

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA

ESTUDIO DE LA MICROFLORA PRESENTE EN LECHE Y QUESOS  
ARTESANALES

por

Analía CABRERA OLEAURRE

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

MONTEVIDEO

URUGUAY

2019

Tesis aprobada por:

Director: \_\_\_\_\_

MSc. Lic. Marcela Joan González Ramos

\_\_\_\_\_

PhD. MSc. DMTV Stella Maris Reginensi Rivera

\_\_\_\_\_

Ing Agr. MBA. Carlos José Mattos Dahlquist

Fecha: 6 de setiembre de 2019

Autora: \_\_\_\_\_

Analía Cabrera Oleaurre

## AGRADECIMIENTOS

El transitar por esta carrera me ha dado, no solo conocimientos y experiencias, sino aún más importante para mí, la posibilidad de conocer personas maravillosas que me han ayudado a crecer como persona, y ver aspectos de la vida de manera diferente. Sin duda, la lista de agradecimiento es mucho más grande que la que pudiera haber imaginado al comenzar esta carrera.

Agradezco a Dios en primer lugar por su guía, fortaleza en los momentos difíciles y las bendiciones a lo largo de la carrera.

Agradezco a mis padres, Nelson Cabrera y Nilda Oleaurre, por todo el apoyo y paciencia a lo largo de esta carrera. Nunca hubiera llegado a la meta sin sus consejos y empeño en alentarme y acompañarme. También a mis hermanas Daiana y Carina, por acompañarme estos años.

A Ariel, mi esposo, por su apoyo, ánimo y compañía durante este camino. Gracias por estar siempre.

A mis tutoras, Marcela y Stella, así como también a Jorge y Nancy, por su apoyo, y tiempo dedicado a guiarme y enseñarme a realizar este trabajo.

A los productores involucrados en este trabajo por su disposición y tiempo.

Alicia y Antonella, amigas y compañeras que hicieron más fácil el vivir lejos de casa. Son mi familia.

Vale, Sebas, Pepe y Coco, los mejores amigos y compañeros de estudios. Agradecida de haberlos conocido.

Tía Sixta, por su apoyo y compañía durante el primer año.

Inés, Eugenia, Rocío, Paula y Magui, Compañeros de cuarto año.

Evelyn, Mauricio, Laura, Verónica, Roxana, Daisy, Conjunto Adventicanto, no forman parte de la facultad, pero su apoyo, compañía y ánimo recibido por ustedes hicieron más agradable y fácil este camino.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u> .....	1
1.1 OBJETIVOS .....	2
1.1.1 <u>Objetivo general</u> .....	2
1.1.2 <u>Objetivos específicos</u> .....	2
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u> .....	3
2.1 QUESERÍA ARTESANAL EN EL URUGUAY.....	3
2.2 ELABORACIÓN DE QUESOS.....	3
2.2.1 <u>Queso Colonia</u> .....	4
2.3 DEFECTO DE HINCHAZÓN TARDÍA EN QUESOS MADURADOS.....	4
2.3.1 <u>Medidas para evitar la hinchazón tardía en el queso</u> .....	5
2.3.2 <u>Principales fuentes de contaminación de Clostridium</u> .....	8
2.4 CARACTERIZACIÓN DEL GÉNERO CLOSTRIDIUM .....	9
2.4.1 <u>Principales especies de Clostridium spp. en la leche</u> .....	10
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....	12
3.1 DESCRIPCIÓN DE RECOLECCIÓN DE DATOS .....	12
3.2 MUESTREO .....	12
3.3 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS .....	13
3.3.1 <u>Procesamiento de muestras de leche</u> .....	13
3.3.2 <u>Procesamiento de muestras de queso</u> .....	14
3.4 RECuentos y registro de datos.....	14

3.5 PRUEBAS MOLECULARES .....	14
3.5.1 <u>Aislamiento de ADN</u> .....	14
3.5.2 <u>Análisis de multiplex-PCR</u> .....	15
3.5.3 <u>Identificación de aislamiento por análisis de la secuencia del</u> <u>16S rADN</u> .....	15
3.5.4 <u>Análisis de diversidad genotípica por rep-PCR</u> .....	16
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u> .....	17
4.1 RECIENTOS .....	17
4.1.1 <u>Recuentos en leche</u> .....	17
4.1.2 <u>Recuento de esporulados anaerobios en leche cruda y quesos</u> <u>elaborados a partir de la misma</u> .....	22
4.2 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LOS AISLAMIENTOS DE <i>Clostridium</i> spp.....	27
4.2.1 <u>Caracterización genotípica</u> .....	27
4.2.2 <u>Identificación por multiplex-PCR</u> .....	29
5. <u>CONCLUSIONES</u> .....	33
6. <u>RESUMEN</u> .....	34
7. <u>SUMMARY</u> .....	35
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	36

## LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Descripción de recolección de datos.....	12
2. Esquema de recolección de muestras.....	12
3. Identificación de aislamiento por secuenciación del gen 16S ADN.....	30

Figura No.	
1. Recuentos de UFC/ml y esporas/l en leche por estaciones del año.....	17
2. Variaciones estacionales de recuentos de UFC/ml y esporas/l en leche.....	21
3. Recuento de esporulados anaerobios en leche cruda y quesos por productor según estación de año.....	23
4. Recuento de esporas en quesos elaborados a partir de leche cruda o termizada.....	26
5. Perfiles de bandas obtenidas con rep-PCR con el cebador GTG5.....	28
6. Identificación de aislamientos por multiplex-PCR.....	29
7. Porcentaje de aislamientos identificados según especie en el total de muestras de leche y queso.....	31
8. Distribución estacional de los aislamientos de <i>Clostridium</i> spp.....	32

## 1. INTRODUCCIÓN

La producción lechera en Uruguay se realiza en el 5% del territorio nacional, produciendo leche que alimenta anualmente a 20 millones de personas (en base a una taza de leche diaria), el equivalente a 7 veces Uruguay (INALE, 2018). Es así como la lechería es el sector agropecuario de mayor ingreso de exportaciones por hectárea, siendo el séptimo país exportador de leche a nivel mundial (INALE, 2018).

En el país hay aproximadamente 3900 productores lecheros, de los cuales el 73% envía la leche a la industria, mientras que el restante 27% produce quesos artesanales en el propio establecimiento (INALE, 2018).

Las necesidades de las industrias lácteas se basan principalmente en el procesamiento de leche de calidad para ofrecer a los consumidores productos lácteos confiables desde el punto de vista de la calidad y la inocuidad.

Una de las barreras hacia la obtención de quesos de calidad es la presencia de alteraciones o defectos de textura y sabor provocados por fermentaciones no deseadas. En particular, el defecto de “hinchazón tardía” en quesos, provoca grandes pérdidas económicas para los productores. Este defecto se caracteriza por una hinchazón anormal de la masa del queso, acompañada de mal olor y sabores desagradables. Este defecto es provocado por la fermentación butírica resultante de la presencia de esporas de *Clostridium*. Este problema afecta la calidad de quesos semiduros y duros en los cuales el ambiente anaerobio, logrado por largos períodos de maduración, permite la germinación de las esporas.

Este trabajo busca evaluar el comportamiento estacional de varios grupos microbianos presentes en leche cruda proveniente de cuatro establecimientos lecheros dedicados a la producción artesanal de quesos. Se realizó un análisis cuantitativo de las distintas poblaciones microbianas, y se estudió la composición de la población de esporas del género *Clostridium* presentes en leche cruda y en los quesos elaborados a partir de la misma. Del mismo modo se incluyeron como variables la aplicación o no de un tratamiento térmico previo de la leche, así como el efecto de distintos tiempos de maduración para los quesos.

## 1.1. OBJETIVOS

### 1.1.1. Objetivo general

Estudio de la dinámica estacional de la microflora presente en leche cruda y quesos artesanales, con énfasis en la presencia de microorganismos esporulados anaerobios.

### 1.1.2. Objetivos específicos

Analizar la microflora presente en leche cruda proveniente de cuatro queserías artesanales de la cuenca lechera sur.

Evaluar la dinámica estacional de distintos grupos microbianos presentes en leche cruda.

Cuantificar y caracterizar la población de microorganismos esporulados anaerobios en leche cruda y quesos con distintos tiempos de maduración.

Determinar el efecto del proceso de termización de la leche destinada a la producción quesera en la población de microorganismos esporulados anaerobios.



## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. QUESERÍA ARTESANAL EN EL URUGUAY

La quesería artesanal en Uruguay se remonta a la segunda mitad del siglo XIX. Según la estimación de la última Encuesta Lechera del Instituto Nacional de la Leche (INALE, 2014), existen 939 establecimientos dedicados a la quesería artesanal en todo el país, y el 80 % de ellos se ubican en los departamentos de Colonia y San José (INALE, 2014). La quesería artesanal produce y consume cerca del 5,3 % de la producción total de leche y representa el 26 % de los establecimientos lecheros del país (INALE, 2014). Los queseros artesanales son productores lecheros de pequeña a mediana escala, que poseen de 10 a 100 vacas y producen entre 100 y 3000 litros de leche diarios. Según el Decreto 65/003 del MGAP, se define queso artesanal como: “el queso elaborado con leche cruda, pasteurizada o termizada, producida en el predio, exclusivamente. Desde el punto de vista tecnológico, existen dos tipos de productores en la quesería artesanal uruguaya: los que elaboran cuajada (etapa inicial) y venden a industrias locales para realizar queso fundido; y los que elaboran queso artesanal propiamente dicho. Estos últimos producen un queso que en la mayoría de los casos no sufre modificaciones hasta llegar al consumidor final. Los principales quesos artesanales producidos en Uruguay son el Colonia, Sbrinz (queso grana o semiduro) y Danbo. La mayoría de la producción de queso artesanal se vuelca en el mercado interno.

### 2.2. ELABORACIÓN DE QUESOS

El proceso de elaboración de queso comienza con la recepción y almacenamiento de la leche, la cual puede provenir del mismo establecimiento o de otros. En las queserías artesanales se utiliza la leche cruda producida en el mismo establecimiento con o sin tratamiento previo. En algunos casos, previo a la elaboración del queso la leche es sometida a un tratamiento térmico, como la termización (62-65°C, 15 segundos) o pasteurización (72°C, 15 segundos). Una vez en la tina quesera se agregan los inóculos bacterianos específicos para cada tipo de queso, y otros componentes como: acidificadores, cuajo,  $\text{CaCl}_2$ , entre otros. Luego de la adición de todos los componentes comienza la etapa de coagulación. Durante este proceso los componentes sólidos de la leche (cuajada) se separan de los componentes líquidos (suero de leche). La cuajada es moldeada y prensada, dejando escurrir el suero hasta obtener el contenido de humedad deseado. Posteriormente se produce el salado por inmersión en salmuera, la cual varía en su concentración de sal dependiendo del tipo de queso

a elaborar, esta etapa contribuye a ralentizar la producción de ácido láctico, realza el aroma y contribuye a la preservación del queso. Es común en esta fase añadir otros ingredientes como colorantes, hierbas o especias. Finalmente se da lugar al proceso de maduración. Durante este proceso los quesos se guardan en cámaras de maduración donde se controla la humedad y temperatura, factores que influyen en desarrollo de algunos microorganismos, determinando su textura, sabor, aroma y consistencia. El tiempo de maduración puede variar según el tipo de queso desde unos días hasta meses.

### 2.2.1. Queso Colonia

Se trata de un queso de pasta semidura, donde la materia prima es la leche entera de vaca, recién ordeñada, pudiendo ser cruda, termizada, o pasteurizada. La masa se distingue por presentar ojos esféricos y brillantes de 6 a 8 mm de diámetro, los que se encuentran distribuidos uniformemente, de consistencia firme y elástica, con sabor y aroma suave. Este queso debe ser madurado por un período de 20 a 30 días aproximadamente (Borbonet 2001, Cozzano y Delgado 2003). En general, los productores de queso artesanal de hoy en día tienen como principal fuente de ingresos a este queso, que, como se reconoce internacionalmente, es originario de Uruguay (Borbonet, 2001).

## 2.3. DEFECTO DE HINCHAZÓN TARDÍA EN QUESOS MADURADOS

En la elaboración de quesos se producen dos tipos de alteraciones o defectos de textura, provocado por fermentaciones no deseadas, conocidas como hinchazón temprana y tardía del queso. La hinchazón temprana, que ocurre al principio de la maduración, se debe fundamentalmente a la proliferación de bacterias coliformes y levaduras. Los quesos presentan ojos de pequeño diámetro, de cavidad lisa y brillante (Schobitz et al., 2005).

