



**Tesis de Maestría en Biotecnología  
Facultad de Ciencias  
Universidad de la República**

**Estudio de la diversidad genética y propiedades  
biotecnológicas de aislamientos de *Bacillus  
licheniformis* provenientes de polvos lácteos  
comerciales**

**Lic. Marcela González**

**Tutor: Dra. Stella Reginensi  
Co-Tutor: Ing. Agr. Jorge Bermúdez**

**Tribunal: Dra. Silvia Batista  
Dra. Susana Castro  
Dra. Fernanda Azpiroz**

**Unidad de Tecnología de los Alimentos  
Facultad de Agronomía  
Montevideo, Uruguay  
2013**



## **Agradecimientos**

En primer lugar quiero agradecerles a Stella y Jorge por haberme orientado durante estos años, por alentarme día a día y por la confianza puesta en mí.

A la Unidad de Tecnología de los Alimentos, Jorge, Nancy, y a todos los estudiantes que pasaron por allí, que de una manera u otra me apoyaron en todo este proceso.

A la CSIC por la financiación.

Al tribunal por los aportes.

Esta tesis tampoco habría sido posible sin el apoyo de Gustavo, de mis padres, y de toda mi familia y amigos.

No me queda más que dedicarles este trabajo a mis dos princesitas, Martina y Julieta, que me dan fuerzas día a día con esa alegría y energía que contagian.

## INDICE

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Introducción</b> .....	2
1. Industria láctea y su importancia a nivel nacional .....	2
1.1. Producción láctea en Uruguay .....	2
1.2. La leche en polvo .....	3
1.3. Calidad láctea y los polvos lácteos .....	5
2. Bacilos termofílicos esporulados, y su importancia en la industria láctea .....	8
2.1. Caracterización del género <i>Bacillus</i> .....	11
2.2. Microorganismos esporulados contaminantes de polvos lácteos .....	13
3. Biofilms microbianos en la industria láctea .....	17
3.1. Biofilms asociados a la producción de polvos lácteos .....	19
3.2. Matriz del biofilm .....	23
4. Microflora de los polvos lácteos .....	24
4.1. <i>Bacillus licheniformis</i> .....	27
4.1.1. Esporulación y resistencia a los tratamientos térmicos .....	29
4.1.2. Capacidad de adhesión .....	32
4.1.3. Producción de enzimas hidrolíticas extracelulares .....	34
<b>Hipótesis de trabajo</b> .....	38
<b>Objetivo general</b> .....	38

## CAPITULO 1

**Colección y caracterización de aislamientos de *B. licheniformis* provenientes de polvos lácteos nacionales elaborados en otoño e invierno**

Objetivos específicos .....	39
1. Materiales y métodos .....	40
1.1. Procesamiento de muestras e identificación de aislamientos .....	40
1.2. Caracterización genotípica y criterios de selección de aislamientos para análisis posteriores .....	41
1.2.1. Extracción de ADN genómico .....	41
1.2.2. Análisis de RAPD-PCR .....	42
1.2.3. Identificación por análisis de la secuencia del gen 16S rADN .....	42
1.2.4. Aislamiento y secuenciación de la banda de 650pb .....	44
2. Resultados y discusión .....	44
2.1. Complementación de la colección de aislamientos de <i>B. licheniformis</i> provenientes de polvos lácteos elaborados en otoño e invierno .....	44
2.2. Caracterización genotípica de los aislamientos y evaluación de la distribución estacional .....	46
2.3. Relaciones filogenéticas .....	51
2.4. Identificación de la banda de 650pb característica de la variante F2 .....	53
2.5. Selección de aislamientos representativos para los ensayos caracterización y propiedades tecnológicas .....	54
3. Conclusiones.....	56

## **CAPITULO 2**

### **Determinación del crecimiento en el rango de temperaturas entre 37 y 65°C, y su relación con la producción de exopolisacárido (EPS)**

Objetivos específicos .....	57
1. Materiales y métodos .....	58

1.1. Determinación del crecimiento .....	58
1.2. Producción celular y de exopolisacárido .....	59
2. Resultados y discusión .....	60
2.1. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento .....	60
2.2. Evaluación de la cinética de crecimiento y de los parámetros $\mu$ y tD .....	62
2.3. Producción celular y de exopolisacárido .....	66
3. Conclusiones .....	70

### **CAPITULO 3**

#### **Evaluación de la capacidad proteolítica, lipolítica y amilolítica**

Objetivos específicos .....	72
1. Materiales y métodos .....	73
1.1. Evaluación semicuantitativa de la capacidad proteolítica, lipolítica y amilolítica .....	73
1.2. Determinación de la actividad proteasa .....	74
2. Resultados y discusión .....	75
2.1. Evaluación de la actividad amilolítica .....	76
2.2. Evaluación de la actividad lipolítica .....	79
2.3. Evaluación de la actividad proteolítica .....	82
3. Conclusiones .....	88

### **CAPITULO 4**

#### **Determinación de las propiedades de adhesión “in vitro”**

Objetivos específicos .....	90
1. Materiales y métodos .....	91
2. Resultados y discusión .....	92
3. Conclusiones .....	100

## CAPITULO 5

### Diseño de cebadores específicos y su utilización en PCR cuantitativa

Objetivos específicos .....	101
1. Materiales y métodos .....	102
1.1. Diseño de cebadores específicos que permitan discriminar las variantes de <i>B. licheniformis</i> en el total de la población .....	102
1.2. Aproximación al uso de los cebadores diseñados en el desarrollo de un método de cuantificación basado en PCR cuantitativa .....	103
2. Resultados y discusión .....	105
2.1 Diseño de cebadores específicos para <i>B. licheniformis</i> .....	105
2.2 Evaluación de la especificidad de los cebadores diseñados .....	107
2.3 Ensayo de cuantificación con los cebadores BLICH1 y SPOA1 ...	109
3. Conclusiones .....	115
<b>Conclusiones finales y perspectivas .....</b>	<b>117</b>
<b>Anexo 1 .....</b>	<b>120</b>
1. Pruebas bioquímicas primarias .....	120
1.1 Tinción de Gram .....	120
1.2 Prueba de enzima catalasa .....	121
1.3 Prueba de enzima oxidasa .....	121
2. Buffers y soluciones .....	122
2.1 5X Tris-borato-EDTA (TBE) .....	122
2.2 Buffer fosfato salino ( <i>Phosphate buffered saline</i> , PBS) .....	122
<b>Anexo 2 .....</b>	<b>123</b>
1. Alineamiento de secuencias utilizadas para el diseño de cebadores específicos para el gen 16s ARNr de <i>B. licheniformis</i> .....	123
2. Alineamiento de secuencias utilizadas para el diseño de cebadores específicos para el gen <i>spoOA</i> de <i>B. licheniformis</i> .....	126

<b>Referencias bibliográficas .....</b>	<b>128</b>
---	------------

## INDICE DE FIGURAS

### Introducción

<b>Figura 1.</b> Diagrama esquemático del proceso de elaboración de polvos lácteos .....	17
--	----

### CAPITULO 1

<b>Figura 1.</b> Morfología de <i>B. licheniformis</i> .....	45
<b>Figura 2.</b> Perfiles de RAPD de aislamientos seleccionados de <i>B. licheniformis</i> .....	47
<b>Figura 3.</b> Árbol filogenético basado en secuencias del gen 16S rRNA de aislamientos de <i>B. licheniformis</i> y otros microorganismos contaminantes de polvos lácteos .....	52

### CAPITULO 2

<b>Figura 1.</b> Curvas de crecimiento de aislamientos representativos de los genotipos F (A y B) y G (C y D), a 37 y 55°C, respectivamente.....	62
<b>Figura 2.</b> Producción de EPS de los aislamientos de <i>B. licheniformis</i> agrupados por genotipo .....	67
<b>Figura 3.</b> Estructura macroscópica de los EPS producidos por distintos aislamientos de <i>B. licheniformis</i> .....	69

### CAPITULO 3

<b>Figura 1.</b> Ensayo cualitativo de actividad enzimática .....	75
<b>Figura 2.</b> TAA de todos los aislamientos ordenados por genotipo .....	77
<b>Figura 3.</b> TAL de todos los aislamientos ordenados por genotipo .....	80
<b>Figura 4.</b> TAP de los tres genotipos a 37 y 55°C .....	84

<b>Figura 5.</b> Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica medida con el ensayo de azocaseína utilizando extracto crudo de un cultivo de 30 horas.....	86
--	----

#### **CAPITULO 4**

<b>Figura 1.</b> Formación de biofilm en la interfase líquido-aire de cultivos de <i>B. licheniformis</i> crecidos durante 24 hs. a 37°C .....	93
<b>Figura 2.</b> Formación de biofilm en placas de poliestireno a las 24 horas de cultivo.....	95
<b>Figura 3.</b> Microscopía de contraste de fase (100x) de aislamientos de <i>B. licheniformis</i> con distintas horas de crecimiento a 37°C .....	98

#### **CAPITULO 5**

<b>Figura 1.</b> Productos de amplificación obtenidos utilizando los cinco pares de cebadores diseñados para <i>B. licheniformis</i> .....	107
<b>Figura 2.</b> Ensayo de especificidad de los cebadores BLICH1, BLICH2 y SPOA1. ....	108
<b>Figura 3.</b> Amplificación de aislamientos de <i>B. licheniformis</i> y otros microorganismos esporulados contaminantes de polvos lácteos con los cebadores BLICH1 (A) y SPOA1 (B).....	111
<b>Figura 4.</b> Curvas estándar obtenidas de diluciones seriadas de ADN genómico de cultivos de <i>B. licheniformis</i> . ....	113

## INDICE DE TABLAS

### Introducción

<b>Tabla 1.</b> Características de algunas especies de bacilos termófilos contaminantes de polvos lácteos .....	14
---	----

### CAPITULO 1

<b>Tabla 1.</b> Procedencia de los aislamientos seleccionados para los ensayos planificados en la fase experimental .....	55
---	----

### CAPITULO 2

<b>Tabla 1.</b> Evaluación del efecto de la temperatura sobre el crecimiento en placa .....	61
<b>Tabla 2.</b> Velocidad de crecimiento $\mu$ y tD para los tres genotipos .....	63
<b>Tabla 3.</b> Valores de tD de todos los aislamientos a las distintas temperaturas ensayadas .....	65
<b>Tabla 4.</b> Producción de EPS (mg/mg bacteria) de los distintos genotipos de <i>B. licheniformis</i> .....	66

### CAPITULO 3

<b>Tabla 1.</b> Evaluación cualitativa de la actividad enzimática de los distintos genotipos de <i>B. licheniformis</i> .....	76
---	----

### CAPITULO 4

<b>Tabla 1.</b> Capacidad de adhesión de los distintos genotipos .....	94
--	----

### CAPITULO 5

<b>Tabla 1.</b> Características de los cebadores diseñados para el ensayo de cuantificación mediante real time PCR .....	106
<b>Tabla 2.</b> Valores de Ct en el ensayo de especificidad de los cebadores BLICH1 y SPOA1 .....	110

<b>Tabla 3.</b> Valores de Ct correspondientes a las curvas estándar resultantes de la amplificación con los cebadores BLICH1 y SPOA1 .....	113
---	-----

## Resumen

La leche en polvo constituye el 40% de la producción láctea exportada, lo que indica la importancia económica para la industria uruguaya. Las bacterias termodúricas o termofílicas esporuladas representan la mayor parte de la microflora contaminante en este producto. *Bacillus licheniformis* es el principal contaminante de los polvos lácteos uruguayos. La diversidad genética de la población de *B. licheniformis* se evaluó por RAPD-PCR, predominando los genotipos F1 y F2, mientras que el genotipo G es minoritario. Treinta y dos aislamientos de *B. licheniformis* pertenecientes a los tres genotipos se caracterizaron fenotípicamente. El rango de temperatura y cinética de crecimiento, la producción de exopolisacárido a diferentes temperaturas, la capacidad de adhesión y producción de enzimas hidrolíticas se evaluaron respecto a su relación con la diversidad genotípica. Si bien no se observaron diferencias significativas entre los genotipos para las características ensayadas, la diversidad observada entre los aislamientos indica una gran heterogeneidad dentro de cada grupo. Varios cebadores específicos para los genes 16s ARN y *spoOA* de *B. licheniformis* se diseñaron y se evaluaron en ensayos de cuantificación mediante PCR cuantitativa utilizando SYBR® GREEN como fluoróforo en cultivos puros. Teniendo en cuenta la especificidad, la sensibilidad y la eficiencia de los cebadores ensayados, el par BLICH1 es el que muestra mayor potencial como herramienta para la cuantificación de cepas de *B. licheniformis*.

## **Introducción**

### **1. Industria láctea y su importancia a nivel nacional**

#### **1.1 Producción láctea en Uruguay**

La producción mundial de productos lácteos está altamente concentrada en los países desarrollados, la Unión Europea, Estados Unidos y Oceanía (Nueva Zelanda y Australia) principalmente, mientras que los países en desarrollo como India y China, han aumentado considerablemente su producción (OECD/FAO 2011). Los productos que más se comercializan internacionalmente son la leche en polvo y la manteca, aunque los quesos están teniendo una evolución creciente en el mercado.

En la región, Argentina, Brasil y Uruguay representan el 2,1%, 1,1% y 0,3% de la producción mundial de lácteos, respectivamente. Estos porcentajes han ido creciendo en los últimos años debido al gran dinamismo que presentó la producción de lácteos en los tres países.

En Uruguay aproximadamente el 30% de la leche industrializada se comercializa en el mercado interno, y el resto se exporta a más de 80 destinos, siendo los principales México, Venezuela, Brasil, Cuba y EE.UU., entre otros. Durante el año 2011 se exportaron en el rubro lácteos 712 millones de dólares,

representando un 8.9% del total de las exportaciones nacionales (DIEA - MGAP, 2012).

En el año 2011 Uruguay produjo y remitió 1843 millones de litros de leche a las plantas procesadoras. A partir de la leche remitida se procesan 83.560 toneladas de leche en polvo (43%), 67.869 toneladas de quesos (33.6%) y 277 millones de litros de leche fluida (pasteurizada, media y larga vida) (15%). El resto correspondió a grasas (manteca y "*butter oil*") y otros productos lácteos (yogur, dulce de leche, helados, caseinato) (DIEA - MGAP, 2012).

## **1.2 La leche en polvo**

La leche en polvo se obtiene después de la eliminación de la mayor parte del agua presente en la leche cruda, dejando un máximo del 5%, mientras que el restante 95% se compone de proteínas, lactosa, grasa y sales minerales. Los tipos más frecuentes de leche en polvo desde el punto de vista comercial son: leche en polvo entera, con un mínimo del 26% de materia grasa en peso, y leche en polvo desnatada, con un máximo del 1,5% de grasa en peso. La primera se conserva por un período máximo de seis meses, ya que al ser tan alto el contenido en grasa, ésta se va deteriorando durante el almacenamiento, llegando a notarse el sabor rancio en la leche reconstituida. La leche en polvo desnatada se puede conservar bien por un período de hasta tres años.

La leche en polvo representa el 43% de la producción total de productos lácteos y es el principal producto exportable de nuestro país, junto con los quesos y la manteca (DIEA-MGAP, 2012). De un total de 83.560 toneladas de leche en polvo producidas en el año 2011, el 91.9% se destinó al mercado externo, representando el 40.3% de las exportaciones de productos lácteos en volumen. Si bien el precio internacional de la leche en polvo ha tenido fluctuaciones en los últimos años, sigue siendo un producto rentable para nuestra industria.

Es clara la importancia de la industria láctea en nuestro país y las proyecciones de los mercados internacionales indican buenas perspectivas en los próximos 10 años. La producción mundial de leche en polvo entera, manteca, y productos lácteos frescos tendrá un crecimiento estimado de 26% en 2020, mientras que el queso y leche descremada en polvo incrementaría un 19% y un 15%, respectivamente, en comparación con el período base, 2008-2010 (OECD/FAO, 2011). Las inversiones en infraestructura de nuestra industria en los últimos años incrementaron la capacidad instalada para estos productos. La proporción de la producción láctea exportable continuará en aumento y con ello la dependencia de los mercados externos, por lo cual es necesaria la mejora constante en la calidad de los productos exportables para incrementar la competitividad y la posibilidad de inserción en nuevos mercados.

### **1.3 Calidad láctea y los polvos lácteos**

De acuerdo a la Norma ISO 9001:2000, la calidad es el grado en que las características de un producto, de un servicio, de un sistema, o de una organización, cumplen con determinados requisitos. Estos requisitos pueden ser fijados por el cliente, el mercado, o provenir de normas legales fijadas por las regulaciones de un país o de una región, y la calidad se asocia con el grado de cumplimiento de esos requisitos. Cuando hablamos de alimentos le llamamos calidad al conjunto de características que debe reunir ese alimento para ser apto para el uso seguro por el consumidor para el cual está destinado. La calidad de un alimento comprende diferentes parámetros: calidad nutricional, calidad sensorial y calidad sanitaria o inocuidad.

Cuando nos referimos a la industria láctea y a la calidad de sus productos, varios parámetros son importantes y deben tenerse en cuenta desde el establecimiento lechero hasta su transformación, y posterior comercialización. La calidad composicional de la leche o sus productos, está referida al contenido de grasa y de proteína, que son los principales componentes de la materia seca de la leche. Esto determina el pago de la misma al productor, y está relacionado con el rendimiento de productos comercializables. Los dos componentes son determinantes del contenido de sólidos totales de la leche y desde el punto de vista industrial una mayor concentración de sólidos reduce los costos de transporte y aumenta la eficiencia de los procesos industriales. La calidad sensorial puede afectarse en el tambo por el manejo de la alimentación

del rodeo lechero, pero también por la presencia de enzimas y esporas microbianas termorresistentes. Este último elemento tiene relación directa con otro concepto importante que es “la inocuidad”. La inocuidad de un alimento significa la ausencia de patógenos y/o sus toxinas, adulterantes químicos, y de cualquier otra sustancia que pueda transformar el alimento en nocivo para la salud del consumidor. Esto último tiene su impacto en el consumidor en relación a la salud, pero también importa en las medidas de manejo de la leche para la producción de productos lácteos, por ejemplo en la producción de quesos o cuando los tratamientos térmicos son elevados y puedan alterar la estabilidad de la leche.

Los grandes causantes de problemas en la calidad de la leche y sus productos son los microorganismos que pueden estar presentes en el producto, o bien sustancias producidas por los mismos que pueden representar un riesgo para el consumidor o provocar deterioro del producto final.

La leche es un sustrato adecuado y altamente favorable para el crecimiento de microorganismos, pero las condiciones de su procesamiento pueden ejercer presiones selectivas sobre el tipo de contaminantes presentes en el producto final. En el proceso de producción de polvos lácteos se reduce el contenido de agua de la leche a través de tratamientos térmicos de evaporación a temperaturas entre 45 y 75°C bajo condiciones de vacío, con acondicionamientos previos entre 70 y 120°C (precalentador) de acuerdo al producto producido (*low, medium o high heat*). Este rango de temperaturas es

óptimo para el crecimiento de microorganismos termófilos y termodúricos, principalmente aquellos que son capaces de sobrevivir a la pasteurización, en especial los que son capaces de formar esporas. Posteriormente a las ocho horas del procesamiento en línea, el recuento de microorganismos en el producto final aumenta exponencialmente y alcanza niveles que exceden los límites establecidos por las regulaciones, lo cual implica una disminución de la vida útil y desvaloriza el producto, limitando en esta forma el tiempo de corrida diaria entre dos limpiezas del equipo.

La producción de enzimas extracelulares es un problema adicional, consecuencia de la presencia de microorganismos contaminantes. La producción de enzimas hidrolíticas extracelulares microbianas, tales como proteasas, lipasas y lecitinasas puede ocasionar el deterioro de la leche (Meer et al., 1991). Estas enzimas son causantes de sabores desagradables y defectos estructurales en la leche y sus productos. La actividad proteolítica es responsable de los sabores amargos, mientras que los sabores frutales o rancios se producen por la acción de las enzimas lipolíticas (Meer et al., 1991). Por otra parte, la presencia de enzimas puede limitar el uso de la leche como ingrediente de otros productos alimenticios.

Las especificaciones microbiológicas estipuladas para la leche en polvo son generalmente definidas por el importador. Para microorganismos aerobios totales los límites varían entre  $< 10.000 - 50.000$  UFC/g, coliformes desde no detectable hasta menos de 10 UFC/g, hongos y levaduras  $< 50-100$  UFC/g, y

ausencia de *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Listeria* sp. y Staphylococci coagulasa negativo. Las especificaciones para los límites aceptables de microorganismos esporulados también son determinadas por el cliente, el rango para microorganismo mesófilos es entre 60 a 800 esporas/g, y para termófilos entre 10-200 esporas/g.

