L., Langeveld, L., Vaerewijck, M., Wagendorp, A. A., Huemer, I., & Weerkamp, A. H. (1997). Genotypical and phenotypical characterization of *Bacillus sporothermodurans* strains, surviving UHT sterilisation. *International Dairy Journal*, 7(6-7), 421-428.
46. Kmiha, S., Aouadhi, C., Klibi, A., Jouini, A., Béjaoui, A., Mejri, S., & Maaroufi, A. (2017). Seasonal and regional occurrence of heat-resistant spore-forming bacteria in the course of ultra-high temperature milk production in Tunisia. *Journal of dairy science*, 100(8), 6090-6099.
47. Knight, G. C., Nicol, R. S., & McMeekin, T. A. (2004). Temperature step changes: a novel approach to control biofilms of *Streptococcus thermophilus* in a pilot plant-scale cheese-milk pasteurisation plant. *International journal of food microbiology*, 93(3), 305-318.
48. Kramer, J. M., & Gilbert, R. J. (1989). *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. *Foodborne bacterial pathogens*, 19, 21-70.

49. Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G. O., Azevedo, V., ... & Borriss, R. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390(6657), 249.
50. Li, N., Wang, Y., You, C., Ren, J., Chen, W., Zheng, H., & Liu, Z. (2018). Variation in raw milk microbiota throughout 12 months and the impact of weather conditions. *Scientific reports*, 8(1), 2371.
51. Li, X. Z., Hauer, B., & Rosche, B. (2007). Single-species microbial biofilm screening for industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 76(6), 1255-1262.
52. Logan, N. A., & Vos, P. D. (2015). *Bacillus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-163.
53. Lücking, G., Stoeckel, M., Atamer, Z., Hinrichs, J., & Ehling-Schulz, M. (2013). Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *International journal of food microbiology*, 166(2), 270-279.
54. Lund, T., & Granum, P. E. (1997). Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus*. *Microbiology*, 143(10), 3329-3336.
55. Mallet, A., Guéguen, M., Kauffmann, F., Chesneau, C., Sesboué, A., & Desmasures, N. (2012). Quantitative and qualitative microbial analysis of raw milk reveals substantial diversity influenced by herd management practices. *International Dairy Journal*, 27(1-2), 13-21.
56. Marchand, S., Vandriesche, G., Coorevits, A., Coudijzer, K., De Jonghe, V., Dewettinck, K., ... & De Block, J. (2009). Heterogeneity of heat-resistant proteases from milk *Pseudomonas* species. *International Journal of Food Microbiology*, 133(1-2), 68-77.
57. Masiello, S. N., Martin, N. H., Watters, R. D., Galton, D. M., Schukken, Y. H., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2014). Identification of dairy farm management practices associated with the presence of psychrotolerant sporeformers in bulk tank milk¹. *Journal of dairy science*, 97(7), 4083-4096.
58. Matta, H., & Punj, V. (1999). Isolation and identification of lipolytic, psychrotrophic, spore forming bacteria from raw milk. *International Journal of Dairy Technology*, 52(2), 59-62.

59. McHugh, A. J., Feehily, C., Hill, C., & Cotter, P. D. (2017). Detection and enumeration of spore-forming bacteria in powdered dairy products. *Frontiers in microbiology*, 8, 109
60. Miller, R. A., Kent, D. J., Watterson, M. J., Boor, K. J., Martin, N. H., & Wiedmann, M. (2015). Spore populations among bulk tank raw milk and dairy powders are significantly different. *Journal of dairy science*, 98(12), 8492-8504.
61. Moreno, E. 2011. Evaluación de microorganismo termodúricos y principales fuentes de contaminación en el tambo. Tesis de grado. Uruguay, Facultad de Agronomía, Universidad de la República.
62. MUIR, D. D. (1996). The shelf-life of dairy products: 4. Intermediate and long life dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 49(4), 119-124.
63. Murphy, P. M., Lynch, D., & Kelly, P. M. (1999). Growth of thermophilic spore forming bacilli in milk during the manufacture of low heat powders. *International Journal of Dairy Technology*, 52(2), 45-50.
64. O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 49-79.
65. Pagedar, A., Singh, J., & Batish, V. K. (2010). Surface hydrophobicity, nutritional contents affect *Staphylococcus aureus* biofilms and temperature influences its survival in preformed biofilms. *Journal of basic microbiology*, 50(S1), S98-S106.
66. Parkar, S. G., Flint, S. H., & Brooks, J. D. (2003). Physiology of biofilms of thermophilic bacilli—potential consequences for cleaning. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(9), 553-560.
67. 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(6), 901-908.
68. Pignatelli, M., Moya, A., & Tamames, J. (2009). EnvDB, a database for describing the environmental distribution of prokaryotic taxa. *Environmental Microbiology Reports*, 1(3), 191-197.