El defecto de la hinchazón tardía se manifiesta después de semanas o meses de maduración en los quesos de pasta semidura. Se caracteriza por una hinchazón anormal, cavernosa y con mal olor, acompañada de sabores desagradables. Los microorganismos responsables son bacterias esporuladas anaerobias pertenecientes al género *Clostridium*. Estos microorganismos fermentan el ácido láctico presente en el queso, con producción de ácido butírico, dióxido de carbono e hidrógeno (Su e Ingham, 2000). Estos gases ocupan espacios dentro del queso generando "ojos" de forma irregular y tamaño variable, aunque normalmente mayores que los producidos por las bacterias coliformes en la hinchazón temprana.

Doyle et al. (2015) mencionan que este defecto, además de ser una preocupación en productos realizados a partir de leche cruda, tales como quesos artesanales, la estabilidad de las esporas frente al calor puede ocasionar problemas, incluso cuando la leche ha sido expuesta a tratamientos térmicos como la termización o la pasteurización. De hecho, los tratamientos térmicos suaves, como la termización, pueden activar la germinación de las esporas y promover la fermentación butírica. El defecto de hinchazón tardía es uno de los defectos más graves y económicamente importantes en quesos duros y semiduros. *Clostridium tyrobutyricum* es la especie más frecuentemente aislada en quesos con hinchazón tardía, aunque esporas pertenecientes a otras especies, particularmente *C. sporogenes*, *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *C. bif fermentans*, *C. perfringens* y *C. tertium*, también han sido aisladas de quesos y leche cruda (Le Bourhis et al. 2007, Feligini et al. 2014, Reindl et al. 2014).

### 2.3.1. Medidas para evitar la hinchazón tardía en el queso

La hinchazón tardía aparece durante el período de maduración de los quesos, manifestándose por una hinchazón que, en los casos más graves, puede ocasionar la ruptura de los quesos. Este fenómeno se puede producir días, semanas e incluso meses después de la elaboración. Generalmente, su detección tardía impide tomar medidas correctoras para paliar sus efectos en los lotes posteriores, de tal forma que cuando se descubre la hinchazón en un lote, posiblemente estén también afectados y sin posibilidad de recuperación los siguientes.

Para evitar la aparición de este defecto en los quesos se puede actuar a dos niveles: preventivo, con medidas a tomar en los establecimientos lecheros para minimizar la carga de esporas en la leche cruda, y paliativo, en las queserías evitando la germinación de las esporas en el queso.

Julien et al. (2008) identificaron la presencia de *Clostridium* en diversos componentes de la cadena de producción de leche, y *C. tyrobutyricum* se encontró constantemente en la leche cruda y en todos los ambientes del tambo. Las fuentes de contaminación más comunes en el tambo son el suelo, el ensilaje y otros alimentos, y las heces del animal, que se transfieren a la leche cruda por contaminación externa de la ubre durante el ordeño. De hecho, el ensilaje de mala calidad ha sido identificado como la principal fuente externa de contaminación de leche cruda por esporas de *Clostridium* (Vissers et al. 2006, 2007a, Julien et al. 2008). Cuando las vacas lecheras son alimentadas con ensilaje, las esporas se concentran en el tracto gastrointestinal del animal y

pueden contaminar la leche durante el proceso de ordeño, especialmente cuando las prácticas de higiene y ordeño son inadecuadas (Vissers et al., 2007b).

La mejor forma de evitar o minimizar la cantidad de esporas de *Clostridium* presentes en la leche cruda es prevenirla en su lugar de origen, el tambo. Para ello es necesario contar con buenas prácticas ordeño y mantenimiento de estrictas condiciones de higiene. Algunos de los factores a tener en cuenta a nivel de tambo son: contar con ensilajes de buena calidad, mantener la higiene de los animales, instalaciones, utensilios y equipo de ordeño, así como la implementación de una correcta rutina de ordeño.

En general, el crecimiento de *Clostridium* spp. en los quesos depende de las concentraciones de ácido láctico, sal, pH, contenido de humedad, temperatura y tiempo de maduración, así como también de la presencia de otros microorganismos en la leche y el queso (Brandle et al., 2016).

Las medidas paliativas se aplican fundamentalmente a nivel de quesería, e involucran varias medidas tecnológicas para evitar o disminuir el efecto de hinchazón tardía en el queso. Se pueden clasificar en tratamientos químicos o mecánicos previos de la leche, para eliminar o inhibir la germinación de esporas. A nivel industrial, tratamientos mecánicos como la microfiltración y la bactofugación, se utilizan como estrategias para remover las esporas presentes en la leche. La microfiltración consiste en hacer pasar la fracción no grasa de la leche a través de una membrana (0.8–1.8  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro) a través de la cual son permeables las proteínas, los azúcares, las sales minerales y los glóbulos de grasa pequeños. En la membrana quedan retenidas al menos el 99,5% de las esporas y bacterias presentes en la leche (Gésan-Guiziu, 2010). Este método es utilizado en leche descremada, debido a que además de las bacterias, los glóbulos grasos de mayor tamaño, también son retenidos por el filtro (Avila et al., 2014). La bactofugación es un método de eliminación física de esporas mediante una centrifugación controlada de la leche (7.000-9.000 rpm), basada en que las esporas poseen una mayor densidad respecto a la forma vegetativa (Guinee y O'Callaghan, 2010). Según Gésan-Guiziu (2010), por este método, y dependiendo de la concentración inicial, se logra eliminar un 98.7% de las esporas anaerobias presentes originalmente en la leche. A su vez, Su e Ingham (2000) estudiaron el grado de reducción de esporas por centrifugación discontinua y observaron que la reducción de esporas de *C. tyrobutyricum*, *C. sporogenes* y *C. beijerinckii* es más difícil que las de *C. butyricum*, debido a que este presenta un tamaño de espора más pequeño.

La adición de nitrato a la leche es un tratamiento químico utilizado para la inhibición de la germinación de esporas. Es una medida muy utilizada, debido a que es barato, seguro y simple (Düsterhöft y Van der Berg, 2007). La inhibición

ocurre durante el proceso de maduración, cuando bacterias reductoras de nitrato como lactobacilos y coliformes, reducen el nitrato a nitrito, el cual actúa como inhibidor de la germinación de esporas. La enzima xantina oxidasa, presente en la leche en pequeñas concentraciones, también es esencial para la efectiva reducción del nitrato a nitrito. Los tratamientos térmicos superiores a 80 °C/10 segundos inactivan la enzima, que permanece intacta a temperaturas de pasteurización (72-74 °C/20 segundos). El agregado de xantina oxidasa junto con el nitrato mejorará la efectividad. La presencia de nitrato en el queso puede inducir la formación de compuestos N-nitrosados o nitrosaminas, catalogados como sustancias potencialmente cancerígenas. Por esta razón, el uso del nitrato en la fabricación de queso está regulado por las reglamentaciones vigentes en cada país, estando prohibido su uso como aditivo en muchos países. Este método presenta también la desventaja de la capacidad de inhibición del nitrito sobre el crecimiento de las bacterias productoras de ácido propiónico, deseadas y responsables de la formación de ojos y sabores característicos en los quesos tipo suizos (Beresford et al., 2001).

El uso de lisozima es una alternativa, aunque más costosa que la bacteriostasia y menos eficaz que el nitrato. Se utiliza para prevenir el crecimiento bacteriano. Esta enzima hidroliza el peptidoglicano constituyente de la pared celular tanto de bacterias Gram positivas como negativas. La incorporación de lisozima puede ser adecuada cuando el número de esporas en la leche es bajo (<500 esporas/L). Sin embargo, en los casos con un mayor número de esporas/L no es recomendable su uso ya que la susceptibilidad a la lisozima es variable, e incluso en algunos casos pueden activar el proceso de germinación de esporas de *C. tyrobutyricum* (Bassi et al., 2015). Hay que tener en cuenta que la lisozima no inhibe la germinación de esporas sino el crecimiento de las formas vegetativas que emergen de ellas durante la maduración del queso.

Una estrategia biotecnológica para la inhibición de esporas de *Clostridium* es el uso de bacteriocinas. Estas son compuestos antimicrobianos de naturaleza proteica producidos por varios microorganismos, entre ellos las bacterias ácido lácticas. La nisina, es la única bacteriocina aprobada oficialmente para el uso en la producción de alimentos (De Arrauz et al., 2009). El uso de bacteriocinas se puede abordar de dos formas, por la adición directa de la bacteriocina previamente purificada, o por la incorporación del microorganismo que la produce. Varias especies de bacterias ácido láctica han sido descritas como productoras de bacteriocinas como *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus* (Mathot et al. 2003, Matijasic et al. 2007, Martínez-Cuesta et al. 2009, Christiansen et al. 2010). Sin embargo, su utilización en la elaboración de quesos presenta algunas desventajas ya que potencialmente pueden inhibir, no solo a

los microorganismos no deseados, sino también a los cultivos iniciadores (Matijasic et al., 2007).

Varias de estas especies productoras de bacteriocinas son conocidas como cultivos adjuntos o bacterias ácido lácticas no iniciadoras (NSLAB). Estas bacterias forman parte de la microflora nativa de la leche. Son en su mayoría, lactobacilos heterofermentativos facultativos mesófilos (*L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. pentosus* y *L. curvatus*), seguidos en orden de predominancia por lactobacilos heterofermentativos obligados (*L. fermentum*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. parabuchneri* y *L. farciminis*) entre otros (Sheehan 2013, Reginensi et al. 2016). Durante las etapas iniciales del proceso de elaboración quesera las NSLAB tiene bajo desarrollo ya que los cultivos iniciadores (SLAB) son altamente competitivos y sintetizan compuestos antagonistas que previenen o reducen el crecimiento de las NSLAB. Estas bacterias soportan los tratamientos térmicos y el ambiente estresante desarrollado durante la elaboración quesera permaneciendo en la cuajada. Sin embargo, en los primeros 10 a 20 días de maduración la elevada adaptación de las NSLAB a las condiciones hostiles del queso les permite proliferar, manteniendo un crecimiento sostenido durante los tres primeros meses y convertirse en la microflora dominante en el queso. Debido a esto, la presencia de cepas NSLAB anticlostridiales en la leche y el queso, es importante para prevenir el crecimiento de *Clostridium* spp. durante la etapa de maduración (Christiansen et al. 2005, Tuma et al. 2008).

Brandle (2016) comenta otras medidas tecnológicas como métodos alternativos al control de *Clostridium*, pero con resultados insatisfactorios con respecto a la calidad de los quesos. Ellos son: premaduración en frío, calentamiento UHT, introducción de sal directamente en la cuajada de queso, uso de peróxido de hidrógeno, uso de extractos de plantas aromáticas, y aplicación de bacteriófagos de *C. tyrobutyricum*.

### 2.3.2. Principales fuentes de contaminación de *Clostridium*

La contaminación de la leche con esporas de *Clostridium* abarca varias fases formando un ciclo de contaminación suelo-forraje-animal-leche. En algunas de ellas los clostridios se encuentran predominantemente en forma esporulada y en otras en forma vegetativa.

La alimentación del ganado lechero en Uruguay en general está compuesta por un 60% de suplementos energéticos, mayormente grano húmedo de sorgo y maíz, en un 71% y 29 % respectivamente. Las reservas forrajeras usadas mayormente provienen de cultivos de verano (70%), y el resto de

pasturas y verdeos de invierno. Dentro de los silos de planta entera de cultivos de verano mayormente son de sorgo y maíz en un 61% y 37% respectivamente (INALE, 2018).

La intensificación de la producción lechera genera mayor uso de algunos recursos forrajeros como el ensilaje. Siendo este alimento ofrecido en raciones mixtas, el que más contribuye a la contaminación de la leche con bacterias formadoras de esporas (*Clostridios* y *Bacillus*, Thomas et al., 2012).

En los últimos años, los sistemas de pastoreo durante todo el año en Uruguay han sufrido este proceso acelerado de intensificación (Chilibroste, 2015), con importantes cambios en la alimentación del ensilado. Los productores de leche se vieron obligados a complementar las dietas con estos alimentos durante el invierno y el verano, donde se produce una menor oferta de forraje.

Las esporas están naturalmente presentes en el suelo, contaminando a los cultivos verdes durante su crecimiento, desarrollo y/o cosecha. Las prácticas utilizadas para conservar forrajes como el ensilaje, u otros alimentos como el heno, pueden llevar a que estos alimentos sean una fuente de contaminación de bacterias productoras de ácido butírico (Vissers et al., 2006). Posteriormente, durante la utilización del silo, la difusión de aire dentro del mismo permite el crecimiento de hongos y levaduras, los cuales metabolizan el ácido láctico y como consecuencia el pH incrementa, creando de esta manera las condiciones favorables para el crecimiento de clostridios (Driehuis y Giffel, 2005).