## **2. Bacilos termofílicos esporulados, y su importancia en la industria láctea**

Los microorganismos formadores de esporas tienen una ventaja especial entre la microflora total de la leche debido a su capacidad de sobrevivir a tratamientos térmicos de la misma y posteriormente aparecer en los productos finales. Estos microorganismos esporulados pueden ser anaerobios estrictos como los pertenecientes al género *Clostridium*, o anaerobios facultativos pertenecientes al género *Bacillus*. Entre los anaerobios las especies más importantes son *Clostridium butyricum*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium beijerinckii* y ocasionalmente *Clostridium botulinum*, pero su abundancia es relativa debido a la necesidad de nichos con ausencia de oxígeno. Las cuatro primeras especies mencionadas son las responsables del defecto de “hinchazón tardía” en quesos madurados, y *C. botulinum* se asocia con enfermedades de origen alimentario (botulismo) producidas por una neurotoxina.

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 psicrotolerante más relevante por ser patógena para el ser humano, causando síndromes eméticos y diarreicos de origen alimentario (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*, *Bacillus coagulans*, *B. pumilus* y *B. subtilis* (Crielly et al., 1994; Ronimus et al., 2003, Scheldeman et al., 2005).

Las bacterias aeróbicas esporuladas presentan un problema para la industria láctea. Estas bacterias se encuentran en leche cruda en sus dos formas, vegetativa y espora. Las vías de contaminación son diversas: el agua, el suelo, el aire, las heces, la ubre, los equipos de ordeño, y en general el ambiente del tambo. Una vez que estas bacterias o esporas están en la leche no pueden ser eliminadas por los tratamientos térmicos convencionales, tales como la pasteurización (por ejemplo, 15 s a 72°C), e incluso algunos son capaces de

sobrevivir a tratamientos UHT (*ultra high temperature*, 2-5 s a 140-145°C) (Scheldeman et al., 2005).

La tolerancia, la adaptación o la resistencia de las esporas o células vegetativas de algunas especies bacterianas a las condiciones de baja temperatura, pH bajo y a tratamientos a altas temperaturas (UHT), que se presumía tenían la capacidad de detener o inactivar el crecimiento microbiano, son de gran preocupación para la industria láctea. Bellow et al. (2007) informaron que la presencia de *Bacillus* spp. en muestras de leche no solo disminuía su vida útil sino que también observaron diferencias significativas en el contenido de grasas y proteínas de la leche.

Además de la exigencia de mantener los recuentos de microorganismos esporulados dentro de los límites establecidos y/o requeridos por cada país, estos microorganismos pueden ser causantes de otros tres efectos perjudiciales sobre la inocuidad y la calidad del producto: i) la producción de toxinas, ii) la producción de enzimas hidrolíticas, y iii) la interferencia en la fabricación de quesos o subproductos (De Jonghe et al., 2010).

Aunque otras especies de *Bacillus*, distintas a *B. cereus*, son consideradas de poca importancia en patologías de origen alimentario varios autores han informado sobre la producción de toxinas, algunas termoestables, por parte de cepas de *Brevibacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lentus*, *B. subtilis*, *B.*

*licheniformis*, *B. pumilus* y *B. amyloliquefaciens* (Beattie y Williams, 1999, Lindsay et al., 2000).

La producción de enzimas hidrolíticas (proteasas, lipasas, y lecitinasas), que se producen tan pronto como las esporas germinan, activadas por tratamientos térmicos como la pasteurización, pueden ocasionar el deterioro de la leche o de los productos derivados. Trabajos previos han informado la estabilidad de las enzimas a los tratamientos térmicos aplicados en el procesamiento de productos lácteos (ej., pasteurización y UHT), y la permanencia de esta actividad enzimática en leche UHT incluso luego de seis meses de almacenamiento a 25°C (Celestino et al., 1997b). Chen et al. (2004) informaron la estabilidad al calor de proteasas y lipasas producidas por cepas de *Bacillus* spp. aisladas de polvos lácteos, manteniendo más del 50% de su actividad original luego de un tratamiento a 90°C por 2 minutos. La actividad de proteasas y lipasas que resisten los tratamientos térmicos puede causar cambios en la funcionalidad y sabor de los productos lácteos durante su almacenamiento o cuando éstos son usados como ingredientes de productos alimenticios, causando pérdidas económicas significativas.

## **2.1 Caracterización del género *Bacillus***

Los estudios taxonómicos presentan evidencia de la diversidad del género *Bacillus* (Ash et al., 1991). Durante los años 1980s se debatió si se trataba de un género o de varios, y hasta la fecha se han realizado muchos trabajos que

intentan definir especies nuevas o reagrupar especies existentes. Varios géneros nuevos se han definido a partir de microorganismos previamente identificados como *Bacillus* y otros géneros se han creado para aislamientos previamente asignados a *Bacillus* basándose en la vieja clasificación morfológica y fisiológica. Nuevas especies de microorganismos esporulados halófilos, acidófilos, alcalófilos y termófilos han sido aislados de ambientes extremos y se han redefinido los grupos filogenéticos como géneros separados. Teniendo en cuenta el actual ritmo de las investigaciones, se podría esperar que la lista de géneros tipo-*Bacillus* aprobados siga en expansión.

Las bacterias formadoras de esporas pertenecen al filum Firmicutes, y actualmente la familia *Bacillaceae* se ha dividido en 18 géneros, entre los que se encuentran: *Bacillus*, *Alicyclobacillus*, *Aneurinibacillus*, *Brevibacillus*, *Geobacillus*, *Gracibacillus*, *Paenibacillus*, *Salibacillus*, *Ureibacillus*, *Virgibacillus* y *Anoxybacillus*, entre otros (Fritze, 2004).

El género *Bacillus* es el que comprende la mayor cantidad de especies y esta compuesto por bacterias Gram positivas en forma de bastón. Son aerobios o anaerobios facultativos y presentan gran diversidad fisiológica con respecto a parámetros de crecimiento como temperatura, pH y salinidad. En condiciones de estrés forman una endospora de ubicación central o sub-terminal, que no deforma la estructura de la célula. Dicha forma esporulada es resistente a las altas temperaturas, a la desecación y a muchos desinfectantes químicos.

La mayoría de las especies dan positivo a la prueba de la catalasa y son saprófitas. Viven en el suelo, agua del mar y ríos, aparte de los alimentos que contaminan. Aunque generalmente son móviles, con flagelos peritricos, algunas especies de interés sanitario como *Bacillus anthracis* (causante del carbunco) son inmóviles.

## **2.2 Microorganismos esporulados contaminantes de polvos lácteos**

Diferentes especies de los géneros *Alicyclobacillus*, *Ureibacillus*, *Bacillus*, *Anoxybacillus* y *Geobacillus* han sido definidas como termófilas estrictas o facultativas, siendo especies de los últimos tres géneros las importantes en la contaminación de productos lácteos. Generalmente los miembros del género *Bacillus* y otros bacilos termófilos estrictos (*Anoxybacillus* y *Geobacillus*) tienen necesidades nutricionales simples, que no requieren de aminoácidos específicos para el crecimiento siendo capaces de crecer en medios simples tales como triptona soya agar (TSA). La temperatura óptima de crecimiento varía entre 37 y 65°C, pero esta característica es dependiente de especie y cepa. La Tabla 1 muestra algunas características adicionales de las principales especies.

**Tabla 1.** Características de algunas especies de bacilos termófilos contaminantes de polvos lácteos.

	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Temp. Máx. de crecimiento (°C)	65-72	65-68	50-55	45-55
Temp. Mín. de crecimiento (°C)	30-38	37	15	5-20
Crecimiento anaerobio	Si	No	No	No
Rango de pH	6.0-9.0	6.0-8.0	5.5-8.5	5.5-8.5
Posición de la spora	Terminal	Terminal	Sub-terminal/central	Sub-terminal/central
Hidrólisis de caseína	Variable	Variable	Si	Si
Hidrólisis de almidón	Variable	Si	Si	Si

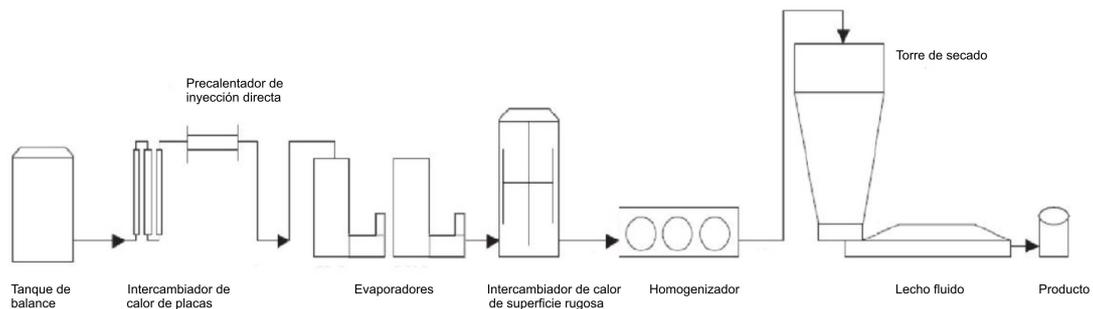
(modificada de Burgess et al., 2010)

La presencia de estos microorganismos se utiliza como indicador de: higiene de la planta de procesamiento, uso de buenas prácticas de manufactura y calidad del polvo lácteo (Stadhouders y Hup, 1982). Varios trabajos informaron la contaminación de polvos lácteos por especies termofílicas de *Bacillus* en plantas de procesamiento en Nueva Zelanda (Ronimus et al., 2003; Rüeckert et al., 2004; Scott et al., 2007), en California (EE.UU.) (Bienvenue et al., 1999), China (Yuan et al., 2012) y en polvos comerciales de Uruguay (Reginensi et al., 2011). Rüeckert et al. (2004) realizaron un relevamiento de polvos comerciales producidos en 18 países y encontraron que la cantidad de microorganismos termofílicos contaminantes se limitaba a unas pocas especies. Tres fueron las especies predominantes *A. flavithermus*, *G. stearothermophilus* y *B. licheniformis*. Esta última especie se encontró presente en 27 de las 28 muestras analizadas. *B. subtilis* se detectó como un segundo grupo de muy poca incidencia. Otras especies como *Ureibacillus thermosphaericus*, *B. coagulans*, *B. circulans* y *B. pumilus* representaron un grupo minoritario que comprendía menos del 5% de los aislamientos.

Estos bastones termofílicos asociados con los polvos lácteos son capaces de sobrevivir la pasteurización y soportar las temperaturas aplicadas en la línea de producción, lo cual les otorga una ventaja competitiva frente a otros microorganismos de la leche, por lo que han sido identificados como contaminantes industriales importantes en el proceso de producción de polvos lácteos (Ronimus et al., 2003, Reginensi et al., 2011). Los conteos iniciales en leche cruda son bajos ( $10^1$ - $10^2$  UFC/ml), pero pueden llegar a concentraciones elevadas en polvos lácteos debido a su capacidad de crecer en las superficies de los evaporadores y otros sitios de transferencia de calor en la línea de proceso formando un biofilm, y favoreciendo la biotransferencia al producto durante su pasaje. La capacidad de formar esporas y la alta tasa de supervivencia de estos microorganismos al tratamiento térmico, es sin duda otro de los factores principales que determinan la predominancia de una microflora con mayoría de bacterias del género *Bacillus* como las colonizadoras en estos procesos. El número de bastones termofílicos es un factor a tener en cuenta al momento de calificar la calidad del polvo lácteo, y pueden participar en el posterior deterioro de la leche reconstituida (Kwee et al., 1986).

Durante el proceso de elaboración de polvos lácteos la leche se trata térmicamente; usualmente la pasteurización se sigue con un tratamiento térmico de baja, media o alta intensidad, dependiendo del destino y aplicación del polvo lácteo. Las células vegetativas y esporas de estos microorganismos son capaces de sobrevivir estos tratamientos térmicos y pasar a las etapas de

evaporación. En los evaporadores, la leche se expone a temperaturas entre 45 y 75°C, óptimas para el crecimiento de microorganismos termófilos. Posteriormente a la evaporación, la leche se homogeniza y finalmente el concentrado obtenido (48-49 % de sólidos totales) se atomiza para el secado por aire caliente (Fig. 1), la pérdida final de agua tiene lugar en el lecho fluido. El tiempo de residencia de la leche en la línea de producción, desde el silo de almacenamiento hasta el secado por pulverización no excede los 30 minutos, y la línea está activa durante 16-20 horas hasta su detención para aplicar las rutinas de limpieza "*cleaning in place*" (CIP, por sus siglas en inglés). En este proceso la leche cruda se concentra aproximadamente 10 veces, por lo que el número esperado de esporas presentes en el producto final no debería exceder las 100-1000 UFC/g. La presencia de microorganismos contaminantes en el producto final puede ser sólo de dos orígenes: de la leche cruda recibida en la planta de procesamiento, o del crecimiento microbiano en la propia planta. Los recuentos de esporas por encima del máximo esperado es un indicativo de crecimiento microbiano en las líneas de producción. El corto plazo de residencia de la leche no permite un crecimiento sustancial de las bacterias en el fluido, por lo que la formación de biofilm en el equipamiento y su desprendimiento serían la fuente principal de la contaminación del producto final (Flint et al., 2001, Parkar et al., 2003).



**Figura 1.** Diagrama esquemático del proceso de elaboración de polvos lácteos (tomada de Scott et al. 2007).

Aunque la contaminación de la leche con estas bacterias ocurre en su etapa inicial en el tambo (Crielly et al., 1994), la contaminación asociada a la planta procesadora es importante (Rüeckert et al., 2004; Scott et al., 2007). Scott et al. (2007) informaron sobre la presencia de esporas y células vegetativas de microorganismos termófilos en los evaporadores y precalentadores de la línea de producción de polvos lácteos. Este estudio confirmó que la aparición de recuentos altos de microorganismos termófilos en polvos lácteos es el resultado de la esporulación en las líneas de procesamiento. Esta proliferación bacteriana se presenta en la forma de biofilm.

### 3. Biofilms microbianos en la industria láctea

Los biofilms se definen como estructuras de células microbianas asociadas por una matriz extracelular producida por las mismas, unidos en forma estrecha a una superficie y en activo crecimiento (Hood y Zottola, 1997). La importancia de los biofilms en la industria láctea se debe a que estos agregados bacterianos

son más difíciles de remover que las células planctónicas, y su desprendimiento contribuye a la contaminación exponencial de la leche en polvo hacia el final de la corrida diaria, afectando la higiene y valor comercial de los mismos (Flint et al. 1996). Desde el punto de vista industrial también se afectan los costos por obstrucciones en los equipos, corrosión y deterioro del equipamiento.

Los biofilms pueden estar constituidos por una o varias especies bacterianas asociadas a una superficie embebidas en una matriz de sustancias extracelulares poliméricas, y es aceptado como un estadio estable dentro del ciclo biológico de las bacterias que incluye: iniciación, maduración, mantenimiento y disolución. Generalmente su formación se inicia en respuesta a señales ambientales como la disponibilidad de nutrientes o frente a situaciones de estrés.

El proceso de formación del biofilm se puede describir en cinco etapas e involucra factores biológicos y fisicoquímicos. Los factores biológicos incluyen la señalización célula-célula, tasas de crecimiento de las bacterias, producción de exopolisacárido (EPS), movilidad, competencia o cooperación entre las bacterias. La primera etapa consiste en la adhesión inicial de células planctónicas a la superficie. Esta adhesión es reversible y está mediada por fuerzas de van der Waals y electroestáticas. La transición del proceso reversible a irreversible ocurre por la producción de EPS por parte de las bacterias y el inicio del desarrollo de la arquitectura del biofilm. El desarrollo de

microcolonias insertas en la matriz extracelular da lugar al biofilm maduro, que luego permitirá la dispersión de las células del biofilm al ambiente circundante.

La adhesión se favorece en superficies rugosas, no polares, hidrofóbicas y cubiertas por una capa “acondicionada” (principalmente por materia orgánica proveniente de los fluidos circundantes). Esto último debe asociarse con el concepto de incrustaciones o “*biofouling*”. El término incrustaciones no solo abarca a los microorganismos creciendo en una estructura de biofilm, sino también a la materia orgánica que forma depósitos o sedimentos (Vlkova et al., 2008). Estas las estructuras que se forman en la industria alimentaria ocasionando problemas de calidad e inocuidad de los productos.

### **3.1 Biofilms asociados a la producción de polvos lácteos**

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  $\text{cm}^2$  (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).

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).

Para que los microorganismos termófilos puedan crecer en la planta industrial debe existir una fuente de inóculo inicial. Varios autores han reportado que la leche cruda es de algún modo la fuente de inóculo inicial, pero luego tiene muy poca influencia en la cantidad de termófilos de la leche industrializada destinada, por ejemplo, para la manufactura de leche en polvo (Muir et al., 1986, Scott et al., 2007). Otra posibilidad es la presencia de estas bacterias atrapadas en las incrustaciones que se forman en la planta entre las limpiezas CIP, y que se remueven sólo parcialmente mediante mecanismos manuales de limpieza (Hinton, 2003). La acumulación de residuos lácteos es común en áreas con temperaturas mayores a 65°C, como precalentadores y evaporadores en el proceso de producción de polvos lácteos. Varios autores estudiaron la formación de biofilms e incrustaciones sobre superficies de acero inoxidable a escala de laboratorio (Flint et al., 2001, Burgess et al., 2009), así como la resistencia de los mismos a distintos regímenes de limpieza (Parkar et al., 2003, Parkar et al., 2004). Pero fue en el trabajo de Scott et al. (2007) donde se informó por primera vez que las incrustaciones representan una fuente de contaminación de bacterias termófilas (células vegetativas y esporas)

en una planta de producción de leche en polvo. Tanto las esporas como las células vegetativas son capaces de adherirse al acero o a superficies con incrustaciones (Flint et al., 2001, Parkar et al., 2001). Una vez adheridas, las esporas probablemente germinan y crecen formando un biofilm. Scott et al. (2007) reportan un incremento consistente tanto en el recuento de esporas como de termófilos totales en muestras tomadas desde el tanque de balance hasta el área de precalentamiento y evaporación (Fig. 1). Estos resultados demuestran que las secciones de precalentadores y evaporadores son sitios de proliferación celular y de esporulación. Más aún, en este estudio se detectó la presencia de esporas en los evaporadores luego de 9 horas de iniciada la corrida, llegando a niveles de  $10^4$  UFC/ml a las 18 horas, a pesar de no haberse detectado su presencia en el tanque de balance. Esto confirma que las esporas se formaron durante del proceso de elaboración de leche en polvo, y no como resultado de una contaminación externa (Scott et al., 2007). Para estudiar las incrustaciones, Scott et al. (2007) colectaron manualmente incrustaciones de los evaporadores una vez detenida la línea, y reportan recuentos de termófilos totales y esporas similares, en el rango de  $10^5$ - $10^7$  UFC/ml. Las especies microbianas predominantes en los polvos lácteos de Nueva Zelanda, *A. flavithermus* y *G. stearothermophilus*, integraban este biofilm. Este estudio reafirma la importancia de estos microorganismos en la planta de producción de polvos lácteos y su capacidad de organizarse en estructuras complejas (biofilm o incrustaciones), que brindan nichos excepcionales para su preservación y proliferación.

Básicamente, se plantean tres estrategias para abordar el problema de los biofilms en la industria láctea: i) desinfección previa al desarrollo del biofilm, ii) remoción o desinfección con desinfectantes fuertes o sustancias bactericidas, y iii) inhibición de la adhesión de los microorganismos a las superficies seleccionando materiales específicos (Vlkova et al., 2008).

Varios factores se deben tener en cuenta al estudiar la eficacia de los distintos agentes de limpieza. Las variaciones ambientales, incluyendo el pH y la concentración de sales, afectan la viabilidad de las células. El uso de químicos que atacan la matriz de exopolisacáridos es efectivo en la remoción y eliminación de células del biofilm, así como el uso de lisozima. Los tratamientos del biofilm o de las superficies con lisozima lograron no sólo eliminar células del biofilm sino también prevenir su adhesión a superficies limpias (Parker et al., 2003). Se estudiaron otros métodos para inactivar las esporas de *Bacillus* y así prevenir la formación de biofilm. Scurrah et al. (2006) demostraron que se pueden alcanzar niveles altos de inactivación de esporas combinando los tratamientos de calentamiento de la leche con la aplicación de altas presiones. El uso de materiales que por sus propiedades confieran resistencia a la formación de biofilms es otra alternativa planteada en la industria láctea. Parker et al. (2003) evaluaron el uso de acero electroporado, que altera la carga eléctrica del sustrato, en lugar del acero 316 estándar, pero no se obtuvieron grandes diferencias. Si bien en las primeras horas el número de células adheridas fue menor, con el correr de las horas los niveles de formación de biofilm fueron similares.

### 3.2 Matriz del biofilm

Las moléculas de EPS bacteriano son uno de los factores más importantes en la formación de biofilm. Las sustancias extracelulares promueven la transición hacia la fase de adhesión irreversible del biofilm. Estas moléculas fortalecen las interacciones entre los microorganismos determinando la formación de microcolonias en las superficies del equipamiento. En estas estructuras quedan atrapadas células, agua, iones y productos solubles de bajo y alto peso molecular. El contenido de agua promedia el 97% de esta matriz (Zhang et al., 1998).