69. Pinto, C. L., Souza, L. V., Meloni, V. A., Batista, C. S., Silva, R., Martins, E. M., ... & Martins, M. L. (2018). Microbiological quality of Brazilian UHT milk: Identification and spoilage potential of spore-forming bacteria. *International Journal of Dairy Technology*, 71(1), 20-26.
70. Priest, F. G. (1977). Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriological reviews*, 41(3), 711.
71. Quigley, L., O'sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS microbiology reviews*, 37(5), 664-698.
72. Reginensi, S. M., González, M. J., Olivera, J. A., Sosa, M., Juliano, P., & Bermudez, J. (2011). RAPD-based screening for spore-forming bacterial populations in Uruguayan commercial powdered milk. *International journal of food microbiology*, 148(1), 36-41.
73. 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(1), 75-79.
74. 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(1-2), 45-61.
75. 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(2), 235-243.
76. Rosmaninho, R., & Melo, L. F. (2006). Calcium phosphate deposition from simulated milk ultrafiltrate on different stainless steel-based surfaces. *International Dairy Journal*, 16(1), 81-87.
77. Rowe, M. T., & Gilmour, A. (1982). Growth, enzyme production and changes in oxygen tension occurring during batch cultivation of psychrotrophic *Pseudomonas fluorescens* strains. *Milchwissenschaft= Milk science international*.

78. Sadiq, F. A., Li, Y., Liu, T., Flint, S., Zhang, G., & He, G. (2016). A RAPD based study revealing a previously unreported wide range of mesophilic and thermophilic spore formers associated with milk powders in China. *International journal of food microbiology*, 217, 200-208.
79. Sandu, C., & Singh, R. K. (1991). Energy increase in operation and cleaning due to heat-exchanger fouling in milk pasteurization. *Food technology (USA)*.
80. Santos, M. V., Ma, Y., Caplan, Z., & Barbano, D. M. (2003). Sensory Threshold of Off-Flavors Caused by Proteolysis and Lipolysis in Milk1. *Journal of dairy science*, 86(5), 1601-1607.
81. Scheldeman, P., Goossens, K., Rodriguez-Diaz, M., Pil, A., Goris, J., Herman, L., ... & Heyndrickx, M. (2004). *Paenibacillus lactis* sp. nov., isolated from raw and heat-treated milk. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(3), 885-891.
82. Scheldeman, P., Herman, L., Foster, S., & Heyndrickx, M. (2006). *Bacillus sporothermodurans* and other highly heat-resistant spore formers in milk. *Journal of Applied Microbiology*, 101(3), 542-555.
83. Scheldeman, P., Pil, A., Herman, L., De Vos, P., & Heyndrickx, M. (2005). Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1480-1494.
84. Schembri, M. A., Kjærgaard, K., & Klemm, P. (2003). Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Molecular microbiology*, 48(1), 253-267.
85. Scott, 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(2), 109-117.
86. Shaheen, R., Svensson, B., Andersson, M. A., Christiansson, A., & Salkinoja-Salonen, M. (2010). Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. *Food microbiology*, 27(3), 347-355.
87. Sharma, A., Jana, A. H., & Chavan, R. S. (2012). Functionality of milk powders and milk-based powders for end use applications—a