Las heces son consideradas la principal vía de contaminación hacia la leche (Thomas et al., 2012), encontrándose mayores concentraciones de esporas en las heces cuando se alimenta al ganado con ensilajes de mala calidad (Schobitz et al., 2005). Cuando la fracción de ensilaje en la ración supera el 50%, los riesgos de contaminación son mayores incrementando el recuento de esporas en leche (Vissers et al., 2006).

## 2.4. CARACTERIZACIÓN DEL GÉNERO CLOSTRIDIUM

Las bacterias del género *Clostridium* son bastones, Gram positivos, anaerobias estrictas (Pahlow et al., 2003), pertenecientes al filum Firmicutes. Los miembros de este grupo forman endosporas cuando están sujetas a condiciones adversas tales como limitaciones de nutrientes, presión osmótica, o desviaciones extremas de temperatura y pH. Estas esporas facilitan la supervivencia y son resistentes a productos químicos, cambios de pH, calor, choque osmótico y luz ultravioleta. Cuando las condiciones son adecuadas para el crecimiento, las esporas pueden germinar a células vegetativas (Doyle et al., 2015). El rango

promedio de temperatura de crecimiento para los *Clostridium* en su mayoría es de entre 37 a 45°C.

Las especies pertenecientes a este género se encuentran comúnmente en el entorno lechero y son ubicuos en el ambiente del tambo, están presentes en el suelo, y en el tracto gastrointestinal de los mamíferos (Doyle et al., 2015). Entre las especies que comprenden este género se encuentran algunas con importancia tanto por su potencial patogénico como de deterioro. Los más conocidos como patógenos humanos, son el *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetanti*, causante de tétanos, y *Clostridium botulinum* causante de botulismo (Doyle et al., 2015).

Este género obtiene su energía de la fermentación de compuestos orgánicos. En base a esta característica, Pahlow et al. (2003) describen tres grupos fenotípicamente relevantes. El grupo 1, *Clostridium* proteolíticos, que comprende a *C. sporogenes* y *C. bifementans* los cuales a poseen capacidad limitada para fermentar carbohidratos y tienen preferencia por la utilización de aminoácidos. En el grupo 2 comprende las especies sacarolíticas con nula o escasa actividad proteolítica, entre las que se encuentra *C. butyricum*, *C. beijerinckii* y *C. acetobutyricum*. El grupo 3 está integrado por *C. tyrobutyricum*, caracterizado por su capacidad de fermentar un número limitado de azúcares y fermenta preferentemente ácidos orgánicos como el ácido láctico.

Las especies pertenecientes a los grupos 1 y 2 son capaces de crecer a un pH superior a 5, mientras que los integrantes del grupo 3 pueden crecer en presencia de valores de pH más bajos, pero raramente se desarrollan a un pH inferior a 4.5 (Pahlow et al., 2003).

#### 2.4.1. Principales especies de *Clostridium* spp. en la leche

Las especies de *Clostridium* productoras de ácido butírico pertenecen a un grupo muy heterogéneo. Brandle (2016) comenta que, debido a su diversidad fisiológica y genética, taxonómicamente este género ha sido modificado y reorganizado varias veces a lo largo de los años y que no todas las 208 especies descritas actualmente presentan las mismas características que la especie tipo, *Clostridium butyricum* (Wiegel et al. 2006, Rainey et al. 2009), conocida de esta manera por ser la primera en ser descubierta y clasificada por Pasteur (Durre, 2001).

*Clostridium tyrobutyricum* es la especie aislada con más frecuencia en quesos con hinchazón tardía, aunque esporas de otros clostridios, particularmente *C. sporogenes*, *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *C. bifementans*, *C.*



*perfringens* y *C. tertium*, también son encontradas en quesos artesanales y procesados así como en leche cruda (Le Bourhis et al. 2007, Feligini et al. 2014, Reindl et al. 2014), pero en general estos últimos se consideran como potenciadores del defecto más que causantes del mismo (Klijn et al. 1995, Le Bourhis et al. 2007)

Bermúdez et al. (2016) realizaron un relevamiento de la ocurrencia estacional de esporas de *Clostridium* en cinco plantas lácteas de Uruguay, en donde se determinó que *C. tyrobutyricum* fue la especie aislada con mayor frecuencia (50 a 58.3% de los aislamientos de muestras de leche y crema), con aumentos de la frecuencia de aislamientos en los meses de invierno y verano. *C. sporogenes* fue la segunda especie aislada con mayor frecuencia (16.7–21.1% del total de aislamientos de muestras) con una distribución más uniforme durante los meses de muestreo. También se encontró a *C. beijerinckii* y *C. butyricum*, con una prevalencia más baja (7.9 a 13.2%). Además, se identificaron varias especies aisladas en menor frecuencia, como *C. bifermentans*, *C. acetobutylicum*, *C. xylanolyticum* y *C. aminovalericum*. En cuanto a la ocurrencia estacional de las principales especies de *Clostridium* informada por Bermúdez et al. (2016), estos resultados difieren de los encontrados por Feligini et al. (2014) que reportan a *C. sporogenes* como la especie más frecuente en invierno y *C. tyrobutyricum* la especie predominante en invierno y primavera.

Bermúdez et al. (2016) encontraron que los recuentos de esporas en muestras de leche fueron mayores durante el invierno y verano, periodo durante el cual se les suministra a las vacas lecheras mayor cantidad de ensilaje en la dieta total. A su vez se observó que la pasteurización, la estandarización o la adición de lisozima en este caso no redujeron significativamente la población de clostridios durante el procesamiento.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. DESCRIPCIÓN DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Para llevar a cabo este trabajo se escogieron 4 tambos que cuentan con quesería artesanal, localizados al este del departamento de Colonia. Dos de los tambos seleccionados realizan termización (60°C, 15 minutos) de la leche previo a la elaboración de quesos, y los otros dos elaboran los mismos con leche cruda.

Cuadro No. 1. Caracterización de establecimientos muestreados

Productor	Tratamiento térmico	No. de vacas en ordeño promedio	Raza
A	Si	200	Holando
B	No	140	Holando
C	No	240	Holando
D	Si	67	Holando

#### 3.2. MUESTREO

Se recolectaron muestras de leche en cuatro oportunidades a lo largo del año haciendo referencia a las cuatro estaciones del año: mayo (otoño), julio (invierno), setiembre (primavera), diciembre (verano). Se muestrearon 2 quesos por tambo, elaborados a partir de la leche previamente colectada, con 20 días y dos meses de maduración.

Cuadro No. 2. Esquema de recolección de muestras

Mayo	Junio	Julio	Agosto	Setiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero
Leche 1	Queso 1	Queso 1	Queso 2	Queso 2	Queso 3	Queso 3	Leche 4	Queso 4
	20 días	2 meses	20 días	2 meses	20 días	2 meses		2 meses
		Leche 2		Leche 3			Queso 4	
							20 días	

Las muestras de leche se recolectaron en frascos estériles y se mantuvieron bajo refrigeración hasta su procesamiento en el laboratorio de la Unidad de Tecnología de los Alimentos, Facultad de Agronomía. Para los quesos se obtuvo la horma entera, preparados en moldes especiales provistos a los productores.

### 3.3. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

#### 3.3.1. Procesamiento de muestras de leche

Primeramente, se realizó la homogenización de las muestras por medio de tratamiento térmico en un baño de agua a 40°C, 20 minutos y agitando cada recipiente de muestreo. Posteriormente se realizó la siembra en superficie en distintos medios de cultivo a partir de 4 diluciones decimales seriadas de la muestra. Para la dilución se utilizó solución salina fisiológica (NaCl 0.85%). Los medios de cultivo utilizados para los distintos grupos microbianos fueron los siguientes:

- PCA + caseína (Plate count agar + 1% caseína), recuento mesófilos totales
- AEM (Agar extracto malta), recuento hongos y levaduras
- ASM (Agar sales manitol), recuento halotolerantes (*Staphylococcus* spp.)
- Petrifilm, recuento de enterobacterias

Las placas de PCA + caseína, ASM y Petrifilm se incubaron a 37° C por 24-48 hs, mientras que las de AEM se incubaron a 28°C durante 5-7 días, y una vez finalizado el tiempo de incubación se realizó el recuento de las colonias.

La determinación de esporulados anaerobios, se realizó en tubos por medio del método de NMP (número más probable). Los mismos conteniendo 9 ml de RCM (Reinforced *Clostridium* Medium) como medio de cultivo. Luego de sembradas las diluciones correspondientes, se les colocó un tapón de parafina-vaselina. Previo a la incubación los tubos fueron tratados térmicamente a 80°C durante 10 minutos en baño María para eliminar las formas vegetativas y activar esporas. Los tubos se incubaron durante 7 días a 37°C. Se contabilizaron como positivos los tubos en los cuales se constató producción de gas en presencia de anaerobiosis por medio de la separación visible del tapón de parafina-vaselina del medio de cultivo. Para el aislamiento de *Clostridium* spp. los tubos positivos se sembraron en placas de medio selectivo (RCA + rojo neutro + D-cicloserina) en condiciones de anaerobiosis utilizando el sistema AnaeroGen (Oxoid) durante 48-72 hs.

Se seleccionaron las colonias presuntivamente pertenecientes al género *Clostridium* para su identificación por técnicas molecular y estudio de su variabilidad genética. Mediante tinción de Gram se realizó la caracterización fenotípica de las colonias seleccionadas. Los aislamientos de *Clostridium* spp. fueron preservados en medio crioscópico (15% v/v glicerol).

### 3.3.2. Procesamiento de muestras de queso

El análisis microbiológico de los quesos se centró únicamente en el recuento de esporulados anaerobios. En las muestras de queso se utilizaron 10 gramos que fueron homogenizados en 90 ml de una solución de citrato de sodio al 2% en Stomacher®400 Circulator (Seward Ltd., UK). Para el recuento de esporulados anaerobios se utilizó el método NMP en tubos de RCM. Se realizaron diluciones seriadas decimales en la misma solución de citrato de sodio y se inocularon los tubos de RCM con el tapón de parafina-vaselina. Los tubos fueron tratados térmicamente e incubados en las mismas condiciones descritas anteriormente. Del mismo modo se procedió al aislamiento de colonias de *Clostridium* spp. a partir de los tubos positivos. Los aislamientos de *Clostridium* spp. fueron preservados en medio crioscópico.

### 3.4. RECuentOS Y REGISTRO DE DATOS

Una vez cumplido el período correspondiente a la incubación se procedió al recuento de bacterias viables (UFC/ml), y al recuento del NMP en el caso de los esporulados anaerobios (UFC/ml o UFC/g). Los recuentos se registraron en planillas electrónicas para posterior análisis.

### 3.5. PRUEBAS MOLECULARES

Para la identificación y estudio de la diversidad genotípica de los aislamientos de *Clostridium* spp. se utilizaron distintas técnicas de biología molecular. Para la asignación de especie se realizó un multiplex-PCR, y aquellos aislamientos que no pudieron ser identificados por esta técnica se identificaron por secuenciación del gen 16S rADN. Para observar la diversidad genotípica se utilizó una técnica de fingerprinting con el cebador GTG5.

#### 3.5.1. Aislamiento de ADN

Los aislamientos seleccionados como presuntos *Clostridium* spp. provenientes de las muestras de leche y queso, se cultivaron en viales con medio RCM saturados con CO<sub>2</sub> y se incubaron por 48 horas. Los cultivos crecidos se centrifugarán a 10.000 rpm durante 5 minutos y los paquetes celulares se resuspenden en 200µL de buffer TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8). El ADN genómico se aisló del paquete celular con un kit comercial de purificación de ADN

(GeneJet Genomic DNA purification kit, Thermo Scientific). La presencia de ADN se confirmó por electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

### 3.5.2. Análisis de multiplex-PCR

Cremonesi et al. (2012) diseñaron un ensayo de multiplex-PCR utilizando cuatro pares de cebadores específicos para las especies de *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *C. sporogenes* y *C. tyrobutyricum*, para los genes *nifH*, *hydA*, *colA* y *enr*, respectivamente. Cada producto de amplificación tiene un tamaño determinado que permite su visualización en geles de agarosa. Utilizando como molde el ADN de los aislamientos de *Clostridium* seleccionados, se realizaron las reacciones de PCR en un volumen de 50ul con los cebadores y de acuerdo a las condiciones previamente descritas (Cremonesi et al., 2012). Los productos de PCR amplificados se distinguieron por electroforesis en gel de agarosa al 3%.