Los EPS microbianos varían en su composición y por lo tanto en sus características químicas y físicas. Algunos tienen carga neutra, pero la mayoría son polianiones debido a la presencia de ácidos urónicos (ácido D-glucurónico es el más común pero existen otros como D-galacturónico o D-manurónico), y residuos inorgánicos como fosfatos (Sutherland, 2001). Los EPS son moléculas largas con un peso molecular entre  $0.5-2.0 \times 10^6$  Da, que pueden asociarse de distintas maneras. En cultivos puros se visualizan como hebras adheridas a la superficie celular. Sin embargo, en los biofilms los polisacáridos interactúan con otras moléculas, incluyendo lectinas, proteínas, lípidos, así como con otros polisacáridos. El resultado es una estructura terciaria que comprende una red de polisacáridos y otras macromoléculas en las que las células y sus productos celulares quedan atrapados. La cantidad de EPS en el biofilm depende de la

disponibilidad de fuentes de carbono y otros nutrientes como nitrógeno, potasio y fosfatos (Tumpang et al., 2011).

Aunque la presencia de EPS puede contribuir a la adhesión a diferentes soportes, la producción de EPS no es sinónimo de adhesión (Parkar et al., 2001). El EPS interactúa con las células microbianas y las proteínas asociadas a su superficie, así como con proteínas solubles, incluyendo enzimas. Estas interacciones pueden ser asociativas, pero también pueden ser segregativas o incompatibles. Por lo tanto, la estabilidad de la matriz dependerá de la concentración de EPS, las cargas iónicas presentes y del tipo de interacción con otras macromoléculas (Sutherland, 2001).

#### **4. Microflora de los polvos lácteos uruguayos**

La mayoría de los trabajos relativos a la microflora esporulada de los polvos lácteos se limitan a plantas de Nueva Zelanda (Flint et al., 2001, Ronimus et al., 2003) y China (Yuan et al., 2012), y a un estudio comparativo realizado por Rüeckert et al. (2004) donde se analizaron muestras de 18 países que producen o importan leche en polvo. Ronimus et al. (1997) optimizaron un protocolo de amplificación aleatoria de ADN polimórfico, técnica conocida por el su sigla en inglés RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), para la discriminación de *Bacillus* spp. mesofílicos y termofílicos, a nivel de cepa y especie. Esta técnica se utilizó rutinariamente para la identificación y genotipado de microorganismos esporulados contaminantes de polvos lácteos

(Ronimus et al., 2003, Rüeckert et al. 2004). Recientemente, Reginensi et al. (2011) estudiaron la población de microorganismos esporulados en polvos lácteos uruguayos utilizando la técnica de RAPD con el cebador OPR-13. En ese trabajo se analizaron 22 muestras de leche en polvo de diferentes plantas elaboradoras de Uruguay que procesan más del 80% de la producción nacional. *B. licheniformis* resultó ser el contaminante más importante seguido de *A. flavithermus*, representando ambas especies el 71.5-84% de la microflora. Otras especies aisladas pertenecieron al género *Bacillus*: *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* y otros esporulados aparecieron en porcentajes inferiores, entre 3-5%. La predominancia de *B. licheniformis* también se informó por autores en otros países (Bienvenue et al., 1999, Murphy et al., 1999, Ronimus et al., 2006, Yuan et al., 2012), mientras que en otros trabajos las especies más frecuentes fueron *A. flavithermus* y *G. stearothermophilus* (Ronimus et al., 2003). La abundancia relativa de estas tres especies es variable entre plantas lácteas y regiones del mundo (Rüeckert et al., 2004). Los cambios en los procesos industriales, en la composición de la leche cruda y su población de esporulados, así como otros factores como los tratamientos de limpieza, las temperaturas del proceso y la higiene de la planta, pueden afectar la ocurrencia o prevalencia de determinada especie sobre otra y de esta manera alterar cualitativa y cuantitativamente la población contaminante.

*A. flavithermus* se aisló en el 40% de las muestras analizadas por Reginensi et al. (2011) y su presencia aumentó cuando las muestras se trataron térmicamente y se incubaron a 55°C. En cuanto a la diversidad genética dentro

de esta especie, se encontró limitada a un único perfil de RAPD que no correspondió exactamente con los encontrados en plantas de otros países (Ronimus et al., 2003, Rüeckert et al., 2004). Este microorganismo está catalogado como contaminante del proceso, visto que no se detectó en leche cruda ni como contaminante del tambo (Postollec et al., 2011).

La población de *B. licheniformis* contaminante de polvos lácteos uruguayos presenta tres genotipos previamente definidos por Ronimus et al. (2003). La mayoría de los aislamientos pertenecen al genotipo F con sus dos subgrupos (F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub>), mientras que el genotipo G aparece en una porción minoritaria. La dominancia del genotipo F también se informó en aislamientos de polvos lácteos de Nueva Zelanda (Ronimus et al., 2003, Rüeckert et al., 2004, Ronimus et al. 2006), así como en polvos manufacturados en otros países (Rüeckert et al., 2004). La presencia de este microorganismo se debe a su amplia distribución como contaminante de tambo. Se aisló de alimentos concentrados, heces, suciedad de ubres y leche cruda (Scheldeman et al., 2005, Moreno, 2011). A pesar de su presencia ubicua en el tambo, también se detectó como contaminante del proceso en asociación con las incrustaciones y biofilm formado en los equipos industriales, contaminando el producto por biotransferencia.

#### 4.1 *Bacillus licheniformis*

*B. licheniformis* es una bacteria ubicua en la naturaleza, existe predominantemente en el suelo en forma de spora y es un reconocido contaminante de la industria láctea. Es un bastón, Gram positivo, móvil, anaerobio facultativo y formador de esporas. Pertenece al grupo *B. subtilis* del género *Bacillus*, que integran adicionalmente *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. atrophaeus*, *B. mojavensis*, *B. sonorensis*, *B. vallismortis*, *B. firmus*, *B. lentus* and *B. sporothermodurans* (Fritze, 2004). Es considerado un microorganismo mesófilo con una temperatura mínima de crecimiento de 15°C, pero es capaz de crecer a 50-55°C (Schleifer, 2009).

La cepa referencia *B. licheniformis* ATCC 14580 (o DZM13) ha sido secuenciada completamente. Posee un genoma circular de 4.222.336 pares de bases que contienen 4.208 genes codificantes de proteínas (tamaño promedio 873 pares de bases), siete genes ribosomales ARNr, y 72 genes para ARNt. El contenido GC es de 46.2% y en esta cepa no se han detectado plásmidos (Veith et al., 2004). El cromosoma de *B. licheniformis* tiene grandes regiones que presentan similitud con el genoma de otras bacterias pertenecientes al grupo *B. subtilis* como *B. subtilis* y *B. halodurans*. Cerca del 80% de las secuencias codificantes en el genoma de *B. licheniformis* tienen su ortólogo en *B. subtilis*. El restante 20% del genoma difiere en la cantidad y ubicación de elementos transponibles, profagos, genes para enzimas extracelulares y operones de vías metabólicas secundarias (Rey et al., 2004).

*B. licheniformis* es la especie esporulada más comúnmente aislada de leche cruda (Crielly et al., 1994, Moreno, 2011) y ha sido descrita como una de las tres especies predominantes en polvos lácteos (Rüeckert et al., 2004, Reginensi et al., 2011, Yuan et al., 2012). Este microorganismo es de gran interés, no sólo por su predominancia en la línea de producción de polvos lácteos sino también, por el amplio potencial tecnológico de la bacteria en sí y de sus productos extracelulares, ya que se ha usado por décadas en la producción industrial de distintas enzimas (Schallmey et al., 2004). Las proteasas de *B. licheniformis* son usadas en la industria de detergentes y en la industria de cueros, mientras que las amilasas se emplean en la industria textil y del papel (Priest, 1977). Algunas cepas también son capaces de producir sustancias con actividad antimicrobiana (He et al., 2006, Joshi et al., 2008) y antimicótica (Petchkongkaew et al., 2008, Yi et al., 2010). Asimismo, aislamientos de esta especie actúan como controladores biológicos para cultivos como el tomate (Lee et al., 2006b), como probióticos en animales de granja bajo diferentes formulaciones comerciales, y se ha explorado también su uso en la acuicultura como probiótico para cultivos de camarón (Li et al., 2007).

Varias de estas propiedades de *B. licheniformis* tienen aplicaciones industriales, pero su presencia en la línea de producción de polvos lácteos causa claras desventajas. La producción de enzimas que deterioran el

producto, la resistencia de sus esporas a tratamientos térmicos severos y su capacidad de adherirse al metal formando biofilms son las características más relevantes que justifican su estudio y su papel como contaminante de polvos lácteos.

#### **4.1.1 Esporulación y resistencia a los tratamientos térmicos**

La conversión de la célula vegetativa en espora está acompañada por cambios en la estructura, metabolismo y composición química. Generalmente el pasaje de una célula vegetativa a espora se desencadena por la falta de fuentes de carbono, nitrógeno o fosfato fácilmente metabolizables, en el entorno de la bacteria. En el estado latente, las esporas presentan un metabolismo basal y exhiben un mayor grado de resistencia a la inactivación por diversas agresiones físicas, incluyendo calor (húmedo y seco), radiaciones UV y gamma, desecación extrema y agentes oxidantes. A pesar de su casi completa inactividad metabólica, las esporas son todavía capaces de monitorear continuamente el estado nutricional de su entorno, y responder rápidamente a la presencia de nutrientes apropiados para germinar y reanudar el crecimiento vegetativo. La formación de esporas constituye una estrategia por la cual la célula bacteriana escapa temporalmente de un entorno con condiciones nutricionales desfavorables a través de la latencia. Con el fin de mantenerse viable, la espora en estado de latencia debe evitar y/o reparar daños de componentes críticos que le impidan su posterior germinación y reanudar el

crecimiento vegetativo. La germinación de la espora es también un mecanismo complejo que implica la activación de procesos moleculares y fisiológicos frente a una señal “gatillo” desencadenante. La germinación de la espora incluye tres etapas, i) la activación reversible en la que la espora aún posee propiedades del estado de latencia y fácilmente puede volver a ese estado, ii) la etapa de iniciación irreversible que se caracteriza por la activación de procesos metabólicos asociados con la degradación de estructuras propias de la espora (esta etapa se lleva a cabo bajo condiciones que promueven el crecimiento), y (iii) la etapa de elongación que incluye la eliminación de la cubierta de la espora y la formación de la célula vegetativa (Setlow, 2003).

Como se ha mencionado, las esporas de *Bacillus* son capaces de sobrevivir la pasteurización y germinar cuando las condiciones le sean favorables, ya sea en los productos lácteos manufacturados o en la línea de proceso durante la producción. La resistencia al calor de estas esporas es una característica importante, ya que determinará el éxito de los tratamientos térmicos aplicados para asegurar la calidad microbiológica del producto. Janstova y Lukasova (2001) estudiaron la resistencia al calor de esporas de varias especies de *Bacillus*, observando la disminución en el tiempo de reducción decimal o valor D (tiempo de disminución de un orden de magnitud en la población de microorganismos viables a una temperatura determinada). Estos autores mostraron que temperaturas de 135°C eran adecuadas para la inactivación de esporas de todas las especies estudiadas con excepción de *B. licheniformis*, las cuales fueron capaces de germinar luego de este tratamiento. *B.*

*licheniformis* fue la especie que mostró la mayor resistencia al calor con valores D de 4.51, 2.37, 1.26, 0.68, 0.38, 0.18 y 0.02 minutos a temperaturas de 95, 100, 105, 110, 115, 120 y 135°C, respectivamente. Las esporas de *B. licheniformis* también poseían la mayor resistencia a la radiación por microondas cuando se compararon con otras especies de *Bacillus* (Kim et al., 2009).

En condiciones de laboratorio se observó que el aumento en la cantidad de esporas de *B. licheniformis*, en leche descremada (pH 6.4) a 37°C, decrece al aumentar el tiempo de incubación (Mansour et al., 1999). La disminución en la cantidad de esporas estaba directamente relacionada con la germinación, que alcanzó un 99% a las 10 horas de cultivo, indicando que éstas se habían convertido en células vegetativas en activa duplicación. Entre las 10 y 24 horas se observó un nuevo aumento de esporas como consecuencia de la esporulación de las células vegetativas al final de la fase exponencial de crecimiento, llegando a un máximo a las 72 horas de incubación (Mansour et al., 1999). Sin embargo, cuando se evalúa la formación y resistencia de las esporas es necesario considerar que en el laboratorio no se puede crear el mismo ambiente y condiciones para la esporulación como en el sustrato natural. El ciclo de vida (crecimiento, esporulación, germinación) de los microorganismos esporulados en su ambiente natural seguramente difiera al estudiado en el laboratorio en varios aspectos. Probablemente el ciclo sea más lento y tenga lugar a través de microcolonias adheridas o inmersas en un sustrato y experimente grandes variaciones con modificaciones en la

temperatura, disponibilidad de nutrientes y oxígeno, así como cambios asociados a eventos de competencia con otros microorganismos.

La capacidad de adhesión de las esporas de *B. licheniformis* y otros *Bacillus* termofílicos a superficies de acero inoxidable es mayor que la de células vegetativas (Parkar et al., 2001). Las esporas también presentan mayor resistencia a los tratamientos con agentes químicos que alteran la cubierta de EPS y proteínas, y aunque se observa una disminución en la cantidad de esporas adheridas al acero, los valores reportados no son significativos (Parkar et al., 2001).

Al igual que en el trabajo de Scott et al. (2007), donde se informa que los principales sitios de esporulación en plantas de Nueva Zelanda fueron los precalentadores y los evaporadores, en nuestro laboratorio se detectó la presencia de esporas y células vegetativas de *B. licheniformis* en muestras de leche tomadas de los precalentadores y evaporadores de una planta nacional de elaboración de leche en polvo (datos sin publicar).

#### **4.1.2 Capacidad de adhesión**

Las bacterias termófilas como *B. licheniformis* encuentran nichos adecuados para su colonización, adhesión y crecimiento en el equipamiento de las plantas de elaboración de leche en polvo (Murphy et al., 1999, Ronimus et al., 2003,

Scott et al., 2007). Estas bacterias producen EPS y se multiplican generando comunidades complejas en el biofilm (Sutherland 2001). La capacidad de producir EPS por aislamientos de *B. licheniformis* de distintos orígenes se informó previamente (Larpin et al., 2002, Lui et al., 2010, Song et al., 2011). Dentro del género *Bacillus* se informó la producción de EPSs de diferente composición, como levanos (Han, 1989),  $\beta$ -1,3-glucano (Gummadi y Kumar, 2005), y heteropolímeros compuestos por más de un azúcar (Larpin et al., 2002). Los EPS descritos en aislamientos de *B. licheniformis* son generalmente heteropolímeros de azúcares como manosa y glucosa (Larpin et al., 2002), fructosa y glucosa (Liu et al., 2010) o glucosa (Song et al., 2011). La cantidad de EPS producida es dependiente de la cepa en estudio, con rangos que van desde 1,5 a 9 g/L en cultivos puros (Liu et al., 2010, Song et al., 2011). Además de ser el componente principal de la matriz del biofilm, algunos EPS poseen capacidades emulsificantes (Singh et al., 2011), inmunológicas (Liu et al., 2010), antioxidantes (Song et al., 2011), incluso como inhibidores de la formación de biofilm para otras especies bacterianas (Sayem et al., 2011).

*B. licheniformis* es capaz de adherirse a superficies de vidrio y de acero inoxidable, condicionado por factores como el pH, la temperatura y la disponibilidad de nutrientes (Rodionova et al., 2003, Dat et al., 2012). Rodionova et al. (2003) observaron que la cantidad de las células adheridas en un cultivo puro de *B. licheniformis* aumentaba a las temperaturas límites del rango de crecimiento, los picos máximos de adhesión fueron a 25-32 y 54-63°C.

#### 4.1.3 Producción de enzimas hidrolíticas extracelulares

La variedad de enzimas extracelulares sintetizadas por especies de *Bacillus* ha sido señalada por Priest (1977). Estas exoenzimas se encuentran totalmente disociadas de las células libres en el 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). Originalmente, los polvos lácteos eran considerados biológicamente inertes por su bajo contenido de agua, que dificulta el crecimiento microbiano. Sin embargo, la evidencia indica que los cambios en el producto durante su almacenamiento no sólo son causados por reacciones químicas sino también por la acción de enzimas de origen bacteriano (Celestino et al., 1997a, b, Chen et al., 2003). De estas enzimas las más importantes son las proteasas y las lipasas.

*B. licheniformis* se ha utilizado en la industria durante décadas para la producción de proteasas, lipasas, amilasas, antibióticos o productos químicos

especializados. Se encontraron aislamientos cepas capaces de producir proteasas alcalinas (Rachadech et al., 2010),  $\alpha$ -amilasas (Divakaran et al., 2011), lipasas (Janstova et al., 2006), quitinasas (Kudan y Pichyangkura, 2009), proteasas queratinolíticas (Fakhfakh et al., 2009) y tanasas (Mondal et al., 2000). Las proteasas y lipasas tienen gran potencial industrial. Ambas enzimas se utilizan ampliamente en la industria de los detergentes, del cuero e industrias farmacéuticas. Mientras en la industria láctea generalmente la presencia de estas enzimas causa pérdidas económicas importantes por deterioro del producto.

Las proteasas son enzimas hidrolíticas que actúan sobre los enlaces peptídicos. Se clasifican en nueve familias de acuerdo a la composición de su sitio activo. Ellas son: asparto-proteasas, cisteino-proteasas, glutamil-proteasas, serino-proteasas, asparragino-proteasas, treonino-proteasas, metalo-proteasas, proteasas mixtas, y una última familia de sitio activo desconocido.

Las enzimas lipolíticas son carboxil-esterasas que hidrolizan acil-gliceroles. Las que hidrolizan ácidos grasos de cadena corta son esterases, y las hidrolizan ácidos grasos de cadena larga son lipasas. Estas enzimas pueden clasificarse en tres grupos por su especificidad frente al sustrato. Las lipasas bacterianas forman parte de los grupos I y II. El grupo I comprende a enzimas sin especificidad por el sustrato, las del grupo II son 1,3-específicas liberando 1,2-

diglicéridos, 2,3-diglicéridos, 2-monoglicéridos y ácidos grasos libres. El grupo III corresponde a lipasas con preferencias por determinados ácidos grasos, pero ninguna lipasa bacteriana forma parte de este grupo (Jaeger et al., 1994). Lipasas y proteasas pueden ser producidas simultáneamente por la misma bacteria, y existen aislamientos de *B. licheniformis* para las cuales se comprobó esta capacidad (Sangeetha et al., 2010).

Muchas de estas enzimas son capaces de soportar los tratamientos térmicos aplicados en la industria láctea, particularmente proteasas y lipasas de *Bacillus* spp. Si bien varios autores informaron la termoestabilidad de proteasas y lipasas producidas por aislamientos de *B. licheniformis* (Khyami-Horani, 1996, Sangeetha et al., 2010), sólo unos pocos estudiaron las características de las enzimas producidas por especies de *Bacillus* de origen lácteo (Chopra y Mathur, 1984, Chen et al., 2004). Chen et al. (2004) reportan las características de proteasas y lipasas producidas por siete cepas de *Bacillus* contaminantes de polvos lácteos (Ronimus et al., 2003) y sus posibles efectos en el producto durante su almacenamiento. Las tres cepas de *B. licheniformis* estudiadas por Chen et al. (2004) presentaron actividad proteasa y lipasa extracelular aunque el grado de actividad enzimática fue aislamiento dependiente. En cuanto a las proteasas producidas por estos aislamientos, el estudio de inhibidores indicó la presencia de serino-proteasas y metalo-proteasas, pero las proporciones de estas enzimas variaban entre los distintos aislamientos. La termoestabilidad de las enzimas también es una característica dependiente del aislamiento, la mayoría retuvo el 50% de su actividad frente a tratamientos térmicos de 10

minutos entre los 60 y 90°C. En cuanto a las lipasas producidas por estos aislamientos de *B. licheniformis*, se observó la capacidad de hidrolizar cadenas de ácidos grasos de varios tamaños con preferencia por las cadenas cortas. Las lipasas también mostraron tolerancia al tratamiento térmico reportando niveles incluso mayores que las proteasas. El estudio realizado por Chen et al. (2004) demostró que las proteasas y lipasas producidas por aislamientos de *B. licheniformis* contaminantes de polvo lácteos son capaces de soportar los tratamientos térmicos aplicados en la industria, y por consiguiente permanecer activas en el producto final.