- review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(5), 518-528.
88. Soni, A., Oey, I., Silcock, P., & Bremer, P. (2016). Bacillus spores in the food industry: A review on resistance and response to novel inactivation technologies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(6), 1139-1148.
89. Storgards, E., Simola, H., Sjöberg, A. M., & Wirtanen, G. (1999). Hygiene of gasket materials used in food processing equipment part 1: new materials. *Food and Bioproducts Processing*, 77(2), 137-145.
90. Sutherland, A. D., & Murdoch, R. (1994). Seasonal occurrence of psychrotrophic Bacillus species in raw milk, and studies on the interactions with mesophilic Bacillus sp. *International Journal of Food Microbiology*, 21(4), 279-292.
91. Tang, X., Flint, S. H., Bennett, R. J., & Brooks, J. D. (2010). The efficacy of different cleaners and sanitisers in cleaning biofilms on UF membranes used in the dairy industry. *Journal of Membrane Science*, 352(1-2), 71-75.
92. Teh, K. H., Flint, S., Palmer, J., Andrewes, P., Bremer, P., & Lindsay, D. (2012). Proteolysis produced within biofilms of bacterial isolates from raw milk tankers. *International journal of food microbiology*, 157(1), 28-34.
93. Teh, K. H., Flint, S., Palmer, J., Lindsay, D., Andrewes, P., & Bremer, P. (2011). Thermo-resistant enzyme-producing bacteria isolated from the internal surfaces of raw milk tankers. *International Dairy Journal*, 21(10), 742-747.
94. Teh, K. H., Lindsay, D., Palmer, J., Andrewes, P., Bremer, P., & Flint, S. (2013). Lipolysis within single culture and co-culture biofilms of dairy origin. *International journal of food microbiology*, 163(2-3), 129-135.
95. Van Houdt, R., & Michiels, C. W. (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of applied microbiology*, 109(4), 1117-1131.

96. van Netten, P., & Kramer, J. M. (1992). Media for the detection and enumeration of *Bacillus cereus* in foods: a review. *International journal of food microbiology*, 17(2), 85-99.
97. VanderKelen, J. J., Mitchell, R. D., Laubscher, A., Black, M. W., Goodman, A. L., Montana, A. K., ... & Kitts, C. L. (2016). Typing and tracking Bacillaceae in raw milk and milk powder using pyroprinting. *Journal of dairy science*, 99(1), 146-151.
98. Verran, J., & Whitehead, K. (2005). Factors affecting microbial adhesion to stainless steel and other materials used in medical devices. *The International journal of artificial organs*, 28(11), 1138-1145.
99. VINTER, V. (1969). Physiology and biochemistry of sporulation. In "The Bacterial Spore"(GW Gould and A. Hurst, eds.).
100. Vithanage, N. R., Yeager, T. R., Jadhav, S. R., Palombo, E. A., & Datta, N. (2014). Comparison of identification systems for psychrotrophic bacteria isolated from raw bovine milk. *International journal of food microbiology*, 189, 26-38.
101. Walstra, P., Geurts, T. J., Noomen, A. C., Jellema, A. C., & Van Boekel, M. A. J. (2001). *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos* (No. 637.1 W169c Ej. 1 019044). Editorial Acribia.
102. Warnecke, F. (2001). *The ecology of thermophilic bacilli of milk powder processing plants* (Doctoral dissertation, University of Waikato).
103. Watterson, M. J., Kent, D. J., Boor, K. J., Wiedmann, M., & Martin, N. H. (2014). Evaluation of dairy powder products implicates thermophilic sporeformers as the primary organisms of interest. *Journal of dairy science*, 97(4), 2487-2497.
104. Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2), 697-703.
105. Wirtanen, G., Husmark, U., & Mattila-Sandholm, T. (1996). Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. *Journal of Food Protection*, 59(7), 727-733.

106. Zain, S. N. M., Flint, S. H., Bennett, R., & Tay, H. S. (2016). Characterisation and biofilm screening of the predominant bacteria isolated from whey protein concentrate 80. *Dairy Science & Technology*, 96(3), 285-295.