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

Los aislamientos que no se pudieron identificar a nivel de especie por el ensayo de multiplex-PCR, se identificaron por análisis de secuencia del gen 16S rADN. Se realizaron 25ul de reacción conteniendo 1X Thermo buffer (Fermentas, USA), 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP (Fermentas, USA), 1U Taq polymerase (Fermentas, USA), 0.2 mM de cada cebador (fD1 and rD1) y 20 ng ADN molde. Los cebadores fD1 y rD1 se usaron para amplificar un fragmento de 1540 bp del gen 16S rADN (Weisburg et al., 1991). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización de 94 °C por 7 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 56 °C por 1 min y 72°C por 1 min y una extensión final de 72°C por 10 min, Todos los experimentos incluyeron un control negativo sin ADN molde. Los amplicones fueron purificados y secuenciados por MacroGen Sequencing Service, Korea, usando un secuenciador capilar ABI PRISM 3730XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) utilizando el cebador fD1. Las secuencias de ADN obtenidas fueron comparadas con las depositadas en la base de datos NCBI BLAST database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para la identificación de aislamientos basados en la similitud de secuencia.

#### 3.5.4. Análisis de diversidad genotípica por rep-PCR

La diversidad genotípica de los aislamientos se evaluó por rep-PCR utilizando el cebador GTG5 (Gevers et al., 2001). El análisis se realizó en mezclas de reacción de 25 µl. conteniendo 1 × Taq Buffer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 1 U de Taq polimerasa, 2 µM (GTG) 5 cebador (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3') y 20 ng de ADN molde. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización de 94 °C por 7 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 46 °C por 1 min y 72°C por 1 min y una extensión final de 72°C por 10 min, Todos los experimentos incluyeron un control negativo sin ADN molde. Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5%.

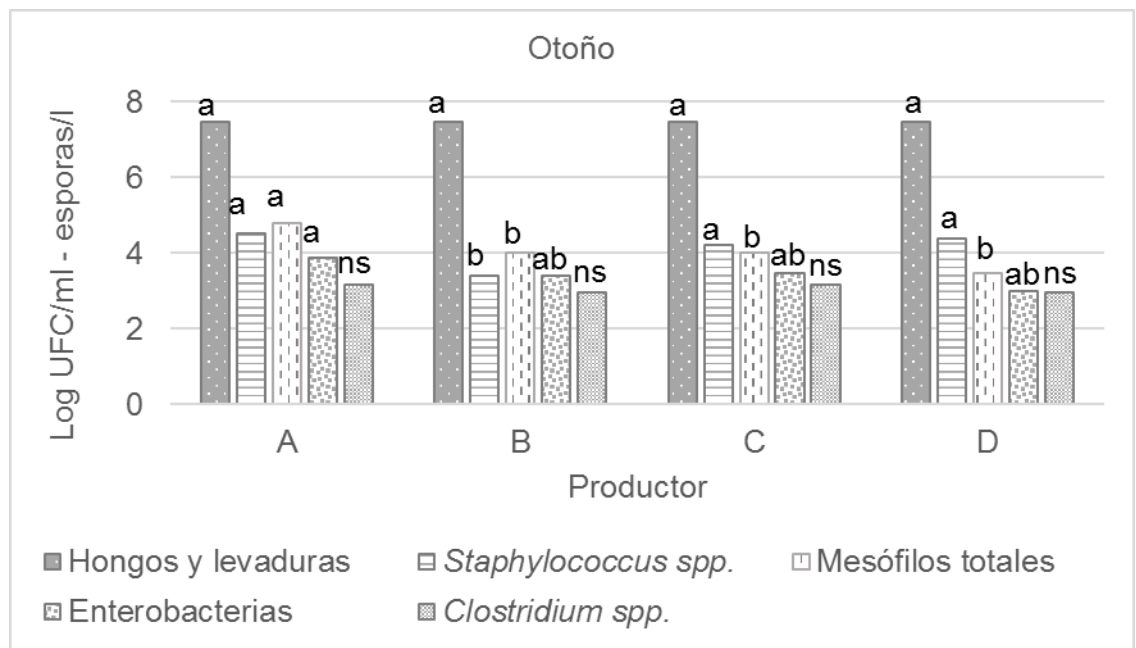
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

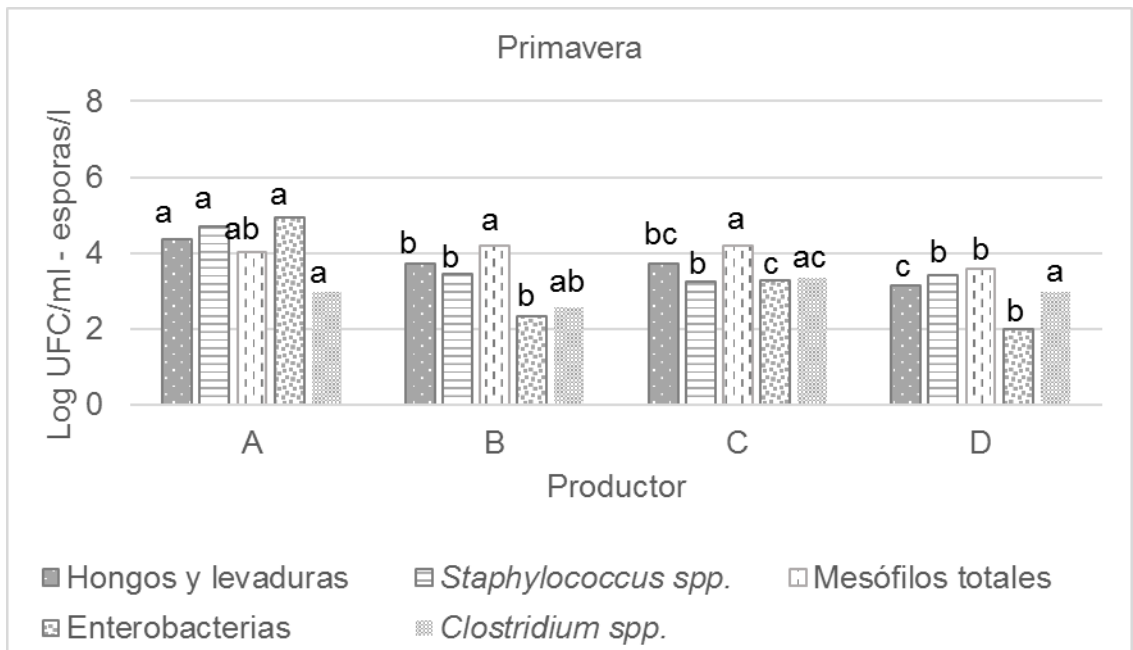
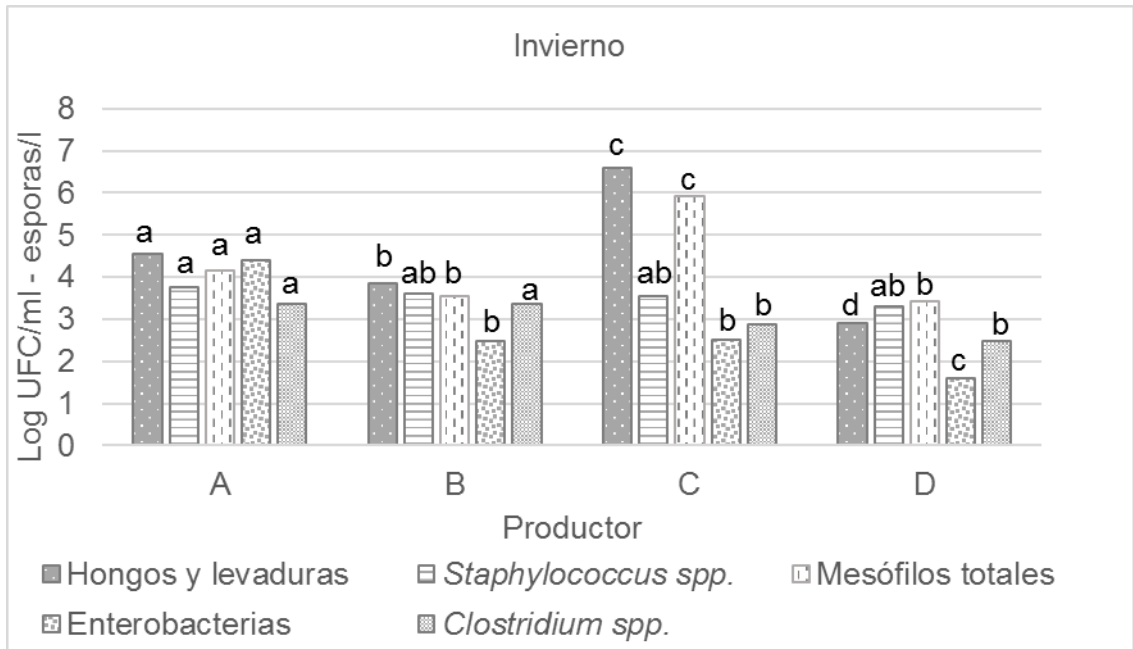
### 4.1. RECUEENTOS

#### 4.1.1. Recuentos en leche

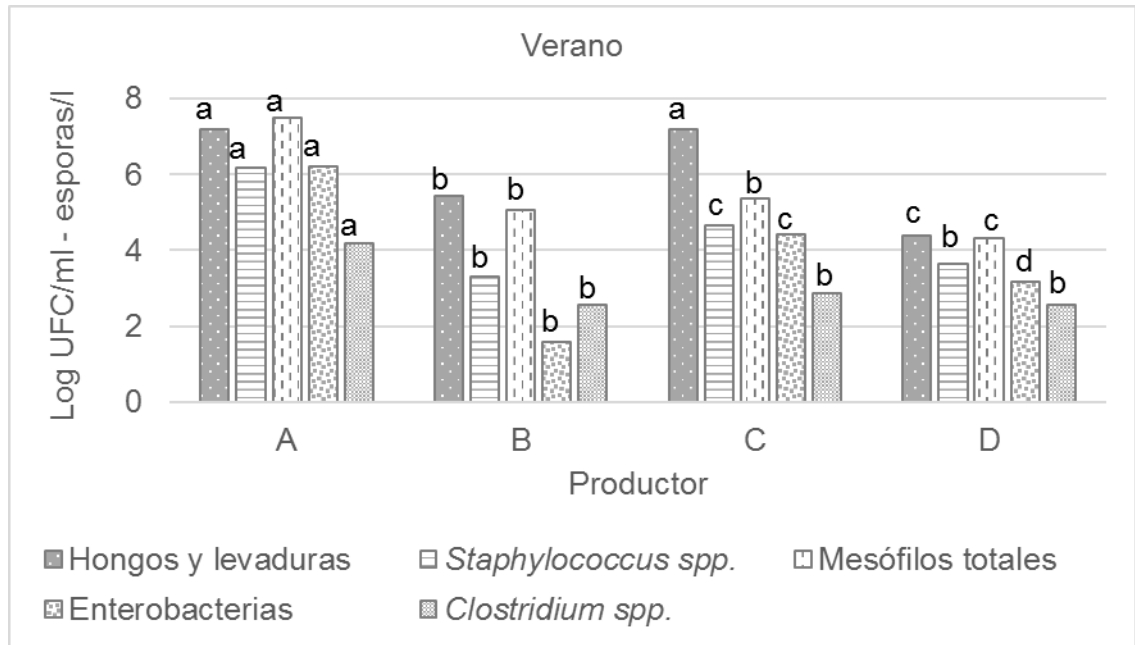
En la Figura No. 1 se muestran los valores de recuento obtenidos para los distintos grupos microbianos en los distintos momentos de muestreo para cada productor. Dentro de cada grupo microbiano los recuentos en leche fueron muy variables entre productores en todas las estaciones.

Figura No. 1. Recuentos de UFC/ml y esporas/l en leche por estaciones del año









a, b, c, d Para cada grupo microbiano las barras con igual letra no presentan diferencias significativas ( $P > 0.05$ ).

En otoño los recuentos fueron muy similares entre productores para cada grupo, si bien se observan algunas diferencias significativas puntuales. El Productor B presentó recuentos de *Staphylococcus* spp. menores que los otros productores, mientras que el Productor A presentó los recuentos más altos de bacterias mesófilas y enterobacterias. No se observaron diferencias significativas en el recuento de otoño *Clostridium* spp. de los cuatro productores. Para hongos y levaduras no se obtuvieron valores de recuento ya que las placas presentaron colonias invasoras, no pudiéndose detectar colonias aisladas.

En invierno se destaca el Productor C, que presenta valores de recuento de hongos y levaduras y mesófilos totales significativamente más altos que el resto de los productores. Para el resto de los grupos microbianos, también se observaron algunas diferencias significativas. Los recuentos de enterobacterias observados en las muestras del Productor A fueron los más altos con una diferencia de 2 Log con respecto a los otros productores. En esta estación se observaron diferencias significativas en el recuento de esporas de *Clostridium* entre los diferentes productores, aunque cuantitativamente no fueron importantes.

Para la estación de primavera no se observan grandes diferencias en los recuentos de los distintos grupos microbianos entre productores. Las muestras del Productor A presentaron los valores más altos de recuento de enterobacterias. En cuanto al recuento de esporas de *Clostridium*, si bien se

observaron diferencias estadísticamente significativas, todos los valores fueron en el entorno de 3 Log.