Los cambios en la funcionalidad y sabor de la leche y los polvos lácteos son causados por la combinación de reacciones fisicoquímicas y enzimáticas. Celestino et al. (1997a, b) confirmaron que las proteasas y lipasas presentes en leche pasteurizada pudieron sobrevivir todos los tratamientos térmicos aplicados en la manufactura de polvos lácteos y que estas enzimas permanecieron activas en la leche reconstituida incluso luego de seis meses de almacenamiento a 25°C (Celestino et al., 1997b). Las proteasas causan un incremento del nitrógeno no proteico acompañado de la desestabilización de la micela de caseína y la coagulación de la leche, mientras que la lipólisis aporta sabores desagradables (rancio o metálico), inicialmente causados por la hidrólisis de triglicéridos de la leche. Celestino et al. (1997b) también informaron que los sabores rancios causados por la lipólisis en leche en polvo reconstituida fueron más pronunciados que los sabores amargos causados por la proteólisis.

## **Hipótesis de trabajo**

Varios autores reportan la variabilidad genética presente en el género *Bacillus* y específicamente entre cepas de la especie *B. licheniformis*. Asimismo es evidente la importancia de esta especie y de sus propiedades tecnológicas y de adhesión a superficies en la industria de polvos lácteos. Por lo tanto, la diversidad a nivel genético no condicionará el grado en que se manifiestan estas propiedades tecnológicas.

## **Objetivo general**

El objetivo general de este trabajo fue evaluar la diversidad y el comportamiento de los genotipos de *B. licheniformis* aislados de polvos lácteos nacionales, y determinar sus propiedades biotecnológicas de interés.

Dentro de este objetivo general se analizarán aislamientos representativos de los distintos genotipos, apuntando a su caracterización y posible incidencia tanto en el producto final como en la línea de producción.

La tesis se encuentra estructurada en 5 capítulos que corresponden a los objetivos específicos planteados.

# **CAPITULO 1**

## **Colección y caracterización de aislamientos de *B. licheniformis* provenientes de polvos lácteos nacionales elaborados en otoño e invierno**

### **Objetivos específicos**

- Ampliar la colección de aislamientos de *B. licheniformis* provenientes de polvos lácteos comerciales elaborados en otoño e invierno.
- Identificar los distintos perfiles génicos presentes en la población.

## **1. Materiales y métodos**

### **1.1 Procesamiento de muestras e identificación de aislamientos**

Los aislamientos de *B. licheniformis* utilizados para este trabajo pertenecen a la colección de microorganismos termodúricos y termofílicos aislados de polvos lácteos de la Unidad de Tecnología de los Alimentos (UTA) de la Facultad de Agronomía. La colección existente se amplió con aislamientos de polvos lácteos comerciales elaborados durante otoño e invierno. Se procesaron tres muestras mensuales, tomadas en forma aleatoria, de leche en polvo elaborada durante los meses de mayo a setiembre del año 2010. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su procesamiento. De cada una de las muestras se reconstituyeron 10 gramos en 90ml de agua peptonada estéril 0.1%, usando un homogenizador Stomacher®400 Circulator (Seward Ltd., UK). Los aislamientos de microorganismos termodúricos se obtuvieron mediante sembrado en placas de PCA (Plate Count Agar, Oxoid) posteriormente a un tratamiento térmico de la muestra a 80°C por 30 minutos. Se realizaron diluciones seriadas decimales en NaCl 0.85%, y se sembraron en superficie 100µl con rastrillo. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se seleccionaron las colonias (aproximadamente 10 por muestra) que presentaron la morfología característica de *B. licheniformis* según la experiencia previa y se realizaron pruebas bioquímicas primarias (tinción de Gram, oxidasa y catalasa). Los aislamientos obtenidos en el período de trabajo se conservaron bajo congelación a -80°C utilizando un preservador en base a glicerol al 15%.

## **1.2 Caracterización genotípica y criterios de selección de aislamientos para análisis posteriores**

La colección de microorganismos termodúricos y termofílicos existente fue ampliada con 150 nuevos aislamientos de polvos lácteos comerciales elaborados durante otoño e invierno, los cuales fueron analizados y asignados al genotipo correspondiente de acuerdo al perfil de bandas obtenido mediante la técnica de RAPD-PCR con el cebador OPR-13 (5'-GGACGACAAG-3') (Ronimus et al., 1997).

### **1.2.1 Extracción de ADN genómico**

Los cultivos puros de cada aislamiento se sembraron en 5ml de caldo Triptona de Soya (TSB, Oxoid Ltd., UK) y se incubaron a 37°C durante 24 hs sin agitación. Las células se cosecharon a 10.000 rpm durante 5 minutos en una centrífuga de mesa Spectrofuge 7M (Labnet International Inc. USA), y se resuspendieron en 200 µL de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0). El ADN se purificó utilizando un kit comercial Genomic DNA Purification Kit (Fermentas International Inc., USA, Cat. K0512) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN se resuspendió en 40 µL de buffer TE y se cuantificó con un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific Incorporation, Wilmington, DE, USA).

### **1.2.2 Análisis de RAPD-PCR**

El análisis RAPD se realizó en 25 µL de reacción conteniendo: 1X Thermo buffer (Fermentas International Inc., USA), 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP (Fermentas International Inc., USA), 1U Taq polimerasa (Fermentas, USA), 1µM cebador OPR13 (5'-GGACGACAAG-3') (Rominus et al., 1997) y 20 ng de ADN molde. La amplificación se realizó en un termociclador Corbett CG1-96 thermal cycler (Corbett Research, UK) con los siguientes parámetros: desnaturalización a 94°C por 3 min y 45 s; 35 ciclos cada uno de un paso de desnaturalización a 94°C por 15 s, un paso de hibridación del cebador a 36°C por 15 s, y una extensión a 72°C por 2 min; y un paso de extensión final de 72°C por 4 min (Rominus et al., 1997). Se incluyeron controles negativos sin ADN molde. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa 1.8% utilizando buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) y 10 V/cm para la corrida. La tinción de geles se realizó con GoodView (3%v/v), y se visualizaron y fotografiaron en un transiluminador UV. El análisis se realizó por duplicado, el estudio de los perfiles de bandas obtenidos se realizó visualmente por comparación con los perfiles definidos por Rominus et al. (2003), y previamente reportados por Reginensi et al. (2011).

### **1.2.3 Identificación por análisis de la secuencia del gen para 16S ARNr**

Los presuntos aislamientos de *B. licheniformis*, representativos de los distintos perfiles de RAPD, se identificaron por análisis de secuencia del gen 16S ARNr.

Se utilizaron 25 µl 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 µM de cada cebador (fD1 y rD1) y 20 ng ADN molde. Los cebadores fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') se usaron para amplificar un fragmento de 1540 bp del gen 16S ARNr (Weisburg et al., 1991). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización de 94°C por 7 min, seguido de 35 ciclos cada uno de un paso de desnaturalización a 94°C por 1 min, un paso de hibridación del cebador a 56°C por 1 min y un paso de extensión a 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 en MacroGen Sequencing Service (Corea), usando el cebador fD1, en un secuenciador capilar ABI PRISM 3730XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Las secuencias de ADN se compararon con las secuencias 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. Las relaciones evolutivas basadas en secuencias del gen 16S ARNr de aislamientos de *B. licheniformis* y otros microorganismos contaminantes de polvos lácteos se realizaron utilizando el programa MEGA4 (Tamura et al., 2007). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud y la topología del análisis filogenético se realizó mediante los métodos de Neighbor-Joining y UPMGA.

#### **1.2.4 Aislamiento y secuenciación de la banda de 650pb.**

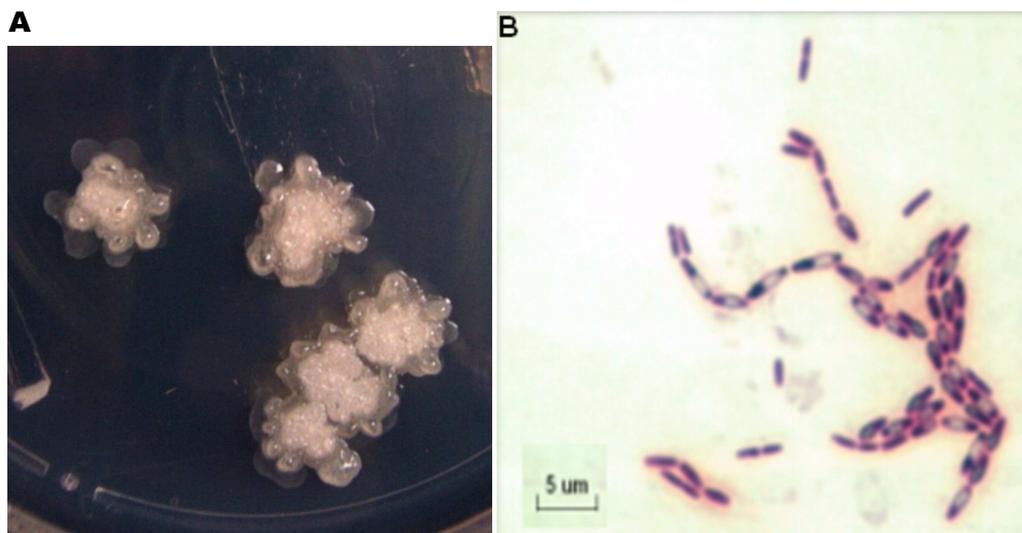
Los perfiles de RAPD de los genotipos F1 y F2 se diferencian por la presencia de una banda de aproximadamente 650 pb (Ronimus et al., 2003). Se seleccionaron cuatro aislamientos pertenecientes al grupo F2, de los cuales se aisló la banda de 650 pb a partir de un gel de agarosa al 1.8% utilizando un kit comercial (Vivo Gel Extraction, Vivo Science). El fragmento purificado se envió para su secuenciación en MacroGen Sequencing Service (Corea), usando el cebador OPR-13, en un secuenciador capilar ABI PRISM 3730XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Las secuencias obtenidas se compararon entre sí y con las bases de datos utilizando las distintas herramientas disponibles en NCBI BLAST *database* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## **2. Resultados y discusión**

### **2.1 Complementación de la colección de aislamientos de *B. licheniformis* provenientes de polvos lácteos elaborados en otoño e invierno**

Durante los años 2007 y 2009 se obtuvo en nuestro laboratorio una colección sistemática de más de 1200 aislamientos de bastones termofílicos y termodúricos obtenidos a partir de polvos lácteos comerciales nacionales, que se caracterizaron fenotípica y genotípicamente. Durante el periodo mayo-setiembre del 2010 se complementó la colección con aislamientos de la época invernal para integrar microorganismos aislados en todas las estaciones del año. Se trataron muestras de polvo lácteos producidas en esta época y se

aislaron e identificaron 150 nuevos aislamientos con características fenotípicas correspondientes a la especie *B. licheniformis*. Estos aislamientos se caracterizaron por formar una colonia con apariencia similar a “una flor” por la cantidad de exopolisacárido producido (Fig. 1A). Al microscopio se observaron como bastones, Gram positivos, de tamaño mediano (2.00-3.30  $\mu\text{m}$ ) con espora única central o subterminal (Fig. 1B). La caracterización se complementó con pruebas bioquímicas primarias de rutina como ser actividad catalasa y oxidasa. En concordancia con lo descrito en la bibliografía, el 100% de los aislamientos presentaron actividad catalasa positiva y oxidasa negativa (O'Donnell et al., 1980).

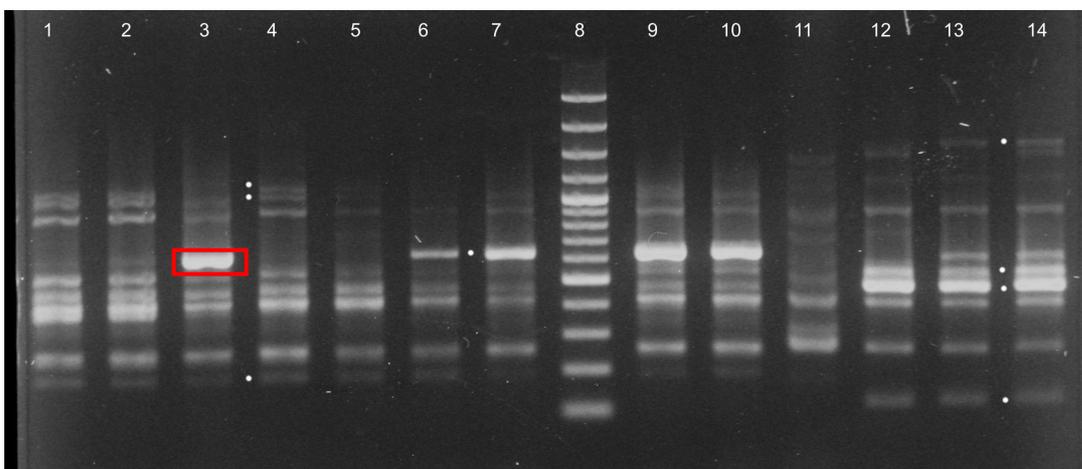


**Figura 1.-** **A)** Apariencia macroscópica de colonias características de *B. licheniformis* crecidas en medio PCA. **B)** Tinción de Gram con un aumento de 100X.

## 2.2 Caracterización genotípica de los aislamientos y evaluación de la distribución estacional

La caracterización genotípica de los aislamientos se realizó de acuerdo a lo descrito por Ronimus et al. (1997) mediante la técnica de RAPD usando el cebador OPR-13. Esta técnica permitió una correcta discriminación entre los distintos genotipos presentes en la población. Utilizando esta técnica Reginensi et al. (2011) caracterizaron la población de bastones esporulados contaminantes de polvos lácteos uruguayos, identificando a *B. licheniformis* como la especie predominante. La Fig. 2 muestra los distintos perfiles encontrados entre los aislamientos pertenecientes a la especie *B. licheniformis*. Se observan claramente tres patrones con bandas características para cada uno de ellos. Los perfiles observados se corresponden con los grupos descritos por Ronimus et al. (2003) y comprenden a todos los aislamientos obtenidos de esta especie. Los patrones observados en las líneas 1 a 7 y 9 a 11 de la Fig. 2 corresponden ambos al perfil F (F1 y F2) presentando fragmentos característicos de 1100, 1000 y 200 pb, pero difieren uno del otro en la presencia de una banda adicional de aproximadamente 650 bp (F2). El tercer patrón correspondiente al perfil G es diferente a los anteriores (Fig. 2, líneas 12 a 14) presentando fragmentos característicos de 1700, 550, 500 y 150 bp. La identidad de aislamientos de cada grupo fue confirmada por secuenciación parcial de un fragmento de aproximadamente 1500 pb del gen 16s ARNr y comparación de secuencias usando BLASTN. En todos los casos la homología con la cepa de referencia *B. licheniformis* ATCC14580 fue mayor al 98%. Los altos grados de similitud de secuencia, el origen de los aislamientos y las

condiciones utilizadas para su aislamiento, así como las características fenotípicas observadas nos permiten nombrar a estos aislamientos como pertenecientes a la especie *B. licheniformis*. Sin embargo, la identificación definitiva de los mismos debería realizarse mediante un análisis polifásico de secuencias.



**Figura 2.-** Perfiles de RAPD de aislamientos seleccionados de *B. licheniformis*. Carril 8, DNA marcador de peso molecular estándar (Generuler 100bp DNA Ladder Plus, Fermentas, bandas: 3000pb, 2000pb, 1500pb, 1200pb, 1000pb, 900pb, 800pb, 700pb, 600pb, 500pb, 400pb, 300pb, 200pb, 100pb); carriles 12-14 *B. licheniformis* cepa G; carriles 1, 2, 4, 5 y 11 *B. licheniformis* cepa F subgrupo 1; carriles 3, 6, 7, 9,10, *B. licheniformis* cepa F subgrupo 2 con la banda distintiva de 650 pb, que se muestra enmarcada en el carril 3. \* Marcan las bandas características definidas para cada genotipo.

En cuanto a la distribución estacional de la diversidad genética en la población de *B. licheniformis*, no se pudo establecer ningún tipo de relación entre los

distintos genotipos y la época del año de elaboración del polvo lácteo. Los porcentajes de abundancia relativa de los perfiles F1, F2 y G, fueron similares para el período primavera-verano (30.7, 68 y 1.3%, respectivamente) y otoño-invierno (30.4, 69 y 0.6%, respectivamente). La leche cruda a partir de la cual se elabora el producto es la principal fuente de microorganismos esporulados contaminantes. Es por esto que los cambios en las condiciones climáticas y en el manejo de los animales durante las distintas estaciones de año podrían condicionar la microflora presente. *B. licheniformis* es la especie termodúrica predominante en la leche cruda (Crielly et al., 1994, Banyó y Vyletelova, 2008, Moreno, 2011), y en cuanto a la estacionalidad de la misma existe una tendencia a incrementarse hacia la primavera, aunque su prevalencia es predominante durante todo el año (Moreno, 2011).

La presencia de los tres genotipos, F1, F2 y G en los polvos lácteos uruguayos fue informada previamente por Reginensi et al. (2011), siendo el genotipo G claramente minoritario con respecto al F (98.9% de los aislamientos pertenecientes a esta especie). La ocurrencia relativa de los genotipos F1, F2 y G en un total de 379 aislamientos de *B. licheniformis* (provenientes de la colección de la UTA más los aislados en este estudio) fue de 31%, 68% y 1% respectivamente. Estos valores también están en concordancia con los informes de polvos lácteos de Nueva Zelanda que muestran a los organismos portadores del genotipo F, incluyendo sus dos variantes, como el grupo dominante (Ronimus et al., 2003, Rüeckert et al., 2004, Ronimus et al., 2006). Esto también ocurre con los polvos lácteos manufacturados en otros países

(Rüeckert et al., 2004). La presencia de *B. licheniformis* en los polvos lácteos es consecuencia de su amplia distribución como contaminante en el tambo, en concentrados alimenticios (Vaerewijck et al., 2001, Scheldeman et al., 2005), heces, ubres y pezones de los animales y leche cruda (Scheldeman et al., 2005), pero también algunos autores sugieren una contribución adicional como contaminante de planta (Rüeckert et al., 2004) asociado a las incrustaciones y el biofilm que permanece en los equipos luego de los ciclos CIP de limpieza.

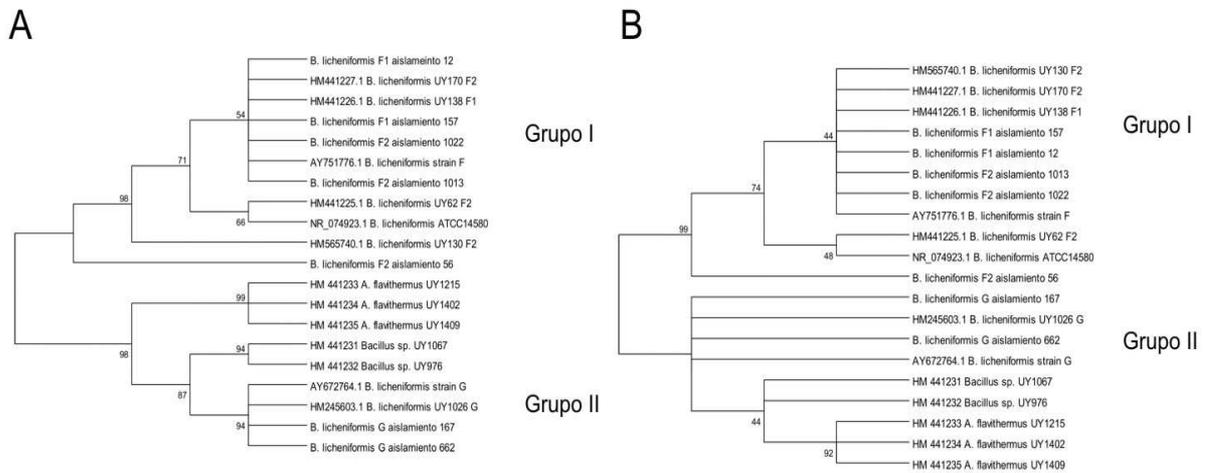
Varias técnicas se han utilizado para estudiar la diversidad genotípica de aislamientos de *B. licheniformis* de distintos orígenes. Utilizando técnicas de “*fingerprinting*” varios trabajos han podido definir dos grupos mayoritarios (De Clerck y De Vos, 2004, De Jonghe et al., 2008, Banyko y Vyletelova, 2009), así como por secuenciación de genes específicos como *gyrA*, *rpoB* y *bac* (De Clerck y De Vos 2004, Ishihara et al., 2002), y también por tipificación multilocus de secuencias de los genes *adk*, *ccpA*, *recF*, *rpoB*, *spo0A* and *sucC* (en inglés *Multilocus sequence typing*, MLST) (Madslien et al., 2012) y de repetidos en tandem (en inglés *Multilocus variable tandem repeat analysis*, MLVA) (Dhakal et al., 2013). No se pudo establecer una correlación entre los grupos definidos en cada trabajo, con excepción de algunos aislamientos pertenecientes a grupos distintos según el gen que codifica para la sintasa de bacitracina (*bac*), que también mantuvieron la misma agrupación al ser incluidos en el ensayo de BOX-PCR llevado a cabo por De Clerck y De Vos (2004). Más recientemente, Banyko y Vyletelova (2009) estudiaron la diversidad de aislamientos de *B. licheniformis* provenientes de leche cruda,

leche pasteurizada y yogur mediante BOX-PCR y establecieron la presencia de dos grupos, uno mayoritario con respecto al otro, el cual a su vez se podría subdividir en dos subgrupos. Uno de los análisis más reciente de diversidad dentro de la especie *B. licheniformis* se realizó mediante tipificación multilocus de secuencias con aislamientos contaminantes de alimentos (Madslien et al., 2012). La relación evolutiva inferida por el análisis de seis genes “*house keeping*”, evidencia la presencia de dos grupos o linajes (uno mayoritario con respecto al otro) que parecen haber evolucionado por separado (Madslien et al., 2012). Si bien estamos tratando con aislamientos provenientes de nichos ecológicos similares no podemos establecer la correlación de estos grupos con los definidos por Ronimus et al. (2003), y los encontrados en este trabajo. Sin embargo, Dhakal et al. (2013) desarrollaron una metodología basada en MLVA acoplada con un análisis de curvas de disociación de los productos de PCR obtenidos (en inglés, *High resolution melting analysis*, HRMA) para estudiar la diversidad de aislamientos de *B. licheniformis* provenientes de polvos lácteos elaborados en Australia, y lo compararon con la tipificación mediante perfiles de RAPD utilizada en este trabajo. Los genotipos encontrados en este trabajo, que comprenden a la totalidad de los aislamientos de *B. licheniformis* aislados de polvos lácteos nacionales, y que fueron previamente descritos por Ronimus et al. (2003), se corresponden con los perfiles observados por Dhakal et al. (2013). En concordancia con lo informado por Dhakal et al. (2013) el genotipo F (F1 y F2) es el mayoritario, correspondiendo al 96% de los aislamientos y solo tres aislamientos se asignaron al genotipo G. Corresponde señalar que Dhakal

et al. (2013) encontraron la presencia adicional de dos aislamientos con perfiles de RAPD y MLV-HRMA diferentes y únicos.