7. ANEXO

Tabla 1: Aislamientos evaluados con su respectivo resultado e identificación.

Aislamiento	Identificación	I.B poliestireno	I.B acero inoxidable	I.B acero inoxidable UHT	Coagulación	Proteólisis (relación halo/colonia)	Lipólisis (relación halo/colonia)
4	<i>B. safensis</i> Grupo 5	0,746	N.D.	N.D.	N.D.	1,67	1,32
7	<i>Bacillus</i> sp. (<97%) Grupo 6	0,995	N.D.	N.D.	N.D.	1,54	1,20
8	<i>B. subtilis</i> (100%)	1,867	11,9	4,16	+	1,39	1,59
11	<i>Bacillus</i> sp. Grupo 6	1,446	N.D.	N.D.	N.D.	1,36	1,09
13	<i>B. amyloliquefaciens</i> Grupo 3	0,939	N.D.	N.D.	N.D.	2,71	1,6
16	<i>B. safensis</i> (100%) Grupo 5	0,799	N.D.	N.D.	N.D.	1,46	1,6
17	<i>B. amyloliquefaciens</i> Grupo 3	1,437	N.D.	N.D.	N.D.	1,03	1,39
18	<i>B. licheniformis</i> Grupo 1	0,75	N.D.	N.D.	N.D.	1,43	1,22
19	<i>B. amyloliquefaciens</i> (99%) Grupo 3	1,837	13,4	4,02	+	1,06	1,45
21	<i>B. pumilus</i> (99%) Grupo 4	1,757	2,04	1,3	+	2,98	2,10
22	<i>B. licheniformis</i> Grupo 1	0,943	N.D.	N.D.	N.D.	1,61	1,22
24	<i>B. licheniformis</i> (99%) Grupo 1	1,488	N.D.	N.D.	N.D.	1,36	1,39
25	<i>B. pumilus</i> (100%) Grupo 4	1,975	4,56	1,83	+	2,29	2,30
28	<i>B. pumilus</i> (100%) Grupo 4	1,929	0,816	0,716	+	2,26	1,75
32	<i>B. subtilis</i> Grupo 2	1,291	N.D.	N.D.	N.D.	1,43	1,61
33	<i>B. licheniformis</i> Grupo 1	1,2	N.D.	N.D.	N.D.	1,72	1,68
34	<i>B. licheniformis</i> Grupo 1	0,7195	N.D.	N.D.	N.D.	1,46	1,56
36	<i>B. licheniformis</i> Grupo 1	1,299	N.D.	N.D.	N.D.	1,41	1,99
39	<i>B.</i>	1,249	N.D.	N.D.	N.D.	1,61	1,45

	<i>amyloliquefaciens</i>						
	Grupo 3						
47	<i>Bacillus</i> sp (< 97%)	2,861	1,91	2,0	+	2,32	1,37
48	<i>B.</i> <i>amyloliquefaciens</i> (100%)	2,514	1,19	2,95	+	2,28	1,41
	Grupo 3						
49	<i>B. safensis</i>	1,496	N.D.	N.D.	N.D.	2,25	2,40
	Grupo 5						
53	<i>Bacillus</i> sp	0,729	N.D.	N.D.	N.D.	1,49	1,02
54	<i>B. subtilis</i> (100%)	0,814	N.D.	N.D.	N.D.	1,20	2,06
	Grupo 2						
55	<i>Bacillus</i> sp	1,022	N.D.	N.D.	N.D.	2,27	2,20
56	<i>B. megaterium</i> (99%)	1,792	6,74	1,92	+	2,16	1,0

N.D: No determinado. +: Ensayo de coagulación positivo.

Tabla 2: Características fenotípicas, identificación y procedencia de los aislamientos evaluados.