En este trabajo las muestras del mes de diciembre (verano) fueron las que mostraron mayor variabilidad en los recuentos. Se destaca un aumento en los mismos, especialmente en hongos y levaduras en los productores A y C presentando valores de hasta 7 Log. Para todos los grupos microbianos, las muestras del Productor A fueron las que presentaron los valores más altos.

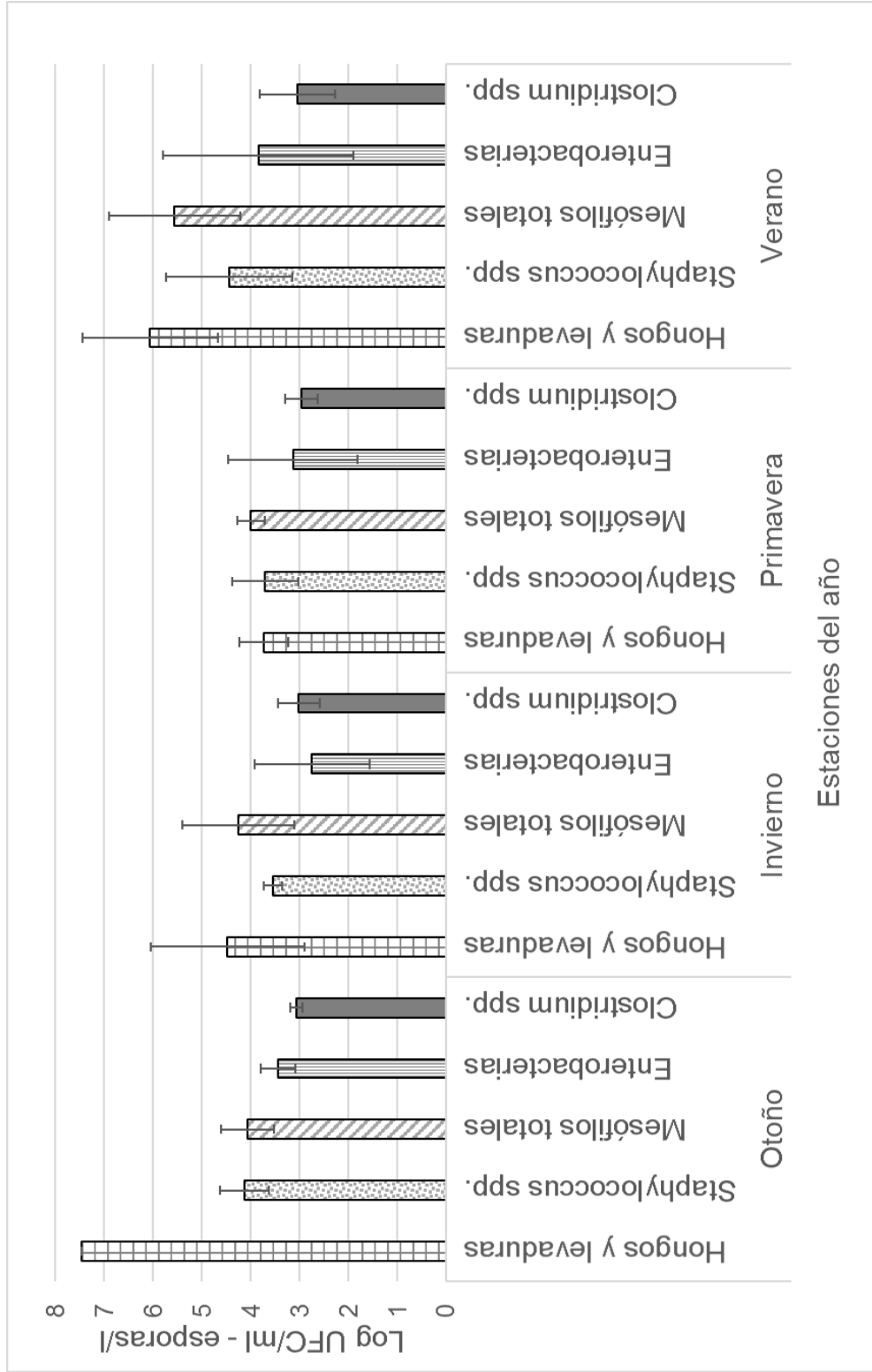
Con el propósito de evaluar el efecto de la época del año en el recuento de los distintos grupos microbianos, se promediaron los recuentos obtenidos para cada productor en las distintas fechas de muestreo. Se debe tener en cuenta que las muestras fueron recolectadas el mismo día y los productores se encuentran geográficamente cerca, por lo que se puede considerar que las variaciones de las condiciones ambientales afectaron de igual manera a todos los productores.

Los muestreos estacionales de cada grupo microbiano no presentaron diferencias significativas, sin embargo, en el recuento de hongos y levaduras se observó una tendencia al aumento en verano ( $P=0.069$ , Figura No. 2). Se observó además una mayor variación entre las muestras de leche en las estaciones de invierno y verano. El manejo de la rutina de ordeño propia de cada establecimiento puede ser considerada como la causa de estas pequeñas variaciones.

Los valores de recuento de mesófilos totales en el muestreo de verano se ubicaron en promedio por encima de 100.000 UFC/ml, estando así por encima del límite definido por el decreto 3590/16.

La estación de otoño presenta menor variación entre las muestras de los productores para todos los grupos microbianos (barras de error más chicas).

Figura No. 2. Variaciones estacionales de recuentos de UFC/ml y esporas/l en leche



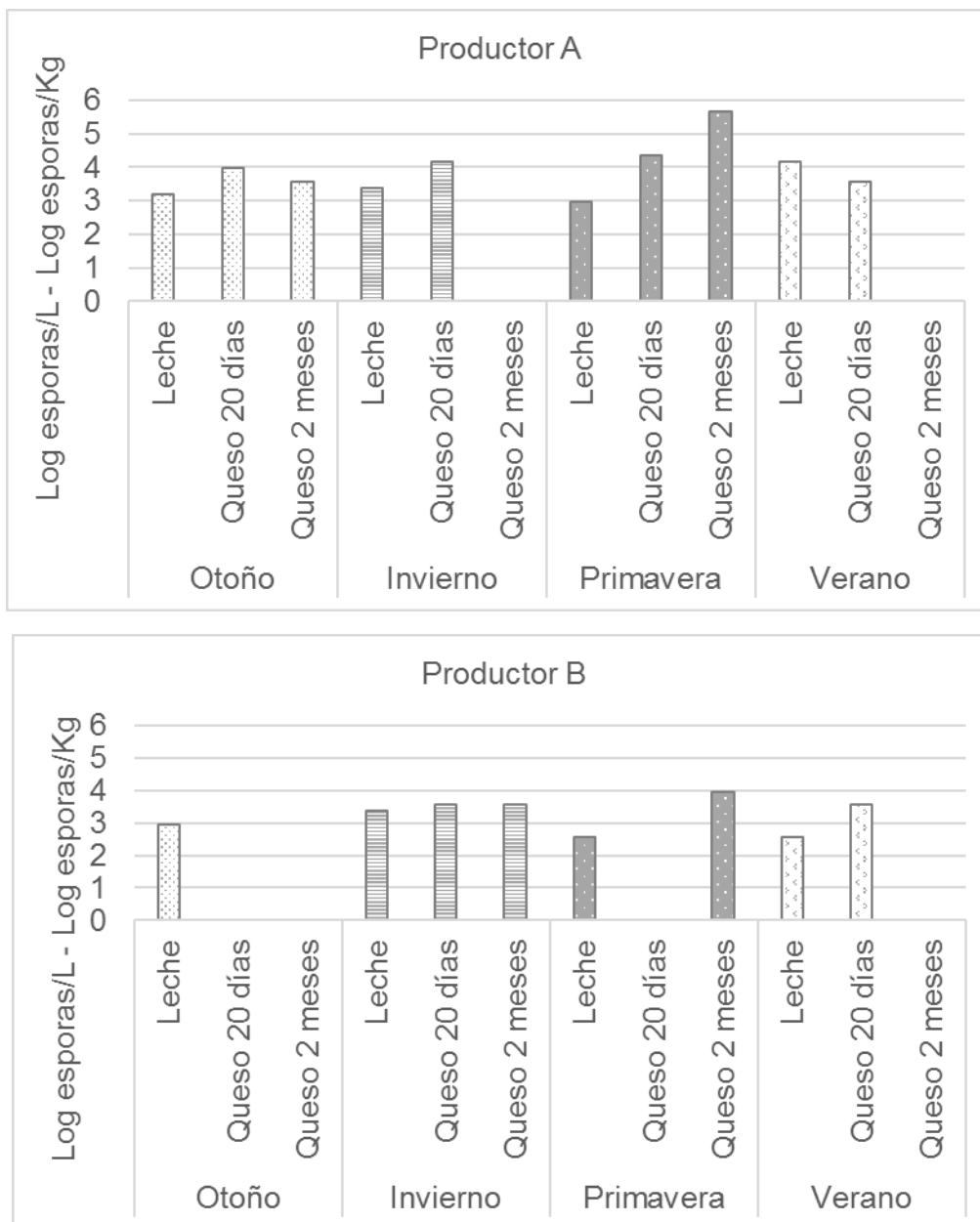
Los recuentos de *Clostridium* spp. fueron constantes entre los distintos muestreos. No se observaron diferencias significativas para las distintas estaciones ( $P=0.989$ ). Estos resultados difieren de lo anteriormente observado por Bermúdez et al. (2016), que encontraron mayores valores de recuento de esporas de *Clostridium* en leche cruda durante los meses de invierno y verano, con respecto a otoño y primavera. Se debe resaltar que los resultados obtenidos en el presente trabajo abarcan un número de muestras limitado y un solo año de muestreo, por lo que no sería suficiente para afirmar relaciones de estacionalidad.

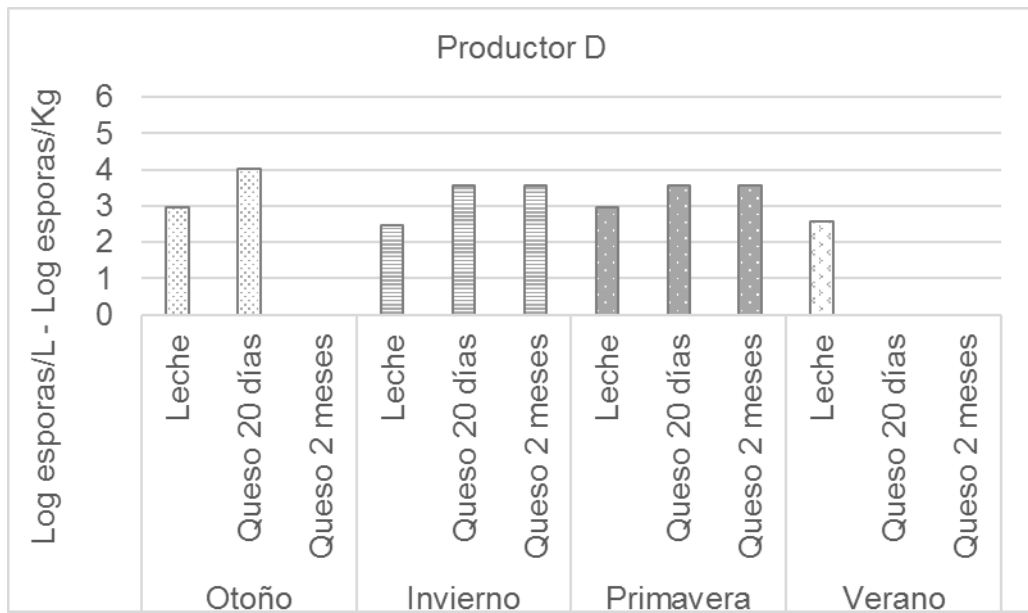
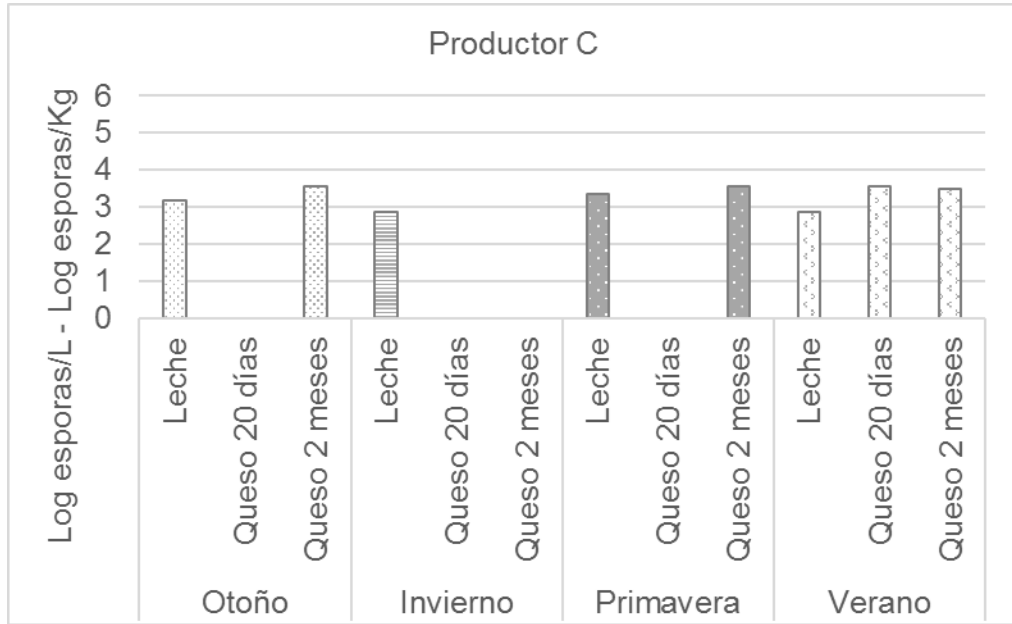
#### 4.1.2. Recuento de esporulados anaerobios en leche cruda y los quesos elaborados a partir de la misma

En la Figura No. 3 se muestran los recuentos de esporulados anaerobios presentes en leche cruda y en el queso elaborado a partir de la misma. Se analizaron los quesos a los 20 días y 2 meses de maduración. Los recuentos obtenidos en las muestras de leche cruda se encontraron en el rango  $3,02 \times 10^2$  y  $1,51 \times 10^4$  esporas/L.