### 2.3 Relaciones filogenéticas

Las secuencias del gen 16S ARNr obtenidas fueron alineadas con otras obtenidas de las bases de datos y se construyeron árboles filogenéticos. Se observó la relación entre los aislamientos pertenecientes a los distintos genotipos y con otras especies comúnmente encontradas como contaminantes de polvos lácteos uruguayos. Con las secuencias de aislamientos de *B. licheniformis* analizadas se pudo observar la separación en dos grupos bien definidos (Fig. 3). El grupo I contiene a todos los aislamientos analizados pertenecientes al genotipo F, y el grupo II está formado por tres aislamientos del genotipo G. Se incluyeron también secuencias de aislamientos de los genotipos F y G de Ronimus et al. (2003)(AY751766.1 y AY672764.1), las cuales se agruparon en el grupo I y II, respectivamente. Asimismo todos los aislamientos de *B. licheniformis* están comprendidos en estos dos grupos y se diferencian claramente de *A. flavithermus* y *Bacillus* sp. (aislamientos pertenecientes al grupo *B. subtilis*), especies también presentes en los polvos lácteos nacionales (Reginensi et al., 2011). Llama la atención la distancia existente entre los dos genotipos, F y G, teniendo en cuenta que comparten una similitud del 98.5% en el gen 16S ARNr (comparación de secuencias AY751776 y AY672764), aunque la presencia de dos linajes con una historia evolutiva diferente se ha informado por Madslien et al. (2012).



**Figura 3.-** Árbol filogenético basado en secuencias del gen 16S ARNr de los aislamientos de *B. licheniformis* y otros microorganismos contaminantes de polvos lácteos. Para las secuencias depositadas en GenBank se muestra el número de acceso en el margen izquierdo. La relación evolutiva fue inferida utilizando el método UPGMA (Sneath y Sokal, 1973) (**A**) y Neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987) (**B**). Los valores de *bootstrap* se calcularon de 1000 réplicas.

Los resultados obtenidos se corresponden con lo informado previamente en cuanto a la presencia de dos grupos o linajes en *B. licheniformis* (De Clerck y De Vos, 2004, De Jonghe et al., 2008, Banyko y Vyletelova, 2009, Madslien et al., 2012). El grupo I agrupa a la mayoría de los aislamientos (98.9%), definido como genotipo F, el cual puede ser subdividido en dos subgrupos basados en los perfiles de RAPD (F1 y F2). Este grupo podría corresponderse con el grupo

B definido por Madslien et al. (2012) ya que contiene a la cepa de referencia ATCC14580 definida como perteneciente al genotipo F.

#### **2.4 Identificación de la banda de 650pb característica del genotipo F2**

Visto que la diferencia en los perfiles de RAPD de los genotipos F1 y F2 es la presencia de una banda de aproximadamente 650 pb, se analizó la secuencia de este segmento. Se seleccionaron cuatro aislamientos pertenecientes al subgrupo F2, de los cuales se extrajo el fragmento de amplificación de 650 pb y se analizó su secuencia. Las secuencias obtenidas para los cuatro aislamientos presentaron entre un 90 y 97% de similitud entre ellas, pero ninguna de ellas presentó una similitud significativa al ser comparada con las bases de datos mediante el análisis de BLASTN. Se realizó también la comparación de secuencia con el genoma de *B. licheniformis* ATCC14580 (perteneciente al genotipo F1) depositado en las bases de datos y tampoco se encontraron niveles significativos de homología. Por otra parte, al utilizar la herramienta BLASTX (secuencia de nucleótidos traducida) se encontró entre un 85 y 92% de similitud con la de una proteína hipotética de *B. licheniformis* WX-02 denominada MUY 04404 (EID45742.1) que presenta dominios característicos de un transportador de membrana del tipo ABC. Cabe destacar que la secuencia codificante para esta proteína de *B. licheniformis* WX-02, no presenta homologías con el genoma de la cepa de referencia *B. licheniformis* ATCC14580. Con los datos obtenidos, se puede decir que esta región de 650 pb, que forma parte de la secuencia que codifica para un presunto

transportador del tipo ABC, no está presente en la cepa de referencia *B. licheniformis* ATCC14580, y por lo tanto es probable que tampoco se encuentre en los aislamientos del genotipo F1. Para confirmar esto se deberían hacer ensayos de hibridación utilizando este fragmento como sonda o diseñar cebadores específicos que amplifiquen esta región, y buscar su presencia en los tres genotipos.

## **2.5 Selección de aislamientos representativos para los ensayos de caracterización y de propiedades tecnológicas**

De un total de 379 aislamientos de *B. licheniformis* caracterizados genotípicamente se seleccionaron un total de 32 aislamientos al azar para proseguir con el estudio. Se seleccionaron 12 aislamientos provenientes de polvos producidos en primavera y verano, y 20 aislamientos de otoño e invierno, respetando la representación de cada genotipo en cada uno de los grupos. Los aislamientos seleccionados y su origen se detallan en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Procedencia de los aislamientos seleccionados para los ensayos planificados en las fases experimentales posteriores.

<b>Aislamiento</b>	<b>Tipo de polvo lácteo</b>	<b>Fecha de elaboración</b>
<b>Genotipo F1</b>		
12	Descremada	Marzo 07
21	Descremada	Marzo 07
114	Descremada	Junio 07
157	Entera	Diciembre 07
164	Descremada	Diciembre 07
998	Descremada	Setiembre 08
1006	Entera	Setiembre 08
1046	Descremada	Setiembre 08
1055	Entera	Setiembre 08
1103	Descremada	Setiembre 08
1175	Entera	Diciembre 09
1226	Descremada	Julio 10
1502	Entera	Agosto 10
1505	Entera	Setiembre 10
<b>Genotipo F2</b>		
23	Descremada	Marzo 07
27	Descremada	Marzo 07
41	Descremada	Marzo 07
56	Descremada	Junio 07
57	Descremada	Junio 07
UY62	Entera	Junio 07
71	Descremada	Junio 07
154	Descremada	Diciembre 07
170	Descremada	Diciembre 07
1013	Entera	Setiembre 08
1022	Entera	Setiembre 08
1237	Descremada	Setiembre 10
1507	Entera	Julio 10
1512	Entera	Julio 10
<b>Genotipo G</b>		
167	Descremada	Diciembre 07
662	Entera	Setiembre 08
UY1026	Entera	Setiembre 08
1612	Descremada	Mayo 10

### 3. Conclusiones

La utilidad de RAPD-PCR como herramienta para el estudio de la diversidad genotípica en la población de *B. licheniformis* provenientes de polvos lácteos se confirmó en este trabajo. Asimismo, de acuerdo a lo informado por Dhakal et al. (2013), esta metodología mostró niveles de discriminación comparables a los logrados utilizando técnicas más novedosas y costosas como MLV-HRMA. El estudio filogenético del gen 16S ARNr confirmó la presencia de dos linajes o grupos claramente definidos en la población. El genotipo F de *B. licheniformis* fue el principal contaminante de los polvos lácteos nacionales, mientras que el genotipo G tuvo una incidencia mucho menor. El genotipo F pudo subdividirse en dos subgrupos F1 y F2, que se diferencian por la presencia de un fragmento de ADN adicional de 650pb en los aislamientos de este último subgrupo, según los ensayos de RAPD. Esta región corresponde a un fragmento de un ORF que codificaría para un potencial transportador del tipo ABC, del que debería confirmarse su ausencia en los aislamientos F1 y estudiar la posible incidencia en algún cambio fenotípico que pudiera brindarle ventajas o propiedades diferenciales a este grupo de bacterias. No se observaron diferencias en cuanto a la distribución estacional en las proporciones de los distintos genotipos.

## **CAPITULO 2**

### **Determinación del crecimiento en el rango de temperaturas entre 37 y 65°C, y su relación con la producción de exopolisacárido (EPS)**

#### **Objetivos específicos**

- Determinar el crecimiento en el rango de temperaturas entre 37 y 65°C
- Evaluar la cinética de crecimiento a 37 y 55°C mediante el estudio de los parámetros de velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) y tiempo de duplicación (tD).
- Cuantificar la producción de EPS en cultivos puros crecidos a 37 y 55°C, y evaluar la relación con la temperatura.

## **1. Materiales y métodos**

### **1.1 Determinación del crecimiento**

El crecimiento de los aislamientos seleccionados (ver Tabla 1, Cap. 1) se evaluó mediante siembra en placas de PCA utilizando un ansa calibrada de 2mm, a partir de cultivos frescos en TSB. Las placas se incubaron a 37, 55, 60 y 65°C, observando la presencia de crecimiento a las 24, 48 y 72 horas de incubación. Se utilizó como medida de crecimiento el promedio de la medición de dos diámetros por colonia. Para cada aislamiento seleccionado se determinó en forma separada la cinética de crecimiento incubando a 37 y 55°C, con una agitación de 150 rpm. La cinética de crecimiento se realizó por duplicado en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 150 ml de TSB adicionado con 5 g/L de glucosa, inoculados con 3 ml de cultivos puros de los aislamientos en estudio ajustados a una  $DO_{540nm}$  de 0.1 ( $1 \times 10^7$  UFC/ml). La cinética de crecimiento se siguió mediante la determinación de la turbidez a 540nm y recuento en placa a tiempos (h) establecidos. La velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación ( $tD = \ln 2 / \mu$ ) de cada aislamiento se determinó utilizando la regresión lineal de los datos en la fase exponencial de crecimiento de cada uno. El ensayo se realizó en dos oportunidades. La información obtenida de las curvas de crecimiento ( $\mu$  y  $tD$ ) se analizó mediante análisis de varianza para un diseño completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos (genotipo x temperaturas de crecimiento), utilizando el paquete

estadístico SAS (*Statistical Analysis System*, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2003).

## **1.2 Producción celular y de exopolisacárido**

La producción de exopolisacárido y su relación con la temperatura se evaluó en cultivos puros, en fase estacionaria de crecimiento, a 37° y 55°C. La biomasa y el exopolisacárido producido se cuantificaron por medición de peso seco, por duplicado en dos ensayos independientes (Lee et al., 1997, Gandhi et al., 1997). Se centrifugaron 10 ml de cultivo en medio TSB a 15000 rpm por 30 minutos a 4 °C. Para la cuantificación de biomasa bacteriana, el paquete celular obtenido, previo a su lavado con agua destilada estéril, se filtró utilizando filtros Millipore® (tamaño de poro 0.22µm). Los filtros con la biomasa retenida se secaron a 80°C hasta peso constante. El exopolisacárido presente en el sobrenadante se precipitó con tres volúmenes de etanol 95% frío en agitación por 10 minutos. El precipitado obtenido se filtró en papel Whatman N°1 previamente secado hasta peso constante, y se colocó en estufa de aire forzado a 80°C hasta peso constante. La producción celular y de exopolisacáridos de los genotipos de *B. licheniformis* se analizaron con el mismo diseño estadístico planteado en el experimento anterior.

## **2. Resultados y discusión**

### **2.1 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento**

De acuerdo a la descripción realizada por Ronimus et al. (2003), los aislamientos de ambos genotipos (F y G) son capaces de crecer en placas con baja actividad de agua y con alta concentración de sales (7.0% NaCl), pero mostraron diferencias en su tolerancia a la temperatura, siendo los aislamientos del genotipo F los que presentaron mayor resistencia. El crecimiento en placa de los aislamientos seleccionados, en el rango de 37 a 65°C, se evaluó midiendo el diámetro de las colonias. Los resultados se muestran en la Tabla 1. Casi todos los aislamientos fueron capaces de crecer entre 37 y 60°C (31 de 32 aislamientos). Los aislamientos del genotipo F crecieron bien a 60°C mientras que el crecimiento fue menor en los aislamientos del genotipo G a esta temperatura. A 65°C sólo 7 aislamientos pertenecientes al genotipo F2 presentaron crecimiento muy escaso lo que concuerda con lo informado previamente por Ronimus et al. (2003).

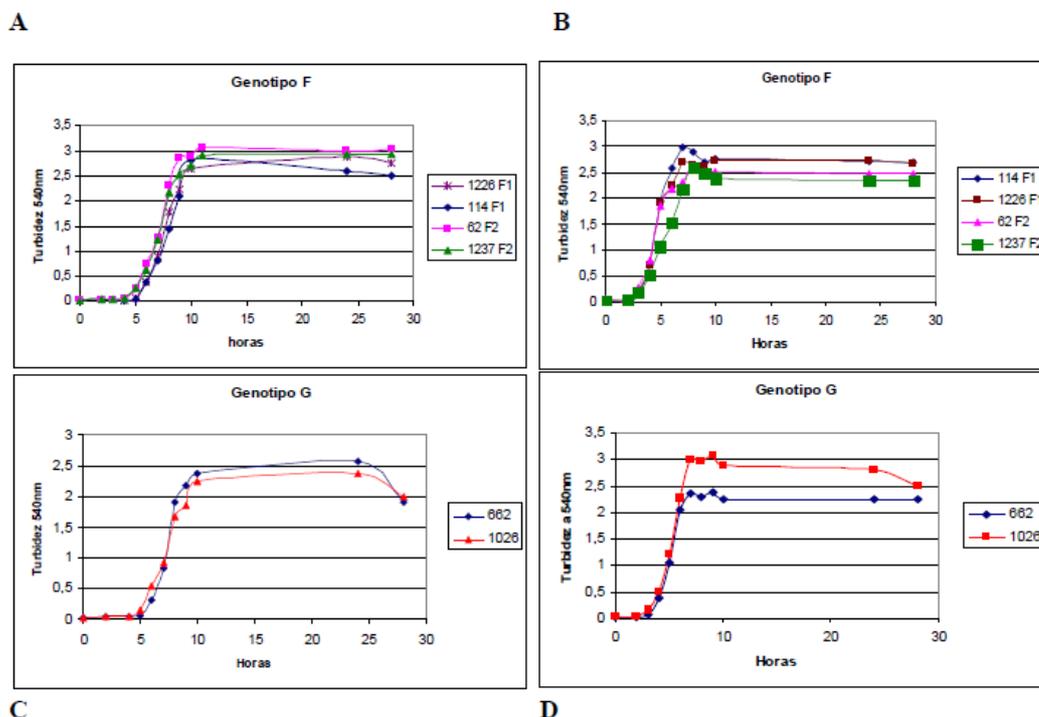
**Tabla 1.** Evaluación del efecto de la temperatura sobre el crecimiento en placa.

Aislamientos	37°C			55°C			60°C		65°C	
	24 hs.	48 hs.	72 hs.	24 hs.	48 hs.	72 hs.	24 hs.	48 hs.	24 hs.	48 hs.
<b>Genotipo F1</b>										
12	+	++	++	++	++	++	++	++	-	-
21	+	++	++	++	++	++	+	++	-	-
114	+	+	++	+++	+++	+++	++	+++	-	-
157	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
164	+	++	++	++	+++	+++	++	++	-	-
998	+	++	++	++	++	++	+++	+++	-	-
1006	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
1046	+	++	++	++	++	++	++	++	-	-
1055	+	++	++	+++	+++	+++	++	++	-	-
1103	+	+	++	++	++	++	++	+++	-	-
1175	+	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	-	-
1226	+	++	++	++	+++	+++	++	++	-	-
1502	+	+	++	+	++	++	+	++	-	-
1505	+	+	+	+	+	++	+	++	-	-
<b>Genotipo F2</b>										
23	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
27	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
41	+	++	++	++	++	++	+++	+++	+	+
56	+	++	++	++	++	++	++	+++	+	+
57	+	++	++	++	++	++	++	++	-	-
UY62	+	++	++	++	++	++	+++	+++	-	-
71	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
154	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
170	+	++	++	+	++	++	-	-	-	-
1013	+	++	+++	++	++	++	++	+++	-	-
1022	+	++	++	++	++	++	+++	+++	-	-
1237	+	++	++	++	++	++	+++	+++	+	+
1507	+	++	++	++	++	+++	++	++	+	+
1512	+	+	+	+	++	++	++	++	+	+
<b>Genotipo G</b>										
167	+	+	+	+	++	++	++	++	-	-
662	++	++	+++	+	++	++	++	++	-	-
UY1026	+	++	++	+	++	++	++	++	-	-
1612	+	++	++	++	++	++	++	++	-	-

Las representaciones de la Tabla se corresponden con la inexistencia de crecimiento (-), o colonias con diámetro de 0,4-1.0 cm (+), 1.0-2.0 cm (++) y > 2.0 cm (+++).

## 2.2 Evaluación de la cinética de crecimiento y de los parámetros $\mu$ y tD

Para cada aislamiento se determinó la cinética de crecimiento a 37 y 55°C, por ser temperaturas características de crecimiento microbiano mesofílico y termofílico, respectivamente. En general todos los aislamientos estudiados comenzaron la fase exponencial de crecimiento entre las 3 y 4 horas de inoculados, y ésta se extendió hasta las 10 o 12 horas de cultivo, llegando a valores de 11 log<sub>10</sub> en los recuentos en placa (Fig. 1). Utilizando los datos de DO<sub>540nm</sub> y recuentos microbianos obtenidos en esta fase de crecimiento, se calculó la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación (tD) para cada aislamiento.



**Figura 1.-** Curvas de crecimiento de aislamientos representativos de los genotipos F (A y B) y G (C y D), a 37 y 55°C, respectivamente.

La Tabla 2 muestra las medias y desvío estándar para cada genotipo proveniente del análisis estadístico de los datos.

**Tabla 2.** Velocidad de crecimiento  $\mu$  y tD para los tres genotipos.

	tD (h)	$\mu$ (log UFC/mLh <sup>-1</sup> )	tD (h)	$\mu$ (log UFC/mLh <sup>-1</sup> )
37 °C			55 °C	
<b>Genotipo F1</b>	0.59±0.09	1.20±0.18	0.71±0.22	1.05±0.31
<b>Genotipo F2</b>	0.54±0.06	1.30±0.14	0.62±0.17	1.22±0.44
<b>Genotipo G</b>	0.51±0.06	1.39±0.17	0.69±0.33	1.15±0.17
<b>Total de la población</b>	0.56±0.08	1.27±0.17	0.67±0.21	1.14±0.38

En el análisis estadístico de los datos se evaluó el grado de significancia de los parámetros genotipo y temperatura sobre los indicadores de crecimiento ( $\mu$  y tD) de los aislamientos, así como la interacción genotipo\*temperatura. No se observaron diferencias significativas ( $P>0.10$ ) para  $\mu$  y tD entre los tres genotipos estudiados. Al estudiar al total de la población, únicamente el factor temperatura mostró un efecto significativo para tD ( $P<0.01$ ) dentro del modelo, mientras que la significancia para  $\mu$  fue de  $P=0.08$  (Tabla 2). Si bien la mayoría de los aislamientos mostraron esta disminución de crecimiento con la temperatura, existen algunos aislamientos en todos los genotipos que no fueron afectados. Estos resultados contrastan con la tendencia mostrada en el crecimiento en placa que sugería un aumento del crecimiento a 55°C en las primeras 24 horas de cultivo. Si bien *B. licheniformis* es un microorganismo

mesófilo, la ocurrencia de aislamientos termófilos o capaces de crecer a temperaturas superiores a la óptima, generalmente se ha informado en los estudios de poblaciones (Crielly et al., 1994, Scheldeman et al., 2005, Reginensi et al., 2011). Con la población en estudio ocurre lo mismo, existen aislamientos que si bien resisten tratamientos con altas temperaturas, sus temperaturas óptimas de crecimiento varían. En la Tabla 3 se muestran los valores de tD para todos los aislamientos. La mayoría se clasificarían como aislamientos termotolerantes, es decir que, disminuyen su tasa de crecimiento a 55°C, aunque los valores de tD a 37 y 55°C son muy similares. Los aislamientos 1502, 1103, 12, 170 y 23 podrían considerarse termófilos, ya que el tD a 55°C disminuye marcadamente en comparación al de 37°C. Por otro lado, los aislamientos 1055, 1175 y 1612 exhibieron un comportamiento claramente mesófilo, duplicando su tD a temperaturas más elevadas.