Aislamiento	Identificación	Morfología de colonia	Tinción de Gram	Procedencia	Crecimiento
4	<i>B. safensis</i> Grupo 5	Circular, mediana, brillante, bordes lisos	Bastón Gram + esporulado	Productor 1	Mesófilo
7	<i>Bacillus</i> sp. (<97%) Grupo 6	Circular, grande, brillante, bordes lisos	Bastón Gram + esporulado	Productor 2	Mesófilo
8	<i>B. subtilis</i> (100%)	Irregular, mediana, brillante	Bastón corto Gram + esp.	Productor 2	Mesófilo
11	<i>Bacillus</i> sp. Grupo 6	Irregular, muy grande, opaca	Bastón Gram + esp.	Productor 4	Mesófilo
13	<i>B. amyloliquefaciens</i> Grupo 3	Irregular, mediana, opaca	N.D.	Productor 1	Psicrótrofo
16	<i>B. safensis</i> (100%) Grupo 5	Irregular, mediana, opaca	N.D.	Productor 3	Psicrótrofo
17	<i>B. amyloliquefaciens</i> Grupo 3	Irregular, invasora, opaca	Bastón Gram + esp.	Productor 1	Mesófilo
18	<i>B. licheniformis</i> Grupo 1	Irregular, mediana, producción exopolisacárido	Bastón Gram + esp.	Productor 1	Mesófilo
19	<i>B. amyloliquefaciens</i> (99%) Grupo 3	Irregular, invasora, opaca	Bastón Gram + esp.	Productor 2	Mesófilo
21	<i>B. pumilus</i> (99%) Grupo 4	Circular, mediana, brillante, bordes lisos	Bastón Gram + esp.	Productor 2	Mesófilo
22	<i>B. licheniformis</i> Grupo 1	Circular, grande, brillante, bordes lisos	Bastón Gram + esp.	Productor 2	Mesófilo
24	<i>B. licheniformis</i> (99%) Grupo 1	Circular, grande, centro brillante, bordes opacos	Bastón Gram + esp.	Productor 3	Mesófilo
25	<i>B. pumilus</i> (100%) Grupo 4	Circular, mediana, brillante, bordes lisos	Bastón Gram + esp.	Productor 3	Mesófilo
28	<i>B. pumilus</i> (100%) Grupo 4	Circular, mediana, brillante, bordes lisos	Bastón Gram + esp.	Productor 4	Mesófilo
32	<i>B. subtilis</i> Grupo 2	Irregular, mediana, opaca	Bastón Gram + esp.	Productor 4	Mesófilo
33	<i>B. licheniformis</i> Grupo 1	Circular, mediana, opaca, bordes lisos	Bastón Gram +	Productor 3	Termófilo
34	<i>B. licheniformis</i> Grupo 1	Irregular, mediana, producción exopolisacárido	Bastón Gram +	Productor 2	Termófilo
36	<i>B. licheniformis</i> Grupo 1	Circular, grande, opaca, bordes lisos	Bastón Gram +	Productor 4	Termófilo

39	<i>B. amyloliquefaciens</i> Grupo 3	Circular, grande, brillosa	N.D.	Productor 2	Psicrótrofo
47	<i>Bacillus</i> sp (< 97%)	Circular, mediana, brillosa	Bastón corto Gram + esp.	Productor 4	Mesófilo
48	<i>B. amyloliquefaciens</i> (100%) Grupo 3	Irregular, grande, producción exopolisacárido	Bastón corto Gram + esp.	Productor 4	Mesófilo
49	<i>B. safensis</i> Grupo 5	Circular, pequeña, brillosa	Bastón corto Gram + esp.	Productor 4	Mesófilo
53	<i>Bacillus</i> sp	Circular, mediana, brillosa, bordes lisos	Bastón Gram + esp.	Productor 2	Mesófilo
54	<i>B. subtilis</i> (100%) Grupo 2	Irregular, mediana, producción exopolisacárido	Bastón Gram + esp.	Productor 4	Termófilo
55	<i>Bacillus</i> sp	Circular, pequeña, brillosa, bordes lisos	Bastón Gram + esp.	Productor 4	Mesófilo
56	<i>B. megaterium</i> (99%)	Circular, mediana, opaca, bordes lisos	Bastón grande Gram + esp.	Productor 3	Psicrótrofo