En la mayoría de los casos las esporas presentes en la leche permanecieron en los quesos elaborados a partir de la misma, con excepción de tres casos en los que los recuentos de esporas anaerobias en quesos se ubicaron por debajo del límite de detección de la técnica del NMP para las muestras de queso ( $<3 \text{Log esporas/L}$ ).

Figura No. 3. Recuento de esporulados anaerobios en leche cruda y quesos por productor según estación del año





En los procesos de elaboración de quesos donde se observó transferencia y proliferación de las esporas presentes en la leche a los quesos, se pueden distinguir tres situaciones. En la primera situación se observó que las esporas presentes en leche se mantenían en los quesos con distintos tiempos de maduración (ejemplo, Figura No. 3, Productor A primavera). Este fue el caso en 6 de los 16 procesos de elaboración muestreados. Esta situación es esperable debido a que las esporas presentes en la leche son capaces de soportar el tratamiento térmico aplicado (en caso de existir), encontrando en los quesos nichos anaerobios ideales para su activación y proliferación. Podría esperarse que cuanto mayor sea el tiempo de maduración, la cantidad de esporas anaerobias aumentará, como se observó en el muestreo de primavera del Productor A (Figura No. 3). Pero también es cierto que con el transcurso de la maduración la flora bacteriana cambia, aumentando la población de NSLAB capaces de controlar la proliferación de *Clostridium* spp. Las NSLAB presentes en el queso pueden tener un efecto bacteriostático (Figura No. 3, Productor D, invierno y primavera) y/o bactericida (Figura No. 3, Productor A, otoño).

En la segunda situación, observada en el Productor A en invierno y verano, el B en verano y el D en otoño (4/16 de los procesos de elaboración muestreados), se detectaron esporas en el queso de 20 días, pero no en el de dos meses de maduración (Figura No. 3). Es posible que la población NSLAB de estos quesos haya sido capaz de lograr un mayor efecto inhibitorio en la población de esporas, llevando la cantidad de esporas a niveles por debajo del límite de detección de la técnica en los quesos de dos meses.

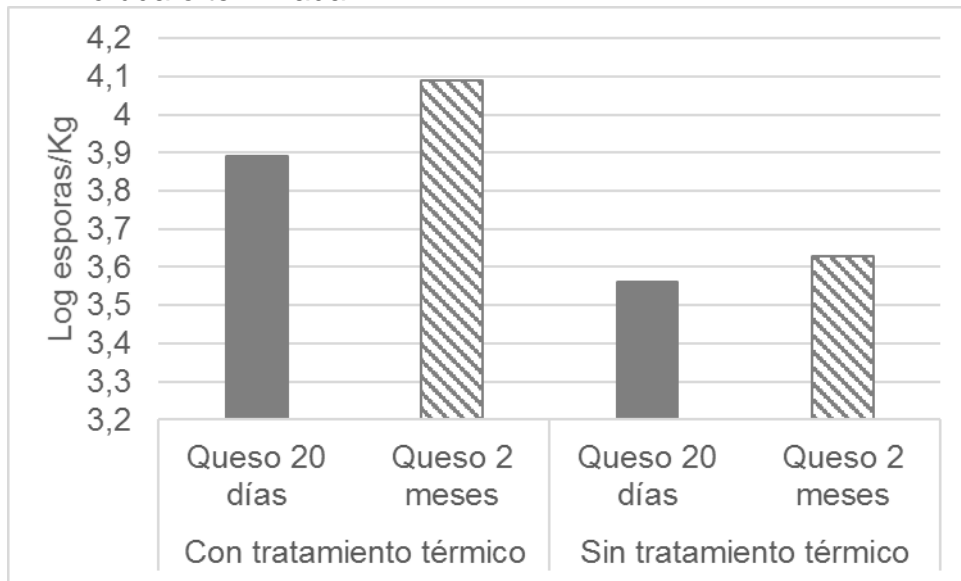
La tercera situación comprende tres casos en los que no se observó recuento de esporas en los quesos de 20 días de maduración, pero sí en los de 2 meses (ejemplo, Productor C otoño y primavera, Figura No. 3). Una de las condiciones necesarias para el desarrollo de *Clostridium* en los quesos es la presencia de nichos con bajo contenido de oxígeno. Cuanto mayor sea el tiempo de maduración del queso, menor va a ser el contenido de oxígeno en la masa. Esto podría explicar la ocurrencia de un mayor número de esporas en los quesos con 2 meses de maduración.

Así también distintas condiciones de elaboración entre los productores pueden derivar en una variedad de NSLAB capaces de establecer distintas condiciones en el medio de elaboración quesero, produciendo así las diferencias en cuando a la flora presente en cada queso artesanal elaborado por cada productor.

Cabe destacar que en el caso de los productores A y D que utilizan la termización como tratamiento térmico previo a la elaboración de quesos, la presencia de esporas fue más constante en los muestreos con respecto a los productores B y C que elaboran quesos a partir de leche cruda. Este tratamiento

térmico aplicado a la leche podría tener efectos adversos sobre la microflora láctica, pudiendo afectar a las NSLAB que posteriormente podrían actuar inhibiendo o controlando a *Clostridium*.

Figura No. 4. Recuento de esporas en quesos elaborados a partir de leche cruda o termizada



Al promediar los recuentos de esporas anaerobias en quesos, no se observaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en los quesos elaborados a partir de leche cruda o termizada.

Los quesos elaborados a partir de leche cruda sin tratamiento térmico mostraron valores de recuento de esporulados anaerobios en el rango de  $2.6 \times 10^5$ – $9.5 \times 10^5$  esporas/Kg, mientras que las esporas presentes en quesos elaborados a partir de leche termizada se encontraron en el rango de  $3.27 \times 10^5$ – $3.37 \times 10^7$  esporas/Kg.



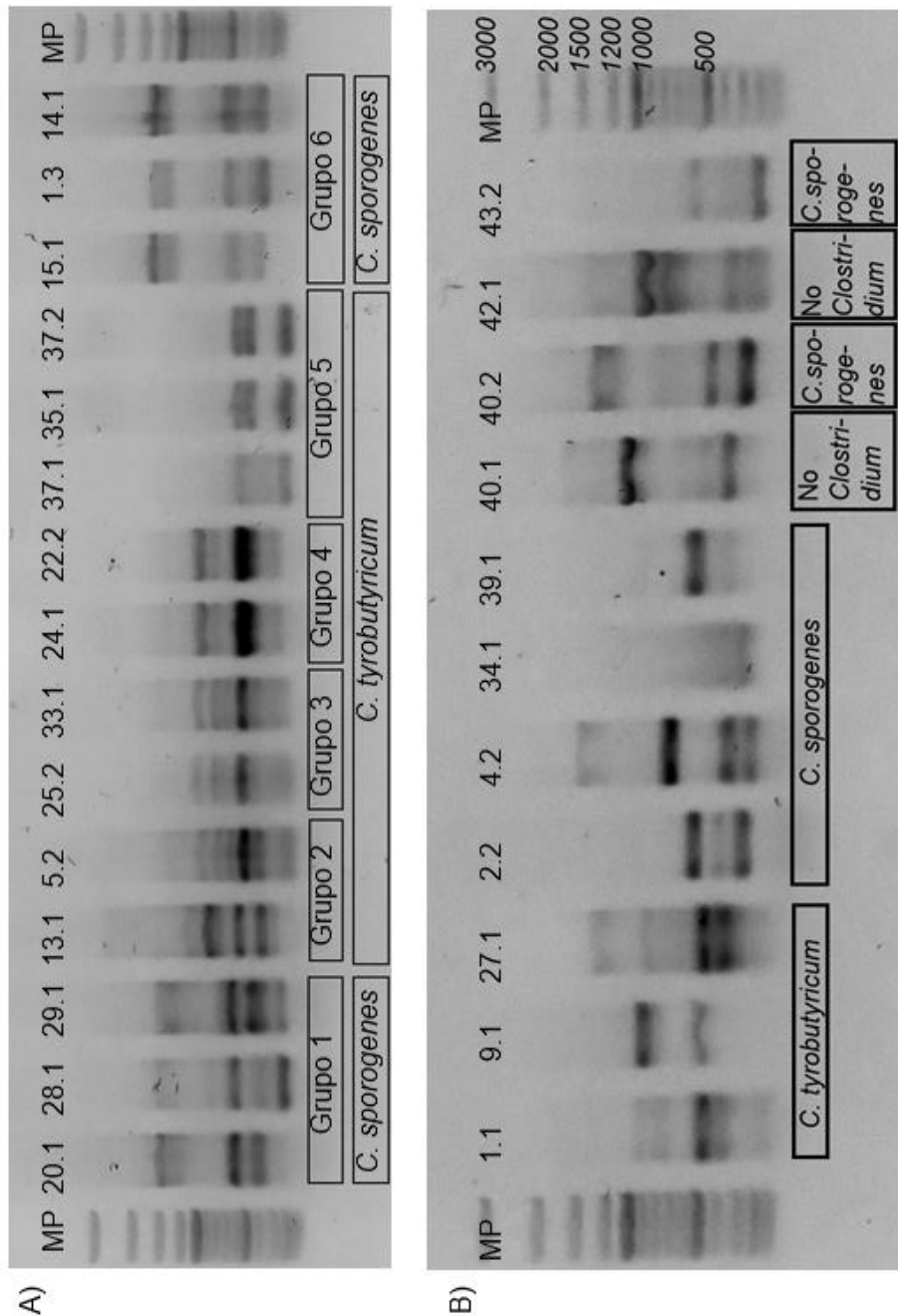
## 4.2. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LOS AISLAMIENTOS DE *Clostridium* spp.

Por medio de la técnica GTG5 se caracterizaron genotípicamente los aislamientos previamente seleccionados y se identificaron los mismos por medio de una multiplex-PCR y secuenciación del gen 16S.

### 4.2.1. Caracterización genotípica

A partir de las muestras de leche y queso se seleccionaron aislamientos presuntos *Clostridium*, capaces de crecer en anaerobiosis estricta, con una morfología de bacilo, presencia de esporas y tinción Gram positiva. Se utilizó la técnica de rep-PCR utilizando el cebador GTG5 para agrupar los aislamientos según los perfiles de bandas obtenidos. En la Figura No. 5A se encuentran los aislamientos que pudieron ser agrupados por similitud de perfiles de bandas. Se observaron seis grupos distintos conformados por dos o más aislamientos. En la Figura No. 5B se muestran los aislamientos con perfiles únicos que no pudieron ser agrupados. Para la identificación se seleccionaron aislamientos representativos de cada grupo de la Figura No. 5A y todos los aislamientos con perfiles de banda únicos de la Figura No. 5B. La identificación se realizó por multiplex-PCR con cebadores especie específicos y mediante secuenciación del gen 16S ADN.