Si bien estadísticamente todos los genotipos se ven afectados en su crecimiento por el aumento de la temperatura, este comportamiento es altamente dependiente de cada aislamiento en los tres genotipos. El comportamiento del genotipo G es variable, y si bien estadísticamente se comporta de la misma manera se debe tener en cuenta que se trata sólo de cuatro aislamientos.

**Tabla 3.** Valores de tD de todos los aislamientos a las distintas temperaturas ensayadas.

Genotipo F1	tD (h)		Genotipo F2	tD (h)		Genotipo G	tD (h)	
	37°C	55°C		37°C	55°C		37°C	55°C
12*	0,73±0,03	0,61±0,06	23*	0,58±0,03	0,35±0,09	167	0,45±0,05	0,62±0,07
21	0,55±0,09	0,60±0,08	27	0,61±0,03	0,59±0,03	662	0,45±0,01	0,42±0,04
114	0,58±0,01	0,64±0,06	41	0,46±0,04	0,45±0,04	UY1026	0,54±0,01	0,56±0,02
157	0,62±0,03	0,63±0,06	56	0,51±0,06	0,67±0,04	1612	0,58±0,03	1,17±0,01
164	0,51±0,01	0,67±0,03	57	0,58±0,11	0,82±0,01			
998	0,67±0,06	0,90±0,09	UY62	0,62±0,05	0,87±0,09			
1006	0,44±0,04	0,55±0,07	71	0,50±0,12	0,81±0,05			
1046	0,63±0,04	0,67±0,01	154	0,50±0,02	0,60±0,10			
1055	0,5±0,03	0,99±0,09	170*	0,61±0,01	0,30±0,05			
1103*	0,76±0,02	0,59±0,11	1013	0,47±0,03	0,61±0,02			
1175	0,63±0,09	1,28±0,12	1022	0,48±0,01	0,63±0,04			
1226	0,51±0,03	0,63±0,08	1237	0,62±0,05	0,59±0,03			
1502*	0,59±0,05	0,38±0,02	1507	0,52±0,08	0,78±0,09			
1505	0,55±0,09	0,82±0,03	1512	0,48±0,07	0,63±0,02			

\* Aislamientos considerados termófilos

Al comparar estos resultados con los obtenidos en el ensayo de crecimiento en placa, resulta contrastante que algunos aislamientos del genotipo F2 (71, 1507), que presentaron un aumento en su tD a 55°C, tienen un rango de temperaturas de crecimiento de 37 a 65°C. La producción de EPS, así como variaciones en los componentes de la membrana celular, podrían facilitar el crecimiento bacteriano a temperaturas por encima de la óptima. Igualmente los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado en la literatura, siendo los aislamientos del genotipo F (F1 y F2) los más termotolerantes (Ronimus et al., 2003).

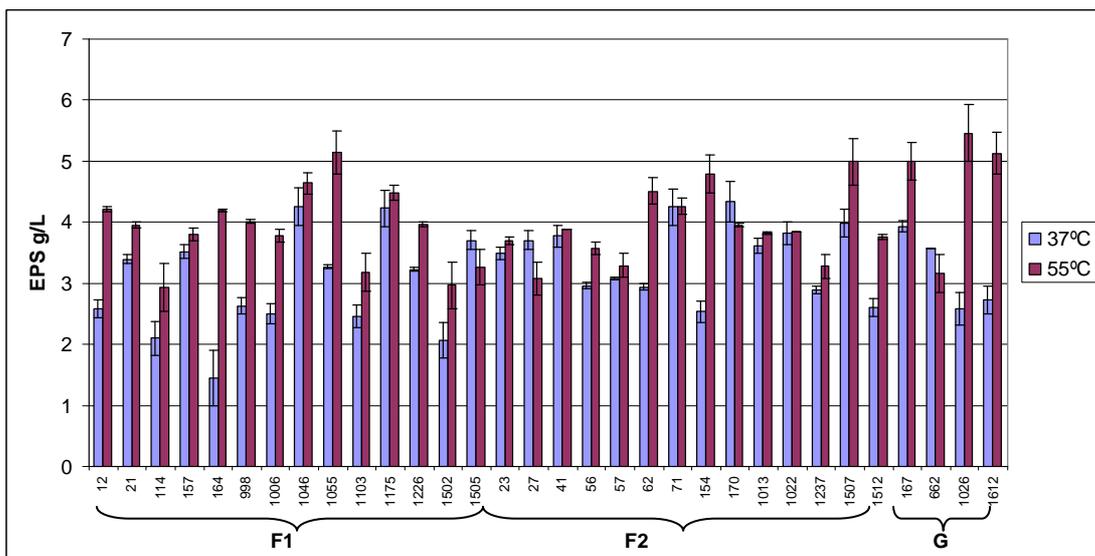
### 2.3 Producción celular y de exopolisacárido

La producción de exopolisacáridos se evaluó en cultivos de 30 horas de crecimiento a 37 y 55°C para todos los aislamientos. La biomasa celular y exopolisacárido producido se cuantificaron por mediciones de peso seco (Lee et al., 1997, Gandhi et al., 1997). En la Tabla 4 se muestran los valores promedio obtenidos para cada genotipo, y su desviación estándar, expresada en mg de EPS producido por mg de biomasa celular (mg EPS/mg de biomasa celular). Mediante el análisis estadístico de los datos se determinó la incidencia del genotipo y de la temperatura sobre la producción de EPS. No se encontraron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) en la producción de EPS entre los distintos genotipos. Sin embargo el efecto de la temperatura fue altamente significativo ( $P<0.0001$ ), observándose un aumento de la producción de EPS a 55°C.

**Tabla 4.** Producción de EPS (mg/mg bacteria) de los distintos genotipos de *B. licheniformis*.

	Producción de EPS (mg/mg biomasa)	
	37°C	55°C
<b>Genotipo F1</b>	1.44±0.52	1.79±0.40
<b>Genotipo F2</b>	1.38±0.30	1.95±0.69
<b>Genotipo G</b>	1.23±0.25	2.23±0.49

El crecimiento a 55°C provocó un aumento en la producción de EPS para los tres genotipos. La temperatura es uno de los factores de mayor influencia en la producción de EPS en esta especie, conjuntamente con la concentración de sacarosa y el pH del medio (Tumpang et al., 2011). Sin embargo, al igual que lo observado en el ensayo de cinética de crecimiento, el grado en que afecta la temperatura es dependiente del aislamiento bajo estudio. La Figura 2 muestra la producción de EPS para todos los aislamientos a las dos temperaturas ensayadas, se observa claramente la variabilidad individual en el efecto de la temperatura así como en la capacidad de producción.



**Figura 2.** Producción de EPS de los aislamientos de *B. licheniformis* agrupados por genotipo.

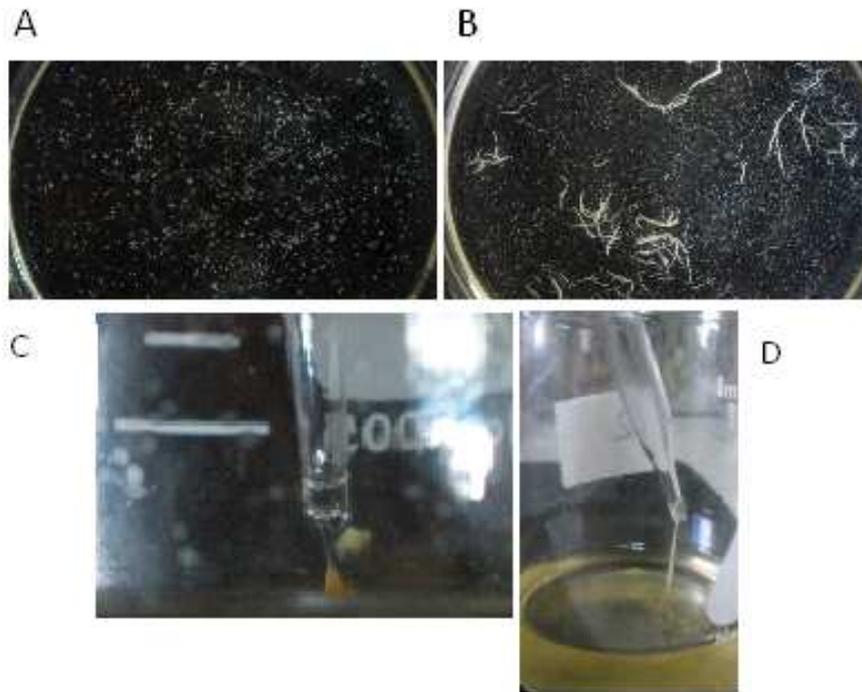
En cuatro de los aislamientos estudiados, la cantidad de EPS producida fue mayor a 37 que a 55°C (aislamientos 1505, 27, 170, 662). Una de las funciones principales del EPS es brindarle protección a la bacteria frente a presiones

ambientales, en respuesta tanto a factores bióticos como abióticos, o para su adaptación a ambientes extremos (Donot et al., 2012). En el experimento anterior observamos que para la mayoría de los aislamientos, un aumento en la temperatura ocasionaba una disminución en la velocidad de crecimiento acompañada de un aumento en la producción de EPS. Sin embargo, esto no debería generalizarse porque los aislamientos termófilos mostraron un incremento en la velocidad de crecimiento y en la producción de EPS a 55°C, con excepción de la cepa 170.

La cantidad de EPS producida está en el rango de 1,45 a 4,35 g/L a 37°C y 2,94 a 5,47 g/L a 55°C. La producción de aislamientos como 1055, 1026 y 1612 fue superior a 5 g/L a 55°C. Gandhi et al. (1997) han establecido que las condiciones de cultivo, la fuente de carbono, nitrógeno y el pH del medio influyen en la cantidad de EPS producido por aislamientos del género *Bacillus*. Considerando que no se evaluaron medidas para optimizar la producción de EPS más que la temperatura de incubación, la variabilidad de los aislamientos estudiados es auspiciosa, puesto que trabajos con cepas de *B. licheniformis* seleccionadas para la producción de EPS y/o bajo condiciones de óptimas de producción presentaron valores de producción de EPS en el rango de 7 a 9 g/L (Liu et al., 2010, Song et al., 2011, Tumpang et al., 2011).

Si bien no se detectaron diferencias en cuanto a la producción de EPS entre los distintos genotipos, al momento de la precipitación se observó la producción de polímeros con distintas estructuras macroscópicas y propiedades de filancia

(viscosidad) entre los aislamientos. En la Figura 3 se observan tres de las estructuras macroscópicas observadas, siendo la estructura granular (Fig. 3A) la predominante.



**Figura 3.** Estructura macroscópica de los EPS producidos por distintos aislamientos de *B. licheniformis*. A) Granulado, B) Hebras o filamentos, C y D) Filante.

La cantidad de EPS producido por estos aislamientos, así como el aumento de la producción con la temperatura, podrían explicar la capacidad de estos microorganismos de colonizar las superficies de la línea de producción de polvos lácteos. La producción de EPS es uno de los factores biológicos más importantes en la capacidad de adhesión de las bacterias y determina tanto la estructura como la resistencia cohesiva del biofilm (Stoodley et al., 2002, Sutherland, 2001). Estudios realizados en *B. subtilis* con mutantes en genes del

operón *eps* confirman la importancia del EPS en la formación de biofilm, dado que los mutantes en los genes *epsJ-epsN* se vieron severamente afectados en su capacidad para formar biofilm (Nagorska et al., 2010).

### **3. Conclusiones**

La mayoría de los aislamientos (31 de 32) son termotolerantes, ya que presentaron crecimiento en placa a 60-65°C, pero sólo cinco fueron considerados como termófilos de acuerdo a la variación  $\mu$  y tD, analizada a 37 y 55°C. Estadísticamente, todos los genotipos se afectaron en su crecimiento por el aumento de la temperatura, aunque este efecto presentó excepciones dependientes del aislamiento estudiado. Todos los aislamientos produjeron EPS, algunos con niveles de producción cercanos a los reportados para cepas seleccionadas con este fin. El crecimiento a 55°C provocó un aumento en la producción de EPS para los tres genotipos, aunque este efecto no fue general para todos los aislamientos. El EPS es el componente principal de la matriz del biofilm. Su producción y el efecto de la temperatura sobre la misma podrían estar directamente relacionados con la capacidad de estos microorganismos de adherirse y colonizar la línea de producción de polvos lácteos. Son muchos los factores que direccionan la producción de EPS y muchos más los que determinan la adhesión y formación de un biofilm. Para establecer el papel que cumple el EPS en la formación de incrustaciones en la línea de producción, y la ventaja competitiva que le pueda otorgar a los distintos microorganismos

debería realizarse un estudio más complejo, procurando imitar las condiciones comúnmente presentes en la industria.

## **CAPITULO 3**

### **Evaluación de la capacidad proteolítica, lipolítica y amilolítica**

#### **Objetivos específicos**

- Evaluar propiedades de interés tecnológico, como el potencial de hidrólisis de proteínas, lípidos y almidón, de las cepas de *Bacillus licheniformis* seleccionadas.
- Analizar el efecto de la temperatura sobre la capacidad proteolítica de aislamientos de los distintos genotipos.

## 1. Materiales y métodos

### 1.1 Evaluación semi-cuantitativa de la capacidad proteolítica, lipolítica y amilolítica

La capacidad proteolítica, lipolítica y amilolítica se evaluó primariamente en cultivos en medio PCA adicionado con caseína al 1%, agar SpiritBlue adicionado con *Lipase reagent* (DIFCO, Laboratories, Detroit, MI), y PCA con almidón adicionado al 1%, respectivamente, por duplicado. Las soluciones de caseína y almidón se prepararon en agua destilada (10% p/v), y se esterilizaron por separado a 10lbs durante 10 min. Se agregaron asépticamente al medio cultivo a 50°C, previo al servido en placas. Las placas se inocularon a partir de cultivos frescos en TSB utilizando un ansa calibrada de 2mm, y se incubaron a 37°C durante 48 horas. Adicionalmente, la actividad proteolítica también se ensayó a 55°C. Para visualizar la hidrólisis de almidón se adicionaron sobre la colonia, unas gotas de solución de yodo (I<sub>2</sub>, 0.3% p/v, KI 0.7% p/v). 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, denominando a esta relación como tasa de actividad proteolítica (TAP), lipolítica (TAL) o amilolítica (TAA). El análisis de la información de actividad amilolítica, proteolítica y lipolítica de las variantes

analizadas se realizó mediante un diseño completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos (variantes x tiempos de crecimiento), utilizando el paquete estadístico SAS (*Statistical Analysis System*, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2003).

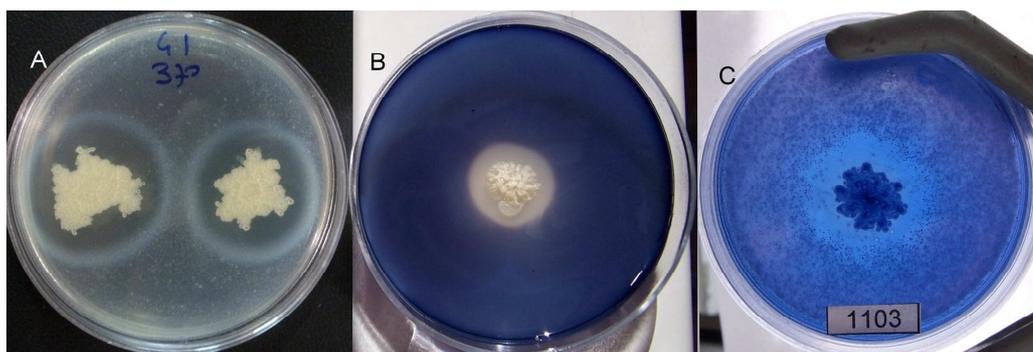
## **1.2 Determinación de la actividad proteolítica**

La actividad proteasa se evaluó en sobrenadantes de cultivos en fase estacionaria a 37 y 55°C. Los cultivos fueron centrifugados a 15000 rpm a 4°C por 30 minutos. El sobrenadante obtenido se esterilizó por filtración en filtros Millipore® (tamaño de poro 0.22 µm) y se utilizó para medir la actividad enzimática. Para determinar la actividad proteolítica se realizó el ensayo de hidrólisis de azocaseína (Andrews y Asenjo, 1986). El principio de este ensayo consiste en la hidrólisis de la azocaseína por acción de proteasas, liberando compuestos con grupos azobencenos que absorben luz a 450 nm. Para ello, 200µl de sobrenadante crudo filtrado y 400µl de solución de azocaseína al 1% en buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7.5, se incubaron a 37 y 55°C durante 90 minutos. La reacción se detuvo con el agregado de 200 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 10%, incubando a temperatura ambiente por 10 minutos. El sobrenadante de la mezcla se recogió por centrifugación a 10000 rpm por 15 minutos y se midió la absorbancia a 450 nm. Todas las medidas se realizaron por triplicado y se incluyó como control negativo agua destilada. Una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de

sobrenadante libre de células necesario para incrementar una unidad de absorbancia a 450 nm en las condiciones del ensayo.

## 2. Resultados y discusión

Se profundizó en el estudio de las propiedades tecnológicas, particularmente aquellas que afectan el uso de polvos lácteos cuando su destino es el de ingrediente alimenticio o se espera una vida útil prolongada. A los efectos de poder comparar el potencial de los distintos aislamientos, se evaluaron primeramente las propiedades proteolíticas, amilolíticas y lipolíticas mediante un ensayo semicuantitativo en placa (Fig. 1). Como parámetro de cuantificación se utilizó la tasa de actividad proteolítica (TAP), lipolítica (TAL) o amilolítica (TAA), previamente definidas.



**Figura 1.** Ensayo cualitativo de actividad enzimática: A) proteólisis, B) amilólisis y C) lipólisis de aislamientos de *B. licheniformis*.

La capacidad de los aislamientos de *B. licheniformis* de producir exoenzimas con diferentes actividades hidrolíticas se confirmó con este ensayo. El 78% de

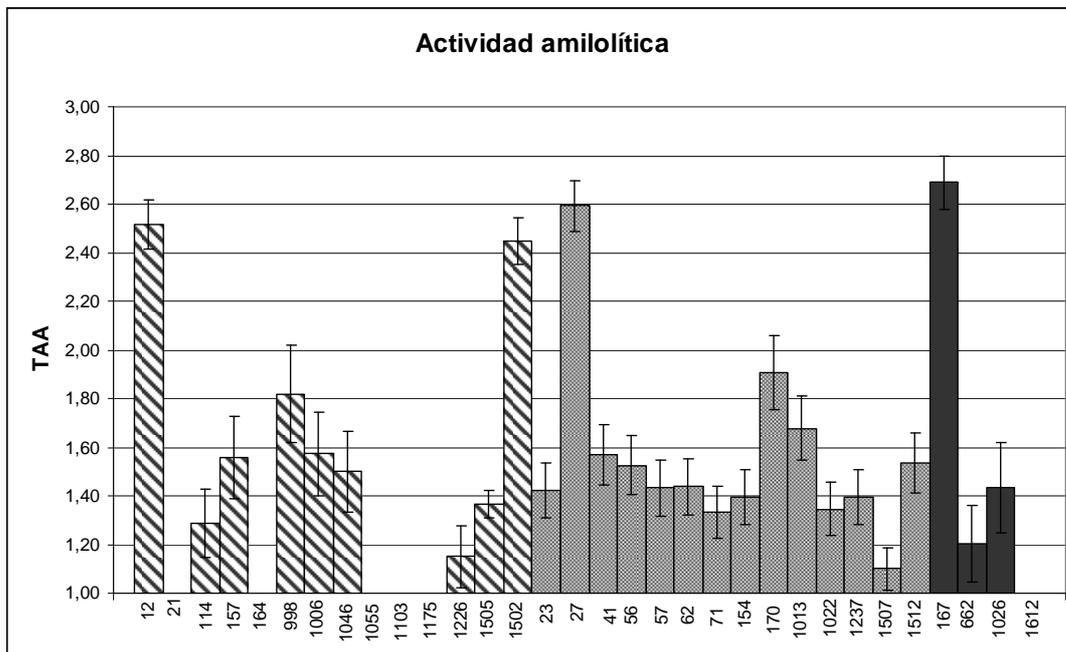
los aislamientos presentaron las tres actividades: proteolítica, amilolítica y lipolítica. La totalidad de los aislamientos presentaron actividad lipolítica, el 81% fueron capaces de hidrolizar el almidón, mientras que la capacidad proteolítica varió, dependiendo de la temperatura de incubación, entre un 94 y un 97%, a 37 y 55°C, respectivamente (Tabla 1).

**Tabla 1.** Evaluación cualitativa de la actividad enzimática de los distintos genotipos de *B. licheniformis*.

	Aislamientos con actividad proteolítica		Aislamientos con actividad amilolítica	Aislamientos con actividad lipolítica
	37°C	55°C	37°C	37°C
<b>Genotipo F1</b>	14/14	14/14	9/14	14/14
<b>Genotipo F2</b>	13/14	14/14	14/14	14/14
<b>Genotipo G</b>	3/4	3/4	3/4	4/4

## 2.1 Evaluación de la tasa amilolítica

La capacidad amilolítica se detectó en el 78% de los aislamientos. Los valores de TAA ( $\mu \pm$  d.s.) obtenidos para los genotipos F1, F2 y G fueron  $1.44 \pm 0.51$ ,  $1.55 \pm 0.35$  y  $1.58 \pm 0.76$ , respectivamente.



**Figura 2.-** TAA de todos los aislamientos ordenados por genotipo:

☉ Genotipo F1, ● Genotipo F2, ● Genotipo G.

Si bien los valores TAA no reflejan diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) para los genotipos estudiados, la distribución de los aislamientos dentro de cada grupo es distinta, y las mayores desviaciones de la media se observan en los grupos F1 y G (Fig. 2). La totalidad de los aislamientos pertenecientes al genotipo F2 fueron capaces de hidrolizar almidón, aunque el nivel de tasa enzimática expresado dependió de cada aislamiento. Los aislamientos del genotipo F1 fueron los que reflejaron con más claridad la variabilidad intra genotipo. Cinco aislamientos (21, 164, 1055, 1103 y 1175) no presentaron actividad amilolítica, mientras que dos (12 y 1502) exhibieron valores de TAA que superaron ampliamente la media. En cuanto a los aislamientos del genotipo G, presentaron amplia variabilidad y, como se ha mencionado, el número de

aislamientos es escaso. Esto se evidencia al comparar los valores de TAA obtenidos para los aislamientos 167 y 1612, el primero presentó el valor más alto de actividad amilolítica dentro del total de la población, mientras que el otro no presentó actividad enzimática detectable bajo las condiciones del ensayo.

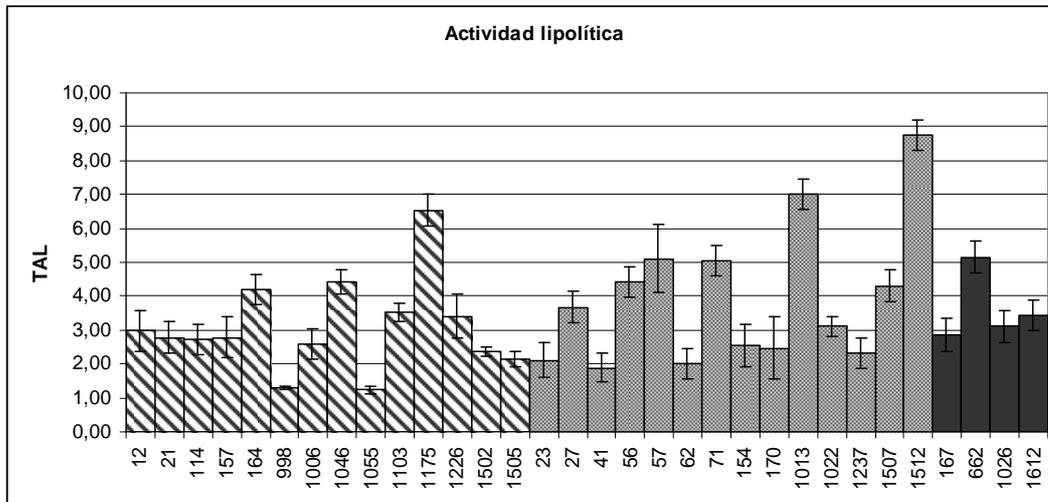
La actividad  $\alpha$ -amilasa específicamente corta los enlaces  $\alpha$ -1,4 de polímeros de glucosa, ocasionando la hidrólisis del almidón, disminuyendo su viscosidad, y aumentando el número de extremos reductores de almidón. Estas enzimas son utilizadas en varios procesos industriales, especialmente las  $\alpha$ -amilasas producidas por *B. licheniformis* están involucradas en varios procesos de degradación de almidón en la industria alimentaria. Sólo en los últimos 2 años se han publicado cerca de 3000 patentes que involucran amilasas producidas por cepas nativas o mutantes de *B. licheniformis*. Estas enzimas son utilizadas en la elaboración de jarabes de glucosa y fructosa; para mejorar la harina en la industria panificadora; para producir almidones modificados en la industria papelera; para remover almidón en la manufactura de textiles; y como aditivo de detergentes (Lee et al., 2006a). Cada uno de estos procesos es llevado a cabo bajo diferentes condiciones pero generalmente ocurren a temperaturas superiores a 55°C. La estabilidad térmica de estas amilasas ha sido reportada por varios autores, soportando temperaturas de hasta 90°C (Bozic et al., 2011). En el presente trabajo se han detectado por lo menos cuatro aislamientos con “gran capacidad” amilolítica (27, 12, 1502, 167, Fig. 2) a 37°C. Si bien las enzimas amilolíticas no son relevantes desde el punto de vista de la calidad de los productos lácteos, el estudio de actividad y termoestabilidad de estas

enzimas es de gran interés desde el punto de vista biotecnológico, para ser usadas a nivel industrial.

## **2.2 Evaluación de la tasa lipolítica**

La capacidad lipolítica se presentó en todos los aislamientos, y fue la única actividad enzimática que se detectó en el aislamiento 1612 perteneciente al perfil G (Fig. 3). La mayor tasa lipolítica se observó para aislamientos del perfil F que exhibieron altos niveles de lipólisis, mientras que la proteólisis (1507, 1512, 1013, 1175) y amilólisis (21, 164) fueron de un nivel basal o nulo.

Los valores de TAL ( $\mu \pm$  d.s.) obtenidos del análisis estadístico para los genotipos F1, F2 y G fueron  $3.07 \pm 1.35$ ,  $3.91 \pm 2.04$  y  $3.64 \pm 1.03$ , respectivamente, y no presentan diferencias significativas entre genotipos ( $P > 0.05$ ). Si bien todos los aislamientos presentaron actividad lipolítica el grado de capacidad hidrolítica parece ser propio de cada aislamiento y presentaron una gran variabilidad dentro de su genotipo. Los aislamientos con mayor poder lipolítico pertenecen al genotipo F2, el cual en promedio, es el que presentó una mayor tasa.



**Figura 3.** TAL de todos los aislamientos ordenados por genotipo:

☉ Genotipo F1, ● Genotipo F2, ● Genotipo G.

Muchos microorganismos son capaces de producir más de un tipo de lipasas, incluso con especificidades diferentes. Condiciones como temperatura, pH, concentración de sales y disponibilidad de oxígeno, pueden afectar la producción de enzimas. De acuerdo a lo reportado por Chen et al. (2004) las lipasas producidas por aislamientos de *Bacillus* sp. provenientes de polvos lácteos, entre ellos aislamientos de *B. licheniformis*, pertenecen al grupo II (1,3-específicas). Presentan preferencias por ácidos grasos de cadena corta ( $C_{4:0}$ ,  $C_{6:0}$ ), por lo que deberían clasificarse como estererasas. En los productos lácteos, la lipólisis contribuye al desarrollo de sabores deseables como indeseables, inicialmente a través de la hidrólisis de triacilglicérols de la leche. Los ácidos grasos de cadena corta, tales como el butírico ( $C_{4:0}$ ), caproico ( $C_{6:0}$ ) y caprílico ( $C_{8:0}$ ) son responsables de sabores fuertes y picantes buscados en la elaboración de quesos de maduración prolongada. Los ácidos grasos de

cadena mediana, como el cáprico (C<sub>10:0</sub>) y láurico (C<sub>12:0</sub>) imparten un sabor jabonoso, mientras que los de cadena larga, como el mirístico (C<sub>14:0</sub>), palmítico (C<sub>16:0</sub>) y esteárico (C<sub>18:0</sub>) contribuyen poco al desarrollo de sabores (Al-Shabibi et al., 1964). Además, los ácidos grasos libres son también precursores de otros compuestos de sabor como acetoacetato,  $\beta$ -cetoácidos, metil-cetonas, ésteres y lactonas (Arnold et al., 1975). Los ácidos grasos insaturados liberados durante la lipólisis son susceptibles a la oxidación y a la formación concomitante de aldehídos y cetonas, que dan lugar a sabores indeseables descritos como "oxidado o metálico". Otros sabores desagradables en productos lácteos, como "rancio, amargo, butírico, jabonoso y astringente", también se han atribuido a la lipólisis. Los ácidos grasos de cadena corta son los que más contribuyen al sabor deseable de los productos lácteos, por lo que la degradación de los mismos podría significar un impacto negativo importante sobre el sabor de la leche en polvo cuando es reconstituida, o en el producto final cuando es utilizada como ingrediente.

Las enzimas lipolíticas producidas por este género son termoestables y de allí su importancia en los procesos industriales. La mayoría de las lipasas producidas por *Bacillus* muestran una actividad óptima entre 60 y 75°C, y estudios previos confirman la resistencia de las lipasas producidas por *B. licheniformis* al tratamiento térmico conservando más de un 85% de su actividad original posteriormente a un tratamiento a 90°C (Chen et al., 2004). Más aún, Shamsuzzaman et al. (1986) concluyen que el secado por pulverización, aplicado en la elaboración de polvos lácteos luego de un

tratamiento térmico a 70°C por 2 minutos, no tiene efecto significativo sobre la actividad lipolítica de las enzimas bacterianas, las cuales se mantienen activas en el producto final. Teniendo en cuenta además que el pH de la leche (~ 6.7) se encuentra dentro del rango óptimo de actividad de las lipasas de *Bacillus*, es evidente el impacto que pueden causar estas enzimas en la calidad del producto lácteo.

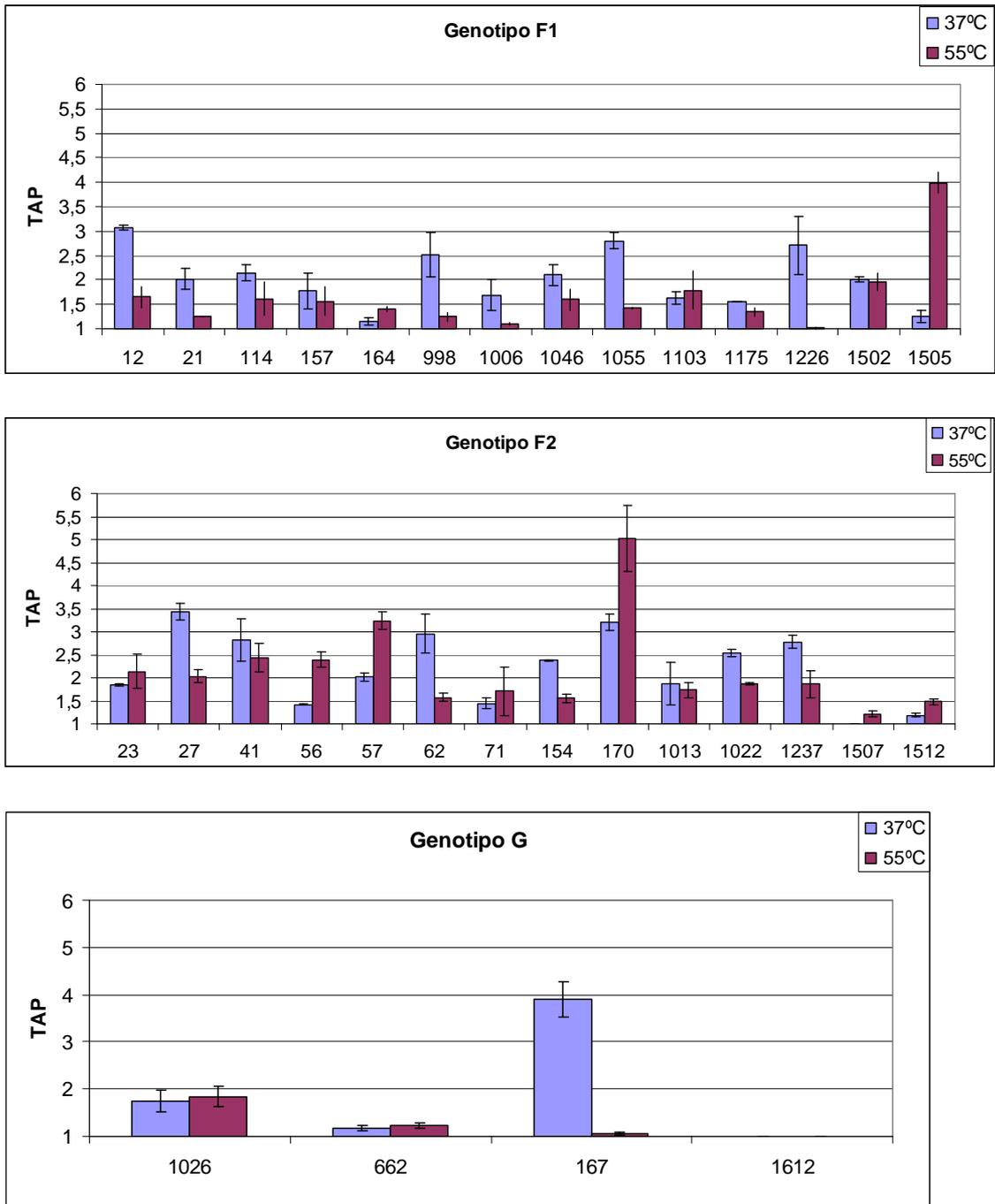
Si bien algunos autores indican que para enzimas producidas por *B. licheniformis* se observó el mismo patrón de lipólisis en polvos lácteos como en soluciones tampón (Chen et al., 2004), sería importante confirmar el modo de acción de las lipasas producidas por los aislamientos obtenidos y cuantificar su actividad en el producto final.

### **2.3 Evaluación de la actividad proteolítica**

La capacidad de producir enzimas extracelulares proteolíticas se ensayó a 37 y 55°C. La cuantificación relativa se realizó de la misma forma detallada anteriormente. La tasa proteolítica a 37 y 55°C se observó en la mayoría de los aislamientos (97%) estudiados. La cepa 1612 no presentó actividad para ninguna de las condiciones ensayadas, mientras que la cepa 1507 presentó actividad únicamente a 55°C. Para el procesamiento estadístico de los datos la medida utilizada fue la tasa de actividad proteolítica (TAP) definida previamente.

El análisis de las medias de TAP indicó que los aislamientos del genotipo F2 presentan mayor capacidad proteolítica que los F1 ( $P < 0.0007$ ) con valores de  $2.32 \pm 0.75$  y  $2.09 \pm 0.61$ , respectivamente, mientras que los aislamientos del genotipo G presentaron un valor intermedio ( $2.17 \pm 2.04$ ). El genotipo G fue eliminado del análisis estadístico por disponer de pocos datos ( $n=4$ ) y exhibir una amplia variabilidad. El aumento de la temperatura de incubación tubo un efecto negativo sobre la capacidad enzimática de los sobrenadantes para los tres genotipos (Fig. 4). El análisis estadístico de la relación entre el genotipo y la temperatura de incubación indicó, que la TAP a  $55^{\circ}\text{C}$  en los aislamientos del genotipo F1 presentó un promedio significativamente inferior con su equivalente a  $37^{\circ}\text{C}$  ( $1.35 \pm 0.24$  vs.  $2.21 \pm 0.60$ ,  $P < 0.05$ , respectivamente). Sin embargo, para los aislamientos del genotipo F2 las diferencias en la TAP a  $55$  y  $37^{\circ}\text{C}$  no fueron estadísticamente significativas ( $2.36 \pm 0.86$  vs  $2.33 \pm 0.71$ ,  $P > 0.05$ , respectivamente).

El análisis de los aislamientos dentro de cada uno de los genotipos indicó la existencia de diferencias. Se encontraron aislamientos con alta capacidad proteolítica mientras que otros fueron menores dentro del mismo genotipo. Este mismo comportamiento se observó con el efecto de la temperatura frente a la capacidad proteolítica. Las cepas 170, 57 y 56 pertenecientes al genotipo F2 mostraron cerca de un 50% más de actividad proteolítica a  $55^{\circ}\text{C}$  con respecto a la observada a  $37^{\circ}\text{C}$ . Mientras que el aislamiento 1505 (F1) triplicó su actividad a  $55^{\circ}\text{C}$ .



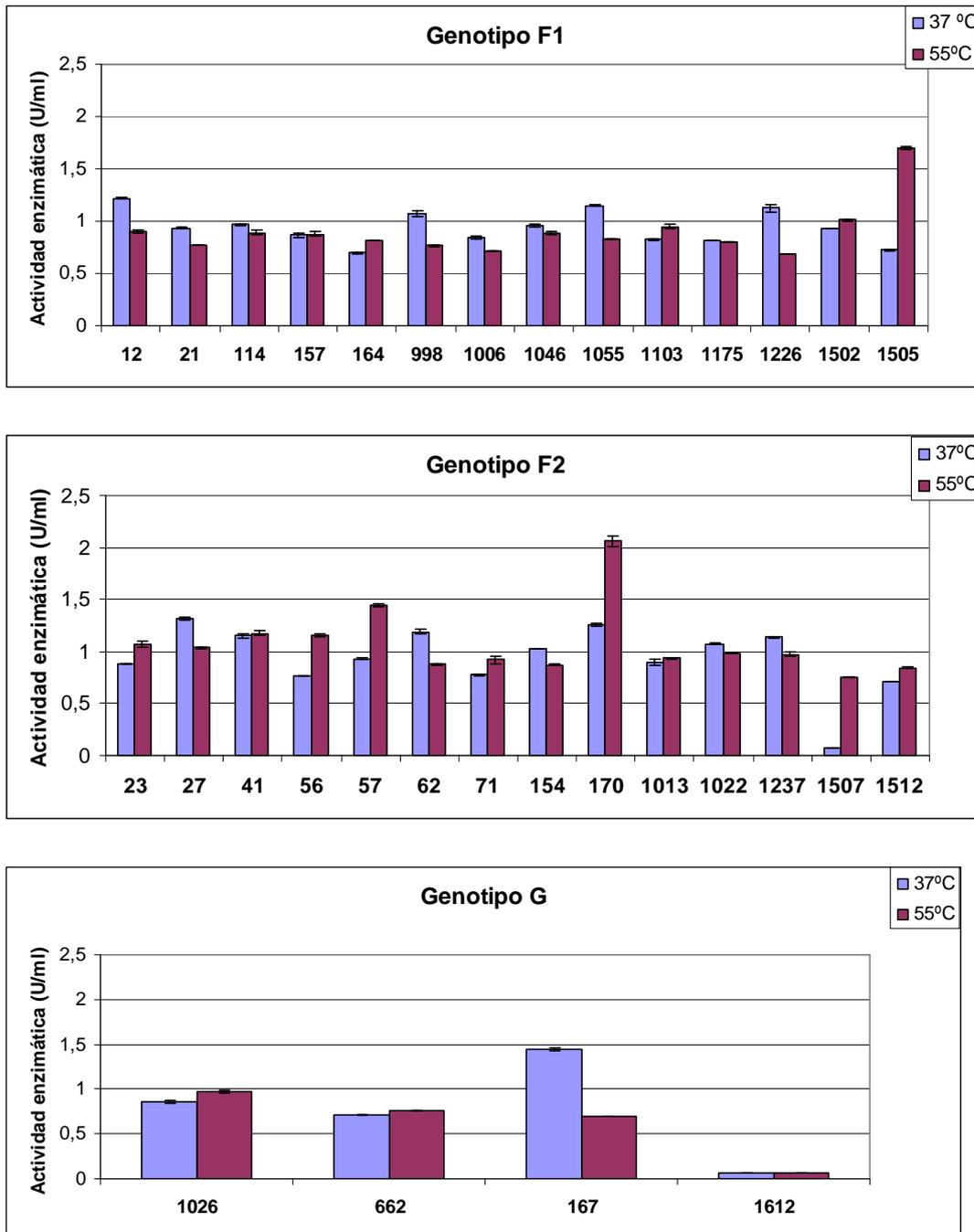
**Figura 4.** TAP de los tres genotipos a 37 y 55°C (media y desvío estándar).