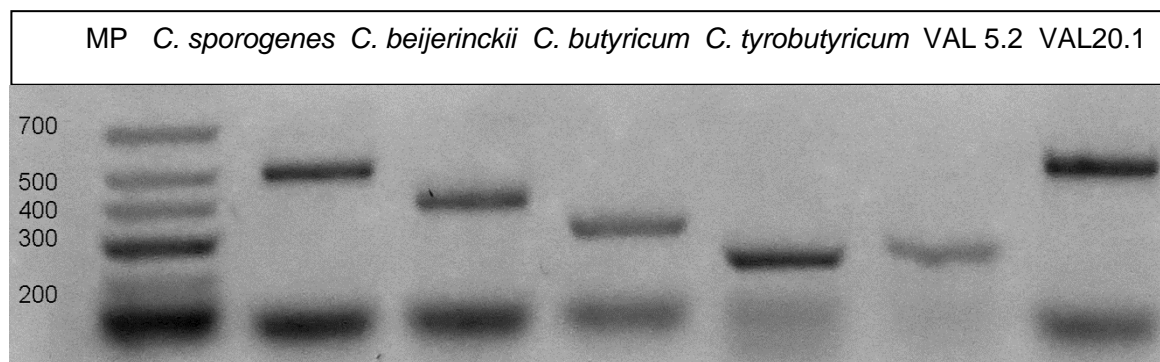
Figura No. 5. Perfiles de bandas obtenidas con rep-PCR con el cebador GTG5



#### 4.2.2. Identificación por multiplex-PCR

La técnica de multiplex-PCR utilizada consistió en realizar una única reacción de amplificación con cuatro juegos de cebadores específicos para cada una de las especies de *Clostridium*. En la Figura No. 6 se muestran las bandas específicas obtenidas para cada especie de referencias utilizadas y dos de aislamientos de este trabajo a modo de ejemplo. Un total de 11 aislamientos fueron identificados como *C. sporogenes* y *C. tyrobutyricum* por esta técnica. Aquellos aislamientos que no pudieron ser identificados por esta técnica lo fueron por amplificación y secuenciación del gen del 16S ADN (10 aislamientos).

Figura No. 6. Identificación de aislamientos por multiplex-PCR



En el Cuadro No. 3 se muestran los aislamientos que fueron identificados por secuenciación del gen 16S ADN, con su respectivo porcentaje de identidad. Todos los aislamientos identificados correspondieron a la especie *C. sporogenes* con un alto porcentaje de identidad, exceptuando los aislamientos 40.1 y 42.1 que no correspondieron a especies del género *Clostridium*.

Cuadro No. 3. Identificación de aislamiento por secuenciación del gen 16S ADN

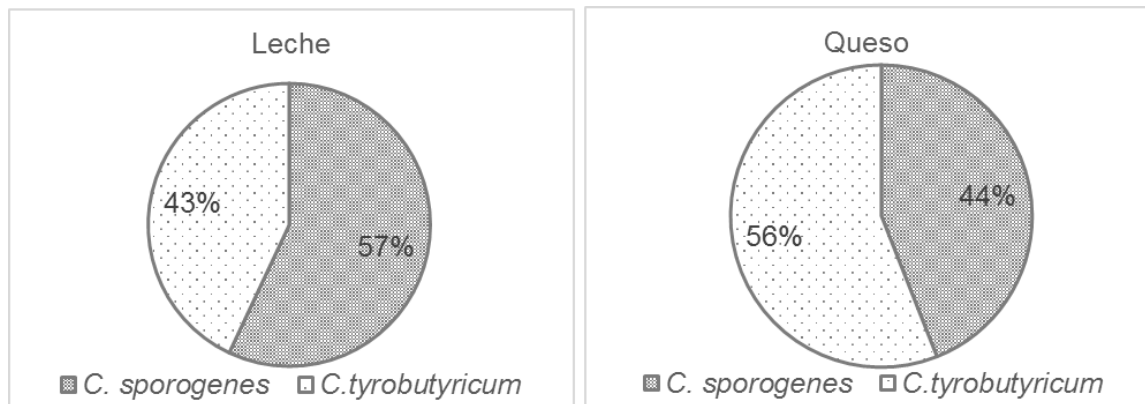
Aislamiento	Identificación	Identidad (%)
43.2	<i>C. sporogenes</i>	99
4.2	<i>C. sporogenes</i>	98
1.3	<i>C. sporogenes</i>	99
28.1	<i>C. sporogenes</i>	99
2.2	<i>C. sporogenes</i>	99
34.1	<i>C. sporogenes</i>	100
39.1	<i>C. sporogenes</i>	99
40.1	<i>Bacillus</i> sp.	97
40.2	<i>C. sporogenes</i>	99
42.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	99

Una vez realizada la identificación de los aislamientos se encontraron como especies predominantes *C. sporogenes* y *C. tyrobutyricum* en igual proporción, comprendiendo ambas especies al 100% de los aislamientos de *Clostridium* spp. Estos resultados concuerdan con los resultados de Reindl et al. (2014) donde encontraron que ambas especies tuvieron mayor prevalencia en muestras de leche y queso (84.7%). Del mismo modo, Bermúdez et al. (2016) informan que estas dos especies fueron las predominantes en muestras de leche cruda y queso, representando el 75% y el 92,8% de los aislamientos, respectivamente.

Del estudio de la caracterización genotípica de los aislamientos con el cebador GTG5, se evidencia la diversidad genotípica presente entre los aislamientos de estas especies predominantes (Figura No. 5). Las poblaciones de *C. tyrobutyricum* y *C. sporogenes* mostraron una alta diversidad genotípica como ha sido informado previamente por Bermúdez et al. (2016). Para los aislamientos de *C. tyrobutyricum* se definieron cuatro grupos con perfiles de bandas característicos, mientras que para *C. sporogenes* solo se identificaron dos grupos. Igualmente, para ambas especies se obtuvieron aislamientos con perfiles de bandas únicos que no pudieron ser incluidos en estos grupos. La

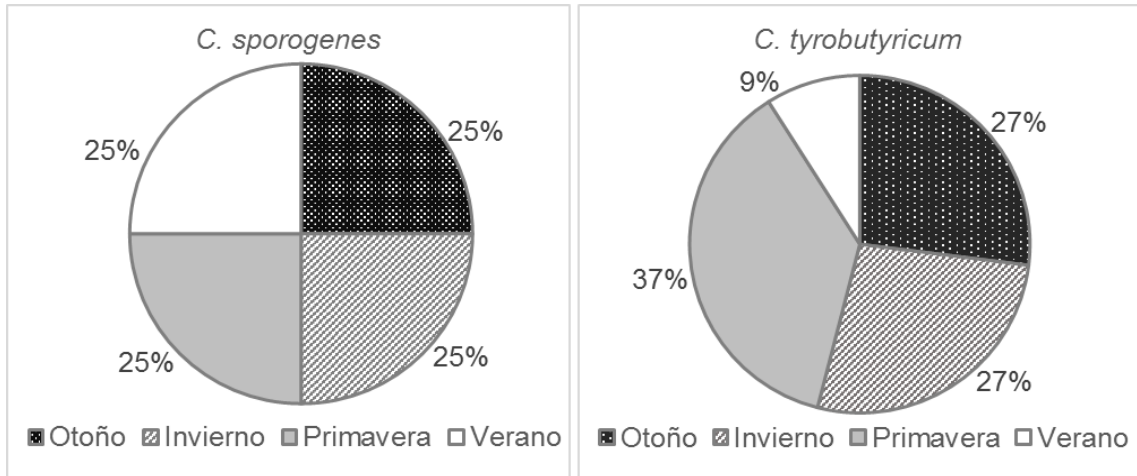
diversidad observada entre los aislamientos, especialmente los provenientes de leche cruda, podría indicar que la población de estos microorganismos en el ambiente del tambo sería igualmente diversa.

Figura No. 7. Porcentaje de aislamientos identificados según especie en el total de muestras de leche y queso



Cuando se observa la distribución de las especies *C. tyrobutyricum* y *C. sporogenes* en las muestras de leche y queso por separado, se observa que, si bien las proporciones son muy similares, *C. sporogenes* es más abundante entre los aislamientos provenientes de leche cruda, mientras que *C. tyrobutyricum* es la que prevalece entre los aislamientos de queso (Figura No. 7).

Figura No. 8. Distribución estacional de los aislamientos de *Clostridium* spp.



Del total de aislamientos identificados como *C. sporogenes* se observó una distribución homogénea entre las distintas estaciones, en concordancia con lo observado por Bermúdez et al. (2016). Sin embargo, otros autores reportan una abundancia mayor de esta especie en invierno (Feligini et al., 2014).

En el caso de los aislamientos identificados como *C. tyrobutyricum* se observó mayor abundancia en primavera, seguido por otoño e invierno. Esto coincide parcialmente con el trabajo presentado por Feligini et al. (2014), en el cual se observó que esta especie fue predominante en invierno y primavera, mientras que en el trabajo de Bermúdez et al. (2016) fue predominante en los meses de verano e invierno.

## 5. CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en este trabajo reflejan la diferencia existente en los distintos grupos microbianos presentes en leche cruda en los cuatro establecimientos lecheros. Estas variaciones pueden ser explicadas por la diferencia en el manejo y rutina de ordeño, así como del tipo y calidad del alimento utilizado en cada establecimiento. Para algunos establecimientos se observaron valores de recuento significativamente más altos que los otros en algún grupo microbiano, ejemplo Productor A. Sin embargo, no se observaron tendencias claras en este sentido.

En cuanto a la variación estacional de los grupos microbianos no se observaron diferencias significativas, aunque si se pueden apreciar tendencias. Se destaca el aumento del recuento de hongos y levaduras en verano. En otoño se observó una menor variación en los recuentos bacterianos entre los cuatro productores. Las mayores variaciones se registraron en las estaciones de invierno y verano. La presencia de esporas de *Clostridium* fue constante a lo largo de todos los muestreos, y las mayores diferencias significativas entre productores se observaron en los meses de invierno y primavera. Es importante resaltar que los niveles de esporas de *Clostridium* encontrados en leche cruda en general fueron en el entorno de las 1000 esporas/L.

Uno de los principales objetivos de este trabajo era cuantificar y caracterizar la población de esporulados anaerobios en leche cruda, y su comportamiento en distintos procesos de elaboración de queso Colonia. En la mayoría de los casos las esporas de *Clostridium* presentes en la leche permanecieron en los quesos elaborados a partir de la misma. Se observó que para los quesos provenientes de productores que aplicaban un tratamiento térmico a la leche previo a la elaboración quesera (Productores A y D), el número de muestras positivas para la presencia de esporas de *Clostridium* fue mayor. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los valores de recuento de esporulados anaerobios de las muestras de quesos elaborados a partir de leche cruda o termizada.

*C. sporogenes* y *C. tyrobutyricum* fueron las especies más comúnmente aisladas tanto de leche como de quesos. Del estudio de diversidad genotípica de los aislamientos pertenecientes a estas especies se identificaron al menos cuatro grupos o genotipos distintos de *C. tyrobutyricum*, y dos para *C. sporogenes*. Estas especies mostraron una distribución diferencial con respecto a las estaciones del año. Los aislamientos de *C. sporogenes* presentaron una distribución homogénea en las cuatro estaciones del año, mientras que los aislamientos de *C. tyrobutyricum* fueron predominantes en primavera y minoritarios en verano.

## 6. RESUMEN

La producción lechera en Uruguay alimenta anualmente a unos 20 millones de personas, unas siete veces más que el consumo dentro del país. Del total de productores un 27% se dedica a la producción artesanal de quesos. En este trabajo se analizaron muestras de leche y queso con distintos tiempos de maduración, provenientes de cuatro productores artesanales de queso colonia. Se evaluó y cuantificó la dinámica estacional de la microflora presente en leche cruda y quesos artesanales, con énfasis en la población de microorganismos esporulados anaerobios (*Clostridium* spp.). Así como también el efecto del proceso de termización de la leche destinada a la producción quesera en la población de *Clostridium*. En cuanto a la microflora presente en la leche cruda, se observaron diferencias entre los distintos productores, en algunos casos estadísticamente significativas, pero sin tendencias claras para ningún grupo de microorganismos específicos. Con respecto a la evaluación de la dinámica estacional de los distintos grupos microbianos, no se hallaron diferencias significativas. Sin embargo, se destaca una menor variación de los recuentos entre productores en la estación de otoño y una mayor variabilidad para los muestreos de invierno y verano. La presencia de esporas anaerobias se constató a lo largo de todas las muestras de leche en un rango de  $3.02 \times 10^2$  y  $1.51 \times 10^4$  esporas/L. Se observaron diferencias significativas entre los distintos productores en los muestreos de invierno y primavera. En la mayoría de los casos las esporas presentes en la leche permanecieron en los quesos elaborados a partir de la misma, con excepción de tres casos en los que el recuento de esporas anaerobias en queso se ubicó por debajo del límite de detección de la técnica (<300 esporas/L). También se observó un mayor número de muestras positivas para la presencia de esporas anaerobias en los quesos de los productores que realizan tratamiento térmico previo. Los aislamientos de *Clostridium* fueron identificados como *C. sporogenes* y *C. tyrobutyricum* presentando una amplia diversidad genotípica dentro de cada especie, y con una distribución estacional diferencial. *C. sporogenes* presentó una distribución homogénea durante todo el muestreo, mientras que *C. tyrobutyricum* fue predominante en primavera.

Palabras clave: *Clostridium* spp.; Queso Colonia; Leche cruda.



## 7. SUMMARY

The production of milk in Uruguay feeds 20 million people annually, which is seven times more than the actual consumption of the country. From the total of milk producers, 27% correspond to artisanal cheesemaking farmhouses. In this study, milk and cheese samples with different ripening times were obtained from four different cheesemaking farmhouses. Seasonal dynamics of raw milk and artisanal cheese microflora was evaluated and quantified with emphasis on anaerobic sporulated microorganisms (*Clostridium* spp.). The effect of the thermal process of milk previous to cheese production on clostridial population, was evaluated as well. Raw milk microflora differs within producers, in some cases statistically significant, but without a clear tendency towards any of the specific microorganism's groups. No significant differences were found regarding the evaluation of the seasonal dynamics of the different microbial groups. Nevertheless, there is less variation in microbial counts between producers in autumn and greater variability for winter and summer samples. The presence of anaerobic spores was noticed throughout all of the milk samples in a range of  $3.02 \times 10^2$  and  $1.51 \times 10^4$  spores/L. There were significant differences observed within each producer on winter and spring samples. In most cases, spores present in milk remained in the cheese, with the exception on three cases in which the count of anaerobic spores was below the detection limit of the technique (<300 spores/L). A higher number of positive samples for the presence of anaerobic spores were found on cheese from producers that implement a previous thermal treatment to milk. *Clostridium* isolates were identified as *C. sporogenes* and *C. tyrobutyricum* showing a wide molecular diversity within each species, with a differential seasonal occurrence. *C. sporogenes* presented a homogeneous seasonal distribution, while *C. tyrobutyricum* was predominant in spring.

Keywords: *Clostridium* spp.; Colonia cheese; Raw milk.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Avila, M.; Gómez-Torres, N.; Hernández, M.; Garde, S. 2014. Inhibitory activity of reuterin, nisin, lysozyme and nitrite against vegetative cells and spores of dairyrelated Clostridium species. *International Journal of Food Microbiology*. 172: 70-75.
2. Bassi, D.; Puglisi, E.; Cocconcelli, P. S. 2015. Understanding the bacterial communities of hard cheese with blowing defect. *Food Microbiology*. 52: 106-118.
3. Beresford, T.; Fitzsimons N.; Brennan, N.; Cogan, T. 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*. 11: 259-274.
4. Bermúdez, J.; González, M. J.; Olivera, J. A.; Burgueño, J. A.; Juliano, P.; Fox, E. M.; Reginensi, S. M. 2016. Seasonal occurrence and molecular diversity of clostridia species spores along cheesemaking streams of 5 commercial dairy plants. *Journal of Dairy Science*. 99: 3358-3366.
5. Borbonet, S. 2001. Historia de la quesería en Uruguay. Montevideo, LATU.180 p.
6. Brandle, J.; Doming, K.; Kneifel, W. 2016. Relevance and analysis of butyric acid producing clostridia in milk and cheese. *Food Control*. 67: 96-113.
7. Chilbroste, P. 2015. Carga o productividad individual? Pasto o concentrado?: mitos y realidades en la intensificación de los sistemas de producción de leche en Uruguay. In: Jornadas Uruguayas de Buiatría (43as., 2015, Paysandú). Memorias. Paysandú, CMVP. pp.158-162.
8. Christiansen, P.; Petersen, M. H.; Kask, S.; Møller, P. L.; Petersen, M.; Nielsen, E. W.; Vogensen, F. K.; Ardö, Y. 2005. Anticlostridial activity of Lactobacillus isolated from semi-hard cheeses. *International Dairy Journal*. 15: 901 -909.
9. \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; Nielsen, E. W.; Ardö, Y. 2010. Potential of anticlostridial Lactobacillus isolated from cheese to prevent

blowing defects in semihard cheese. *International Journal of Dairy Technology*. 63: 544-551.

10. Cremonesi, P.; Vanoni, L.; Silveti, T.; Morandi, S.; Brasca, M. 2012. Identification of *Clostridium beijerinckii*, *Cl. butyricum*, *Cl. sporogenes*, *Cl. tyrobutyricum* isolated from silage, raw milk and hard cheese by a multiplex PCR assay. *Journal of Dairy Research*. 79: 318–323.
11. Cozzano, S.; Delgado, M. 2003. Estudio del proceso de producción del queso Colonia y evaluación de la retención de sólidos en tres queserías artesanales. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 74 p.
12. de Arauz, L. J.; Jozala, A. F.; Mazzola, P. G.; Vessoni Penna, T. C. 2009. Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends in Food Science and Technology*. 20: 146-154.
13. Doyle, C.; Gleeson, D.; Jordan, K.; Beresford, T.; Ross, R.; Fitzgerald, G.; Cotter, P. 2015. Anaerobics sporeformers and their significance with respect to milk and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*. 197: 77-87.
14. Driehuis, F.; Te Giffel, M. C. 2005. Butyric acid bacteria spores in whole crop maize silage. *In: International Silage Conference (14th., 2005, Belfast). Silage production and utilization: proceedings*. Wageningen, Wageningen Academic Publishers. p.271.
15. Durre, P. 2001. From Pandora`s box to cornucopia: clostridia-a historical perspective. *In: Durre, P. ed. Clostridia- Biotechnology and Medical Applications*. New York, NY, Wiley-VCH. pp. 1-17.
16. Düsterhöft, E. M.; Van den Berg, G. 2007. How may late blowing be avoided in Gouda-type cheeses? *In: McSweeney, P. L. ed. Cheese problems solved*. Boca Raton, FL, Woodhead. pp. 242-243.
17. Feligini, M.; Bramati, E.; Panelli, S.; Ghitti, M.; Sacchi, R.; Capelli, E.; Bonacina, C. 2014. One-year investigation of *Clostridium* spp. occurrence in raw milk and curd of Grana Padano cheese by the automated ribosomal intergenic spacer analysis. *Food Control*. 42: 71-77.

18. Gésan-Guiziu, G. 2010. Removal of bacteria, spores and somatic cells from milk by centrifugation and microfiltration techniques. *In*: Griffiths, M. W. ed. Improving the safety and quality of milk. Cambridge, Woodhead. pp. 349-372.
19. Gevers, D.; Huys, G.; Swings, J. 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*. 205: 31–36.
20. Guinee, T.; O'Callaghan, D. 2010. Control and prediction of quality characteristics in the manufacture and ripening of cheese. *In*: Law, B. A.; Tamime, A. Y. eds. Technology of cheesemaking. Chichester, Wiley-Blackwell. pp. 260-314.
21. INALE (Instituto Nacional de la Leche, UY). 2014. Encuesta lechera 2014. (en línea). Montevideo. s.p. Consultado oct. 2018. Disponible en <https://www.inale.org/innova.portal/v/4086/4/innova.front/primeros-resultados-de-la-encuesta-lechera-inale-2014.html>
22. \_\_\_\_\_. 2018. Uruguay lechero. (en línea). Montevideo. s.p. Consultado oct. 2018. Disponible en <https://www.inale.org/innovaportal/v/3204/4/innova.front/uruguay-lechero.html>
23. Julien, M.; Dion, P.; Lafrenière, C.; Antoun, H.; Drouin, P. 2008. Sources of Clostridia in raw milk on farm. *Applied Environmental Microbiology*. 74: 6348-6357.
24. Le Bourhis, A. G.; Dorè, J.; Carlier, J. P.; Chamba, J. F.; Popoff, M. R.; Thalozan, J. L. 2007. Contribution of *C. beijerinckii* and *C. sporogenes* in association with *C. tyrobutyricum* to the butyric fermentation in Emmental type cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 113: 154-163.
25. Lorenzo, L. G.; Raffo, S. M. 2015. *Lactococcus lactis* nativo: caracterización de la producción de bacteriocinas, propiedades tecnológicas y efecto antimicrobiano sobre *Listeria innocua*. Tesis Dr. en Ciencias Veterinarias. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Veterinaria. 66 p.
26. Martínez-Cuesta, M.; Bengoechea, J.; Bustos, I.; Rodríguez, B.; Requena, T.; Peláez, C. 2010. Control of late blowing in cheese by adding lacticin 3147- producing *Lactococcus lactis* IFPL 3593 to the starter. *International Dairy Journal*. 20: 18-24.

27. Mathot, A. G.; Beliard, E.; Thuault, D. 2003. *Streptococcus thermophilus* 580 produces a bacteriocin potentially suitable for inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in hard cheese. *Journal of Dairy Science*. 86: 3068-3074.
28. Matijasic, B. B.; Rajsp, M. K.; Perko, B.; Rogelj, I. 2007. Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri*. *International Dairy Journal*. 17: 157-166.
29. MGAP (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, UY). 2003. Decreto 65/003. Exigencias para establecimientos productores de quesos artesanales, acopiadores y transformadores de quesos. (en línea). Montevideo. s.p. Consultado may. 2019. Disponible en <http://www.impo.com.uy/bases/decretos-reglamento/65-2003>
30. Nieto, A. P. D. 2010. Diversidad genética y caracterización tecnológica de cepas autóctonas aisladas de queso de D.O. "Manchego", para su selección como cultivo iniciador. Tesis Doctoral. Ciudad Real, España. Universidad de Castilla - La Mancha. s.p.
31. Pahlow, G.; Munch, R. E.; Drirhuis, F.; Oude Elferink, S. J. W. H.; Spoelstra, S. F. 2003. Microbiology of ensiling. In: Al-Amoodi, L. ed. *Silage Science and Technology*. Madison, WI, ASA/CSSA/SSSA. pp. 31-93.
32. Rainey, F. A.; Hollen, B. J.; Small, A. 2009. *Clostridium*. In: Whitman, W. B. ed. *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*. New York, Springer. pp. 736-827.
33. Reginensi, S. M.; Olivera, J. A.; Bermúdez, J.; González, M. J. 2016. *Lactobacillus* in the dairy industry: from natural diversity to biopreservative resources. In: Castro-Sowinski, S. ed. *Microbial models: from environmental to industrial sustainability, Microorganisms for sustainability*. Singapore, Springer. pp. 57 - 81.
34. Reindl, A.; Dzieciol, M.; Hein, I.; Pagner, M.; Zanger, P. 2014. Enumeration of clostridia in goat milk using an optimized membrane filtration technique. *Journal of Dairy Science*. 97: 6036-6045.
35. Schöbitz, R.; Uribe, C.; Molin, L.; Espina, F. 2005. Control de desarrollo de bacterias ácido butíricas en queso tipo gouda empleando

diferentes concentraciones de nitrato y temperaturas de maduración. *Agro Sur*. 33: 48-57.

36. Sheehan, J. J. 2013. Milk quality and cheese diversification. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*. 52: 243 - 253.
37. Su, Y-C.; Ingham, S. C. 2000. Influence of milk centrifugation, brining and ripening conditions in preventing gas formation by *Clostridium* spp. In gouda cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 54: 147-154.
38. Thomas, J.; Dalla Fontana, L.; Ramos, E.; Thomas, J.; Demaria, M.; Costamagna, D.; Faggiano, M.; Bonzi, E. 2012. Factores de riesgo de contaminación de la leche con bacterias esporuladas (*Clostridium*) en establecimientos de la provincia de Santa Fe. *Revista FAVE. Ciencias Agrarias*. 11: 19-28.
39. Tůma, Š.; Kučerová, K.; Plocková, M. 2008. Isolation of anticlostridially active lactobacilli from semi-hard cheese. *Czech Journal of Food Science*. 26: 324 -332.
40. Vissers, M.; Driehuis, F.; te Giffel, M.; De Jong, P.; Lankveld, J. 2006. Improving farm management by modeling the contamination of farm tank milk with butyric acid bacteria. *Journal of Dairy Science*. 89: 850-858.
41. \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. 2007a. Concentrations of butyric acid bacteria spores in silage and relationships with aerobic deterioration. *Journal of Dairy Science*. 90: 928-936.
42. \_\_\_\_\_.; te Giffel, M.; Driehuis, F.; De Jong, P.; Lankveld, J. 2007b. Minimizing the level of *Bacillus cereus* spores in farm tank milk. *Journal of Dairy Science*. 90: 3286-3293.
43. Weisburg, W. G.; Barns, S. M.; Pelletier, D. A.; Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 173: 697–703.
44. Wiegel, J.; Tanner, R.; Rainey, F. 2006. An introduction to the family Clostridiaceae. In: Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K. H.; Stackebrandt, E. eds. *The prokaryotes*. New York, Springer. pp. 654-678.