Este ensayo, si bien es semi-cuantitativo, permite considerar la existencia de diferencias entre los aislamientos estudiados dentro de cada genotipo.

La producción de enzimas extracelulares en especies del género *Bacillus*, generalmente ocurre en la fase exponencial tardía y estacionaria temprana, alcanza su máximo y se mantiene constante incluso durante la esporulación (Priest, 1977). Se cuantificó la capacidad proteolítica para todos los aislamientos a partir de sobrenadantes filtrados de cultivos puros con aproximadamente 30 horas de crecimiento (fase estacionaria). Los resultados de las cinéticas de crecimiento y de actividad proteolítica en placa mostraron un comportamiento diferencial de los aislamientos con respecto a la temperatura, afectando su velocidad de crecimiento y la actividad proteolítica. La cuantificación por espectrofotometría de la actividad proteolítica confirma los resultados obtenidos en el ensayo en placa. En la Figura 5 se muestran los valores de actividad proteolítica de sobrenadantes de cultivos crecidos a 37 y 55°C. El efecto de la temperatura de crecimiento sobre la capacidad proteolítica fue significativo ( $P < 0.05$ ), si bien el genotipo F2 parece ser el menos afectado. Los valores de actividad proteolítica para el genotipo F1 fueron de  $1.02 \pm 0.03$  U/ml y  $0.84 \pm 0.2$  U/ml, mientras que para el genotipo F2 fueron de  $1.12 \pm 0.05$  U/ml y  $1.05 \pm 0.03$  U/ml, para 37 y 55°C respectivamente. El efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica en el genotipo G también es negativo, aunque la variación entre los aislamientos fue importante (Fig. 5),  $0.77 \pm 0.56$  U/ml y  $0.63 \pm 0.38$  U/ml, para 37 y 55°C respectivamente.

Las relaciones observadas en el ensayo en placa para la actividad proteolítica a las diferentes temperaturas se confirman en este ensayo de cuantificación, lo

cual indica que el uso de TAP es una buena aproximación a la evaluación de la actividad proteolítica.



**Figura 5.-** Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica medida según el ensayo de Andrews y Asenjo (1986) utilizando extracto crudo en cultivos incubados durante 30 horas.

La proteólisis en leche procesada se mide monitoreando cambios en los niveles de nitrógeno no proteico (NPN, por sus siglas en inglés). Esto se asocia a cambios en la funcionalidad del producto, así como cambios microestructurales (ej. floculación) y aumento de viscosidad. Las proteasas bacterianas generalmente causan un aumento de este NPN y la formación de para- $\kappa$ -caseína, acompañado de una desestabilización de la micela de caseína y coagulación de la leche. La información de la literatura indica que las especies del género *Bacillus* poseen una amplia capacidad proteolítica, produciendo más de un tipo de proteasas estables a altas temperaturas. Chopra y Mathur (1984) informaron que las proteasas producidas por *B. licheniformis* no perdieron actividad luego de un tratamiento a 70°C durante 10 minutos. Estas observaciones fueron confirmadas por Chen et al. (2004), quienes demostraron la capacidad de los aislamientos de *B. licheniformis*, provenientes de las líneas de producción de polvo lácteos de producir más de un tipo de proteasas, que presentaron diferencias en cuanto a su estabilidad térmica. Los ensayos de inhibidores específicos indican que estos aislamientos son capaces de producir serino-proteasas y metalo-proteasas, pero la proporción de cada una es aislamiento dependiente. Asimismo, los ensayos de estabilidad térmica reflejan la presencia de más de una enzima, con diferencias claras en la estabilidad frente a altas temperaturas (Chen et al., 2004). Estas observaciones previas podrían explicar los resultados obtenidos en el presente trabajo. Las diferencias observadas en la actividad proteolítica con respecto a la temperatura podría deberse a la presencia de más de una enzima y/o a diferencias en la temperatura óptima de acción de las enzimas producidas. Para confirmar estas

hipótesis se deberá profundizar en el estudio de las proteasas actuantes en estos sobrenadantes, comenzando con zimogramas y ensayos de inhibidores específicos, para determinar la naturaleza de la o las proteasas presentes.

Los resultados del análisis de la actividad proteolítica y su relación con la temperatura obtenida en el ensayo semi-cuantitativo en placa fueron confirmados por la cuantificación enzimática por espectrofotométrica. La correlación de las dos metodologías aplicadas para evaluar la capacidad proteolítica de los aislamientos fue muy buena tanto a 37°C ( $r^2=0.74$ ) como a 55°C ( $r^2=0.84$ ), lo que indica que el parámetro TAP antes definido resulta un buen indicador de la actividad enzimática.

### **3. Conclusiones**

Desde el punto de vista microbiológico los polvos lácteos son considerados relativamente inertes debido a su bajo contenido de agua que previene el crecimiento microbiano. Sin embargo, se han observado cambios en la leche en polvo durante su almacenamiento o cuando es utilizada como ingrediente, donde no solo se producen en reacciones químicas, sino que también son causados por actividades enzimáticas (Celestino et al., 1997a, Chen et al., 2003). La obtención de un polvo lácteo con recuentos microbianos bajos puede significar simplemente que las bacterias en el polvo no son viables, pero no significa necesariamente que las enzimas producidas por las mismas en etapas previas hayan sido desnaturalizadas, y por lo tanto mantenerse activas.

Asímismo, la presencia de microorganismos viables no significa que la actividad enzimática del polvo comprometa su funcionalidad. Esto plantea la cuestión de qué incidencia relativa tienen los niveles de actividad enzimática y el número de microorganismos en la calidad de los polvos lácteos. Los resultados de este trabajo reflejan que la capacidad enzimática y su variación frente a distintos factores como la temperatura, es aislamiento dependiente. Es clara la capacidad de los aislamientos estudiados de producir amilasas, lipasas y proteasas, éstas últimas dos potencialmente capaces de comprometer las características funcionales y organolépticas del producto, pero debería determinarse si estas enzimas son capaces de soportar los tratamientos térmicos aplicados en la línea de producción.

## **CAPITULO 4**

### **Determinación de las propiedades de adhesión “in vitro”**

#### **Objetivos específicos**

- Determinar las propiedades de adhesión “*in vitro*” a superficies inertes de aislamientos pertenecientes a los distintos genotipos.
- Evaluar mediante microscopía de contraste de fase la evolución de la formación del biofilm en placas de poliestireno.

## 1. Materiales y métodos

Para cada aislamiento se evaluó la capacidad de adhesión en placas de poliestireno. Precultivos en fase exponencial ajustados a una  $DO_{540nm}$  de 0.1 se utilizaron para inocular al 1%, placas de 96 pocillos con 150  $\mu$ l de medio TSB. Las placas se incubaron a 37°C con agitación en tres dimensiones a 20 rpm (ENDURO™ MiniMix 3D Shaker, Labnet International Inc.). Luego de 24 horas de incubación se determinó la densidad del biofilm formado según la metodología propuesta por Auger et al. (2006), utilizando triplicados por cada aislamiento. Los pocillos se lavaron dos veces con buffer fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) y las células adheridas se tiñeron con 50  $\mu$ l una solución 1% de cristal violeta a temperatura ambiente, en agitación a 20 rpm, por 20 minutos. Luego los pocillos se lavaron tres veces con PBS y el colorante se solubilizó con 180  $\mu$ l de etanol absoluto. La absorbancia a 490 nm del colorante solubilizado se tomó como medida indirecta de la cantidad de células capaces de adherirse a la superficie. 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 *Absorbancia del biofilm/Absorbancia del control* (Li et al., 2007). Para determinar el número de células viables adheridas a la superficie (células sésiles), se desprendió manualmente el biofilm de las paredes del pocillo con un tip estéril, se resuspendió en 100  $\mu$ l de TSB y por diluciones seriadas se determinó el número de UFC por recuento bacteriano en placas de PCA. El análisis de la información para las variables de respuesta (adhesión y número de células

viables) se realizó mediante un diseño completamente al azar, utilizando el paquete estadístico SAS (*Statistical Analysis System*, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2003). Paralelamente, se sembraron placas de seis pocillos realizando el mismo procedimiento descrito previamente, posteriormente a la incubación se lavaron los pocillos con PBS y se observaron en microscopio (Olympus CX41) de contraste de fase 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.).

## **2. Resultados y discusión**

La adhesión de los microorganismos en las superficies sólidas y la formación de biofilms son características típicas de los microorganismos estudiados. Se pueden distinguir dos fases en el proceso de adhesión: una reversible y otra irreversible. La primera fase es más rápida e involucra principalmente mecanismos fisicoquímicos y es reversible, es decir, que las células pueden pasar nuevamente del biofilm al ambiente. Esta etapa es a la que están dirigidas todas las estrategias de prevención y remoción del biofilm por lo que la adhesión reversible de bacterias es de especial interés. Se ha demostrado previamente que *B. licheniformis* muestra una marcada capacidad para adherirse en forma reversible (Rodionova et al., 2003). Siendo uno de los principales contaminantes de polvos lácteos, su capacidad de adhesión es muy importante cuando se evalúa su papel como colonizador de las superficies industriales. En la Figura 1 se observa el biofilm formado en la superficie del

medio de cultivo líquido en cultivos puros de aislamientos de *B. licheniformis* con 24 horas de incubación.



**Figura 1.** Formación de biofilm en la interfase líquido-aire de cultivos de *B. licheniformis* crecidos durante 24 horas a 37°C.

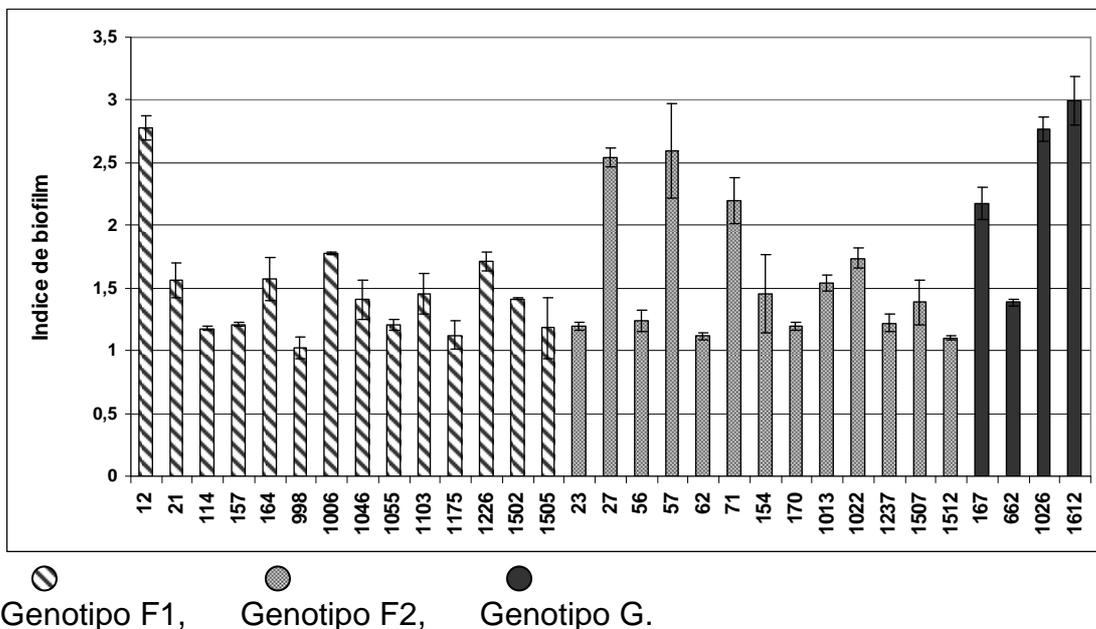
Los ensayos de cuantificación de biofilm mediante tinción con cristal violeta son muy usados como forma indirecta de medir la capacidad de adhesión por su simplicidad y sensibilidad. Para cada aislamiento se evaluó su capacidad de formar biofilm de acuerdo a la técnica descrita por Auger et al. (2006). Los resultados se expresan como índice de biofilm previamente descrito.

**Tabla 1.** Capacidad de adhesión de los distintos genotipos

	<b>Índice de biofilm</b> <b>(<math>\mu \pm d.s.</math>)</b>
<b>Genotipo F1</b>	1.47 $\pm$ 0.14
<b>Genotipo F2</b>	1.58 $\pm$ 0.14
<b>Genotipo G</b>	2.33 $\pm$ 0.26

Al analizar los datos en conjunto, expresando las medias obtenidas para cada genotipo, no se observaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en la capacidad de adhesión entre los genotipos F1 y F2 (Tabla 1). Estas diferencias si son significativas ( $P < 0.05$ ) al comparar estos dos genotipos con el genotipo G, pero se debe tener en cuenta que este comprende solamente a cuatro aislamientos con un comportamiento variable. Es difícil comparar los resultados obtenidos con los trabajos de otros autores ya que las formas de expresar la adhesión no son homogéneas y el soporte sobre el cuál se trabaja difiere. En este trabajo se eligió el índice de biofilm, previamente definido. Li et al. (2007) utilizaron este mismo criterio para evaluar la capacidad de adhesión de varias especies microbianas en placas de poliestireno no oxidadas y oxidadas. Estas últimas son más hidrofílicas y poseen mayor carga negativa en su superficie. La cepa de referencia *B. licheniformis* ATCC 14580 fue incluida en ese trabajo, y se le asignó un valor de índice de biofilm de 1.8, siendo catalogada como una cepa con capacidad de adhesión débil y sin preferencia por el sustrato (Li et al., 2007).

El análisis de los aislamientos dentro de cada genotipo, indicó diferencias altamente significativas ( $P < 0.01$ ) en la adhesión, medida por colorimetría. En la Figura 2 se presenta la comparación de los índices de biofilm de los aislamientos dentro de cada genotipo. La variación de la adhesión en el genotipo F1 fue pequeña exceptuando el alto valor alcanzado por el aislamiento 12. En cambio los genotipos F2 y G presentaron mayor variación en los valores de adhesión.



**Figura 2.** Formación de biofilm en placas de poliestireno a las 24 horas de cultivo. El experimento se realizó por triplicado, se muestra el valor promedio y la desviación estándar para cada aislamiento.

La variación en la capacidad de adhesión de distintas cepas de la misma especie también ha sido reportada en *G. stearotherophilus* (Flint et al., 2001),

uno de los principales colonizadores de las plantas de elaboración de leche en polvo de Nueva Zelanda.

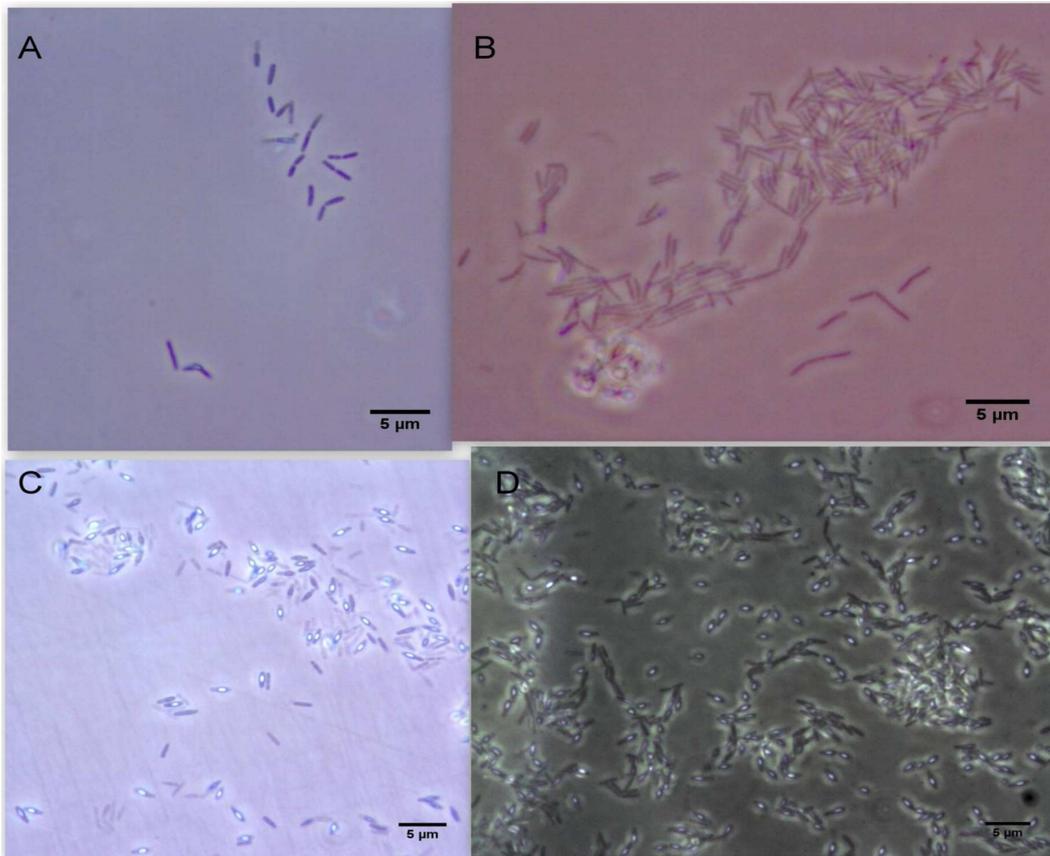
Los valores de índice de biofilm para aislamientos de *B. licheniformis* obtenidos en este trabajo son relativamente bajos, especialmente al ser comparados con los valores informados de otras especies de *Bacillus* en otros trabajos (ej. *Bacillus megaterium* presentó un índice de biofilm de 8.9 y *B. cereus* 2.8, Li et al., 2007). *B. licheniformis* es considerado un microorganismo mesófilo, aunque su capacidad de crecer a temperaturas mayores está ampliamente documentada. Se ha descrito que la adhesión de *B. licheniformis* se ve favorecida bajo condiciones desfavorables para su crecimiento (Rodionova et al., 2003). La temperatura de incubación utilizada para la realización del ensayo de adhesión fue 37°C. Probablemente a temperaturas mayores la adhesión de esta especie sea mayor, coincidiendo con lo reportado por Rodionova et al. (2003), que encontraron dos picos máximos de adhesión para *B. licheniformis* cercanos a 30 y 60°C.

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 factores del medio ambiente (temperatura, pH, tiempo de exposición, presencia de inhibidores y condiciones de flujo de fluidos). Muchos de los factores inciden directamente en la adhesión a nivel de la planta de procesamiento de polvos

lácteos, particularmente los asociados a las superficies y el ambiente. Las características de las superficies de acero inoxidable expuestas al pasaje de leche modifica entre 10 y 100 veces la capacidad de adhesión de esporas y células vegetativas de *G. stearothermophilus* (Flint et al., 2001). Por lo tanto, la información obtenida en el presente trabajo debería complementarse con el estudio de la adhesión a temperaturas mayores (45-75°C) y a superficies “acondicionadas”, simulando las condiciones empleadas en la industria.

El número de células bacterianas presentes en el biofilm mostró variaciones entre los aislamientos oscilando entre  $2 \times 10^3$  y  $2.3 \times 10^6$  UFC por pocillo. La correlación entre el número de células y el índice de biofilm fue buena ( $r^2=0.69$ ).

Mediante el uso de microscopía de contraste de fase se pudo observar las disposiciones de las bacterias en el biofilm y su evolución con el tiempo. La Figura 3 muestra la generación del biofilm en diferentes tiempos de cultivo. El grado de adhesión a las 24 horas de inoculación difirió entre aislamientos (Fig. 2 A y B), y a las 48 y 72 horas de incubación comenzaron a visualizarse esporas (Fig. 2 C y D). También se aprecia claramente el EPS producido por las bacterias como una zona más clara circundante a la célula y se hace más evidente en los agrupamientos bacterianos.



**Figura 3.** Microscopía de contraste de fase (100x) de aislamientos de *B. licheniformis* con distintas horas de crecimiento a 37°C: A) Aislamiento 164, 24 horas B) Aislamiento 71, 24 horas C) Aislamiento 164, 48 horas D) Aislamiento 164, 72 horas.

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 latencia. 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 presencia simultánea de la formación de

biofilm y la esporulación se ha informado para otros *Bacillus* contaminantes de polvos lácteos (Flint et al., 2001, Burgess et al., 2009).

*B. licheniformis* como otras bacterias, es capaz de adherirse en forma reversible a las superficies generando un descenso temporario en las células en suspensión (Rodionova et al., 2003). La adhesión reversible es mínima en condiciones de crecimiento favorable, pero aumenta cuando las células se ven bajo condiciones de pH, temperatura, salinidad, o concentración de iones  $Ca^{2+}$  no óptimos (Rodionova et al., 2003). Esta capacidad de adherirse reversiblemente puede brindarle protección a la bacteria frente agentes oxidantes (Rodionova y Nikolaev, 2004) y constituye un mecanismo de adaptación importante para la supervivencia de la población. La presencia de biofilms microbianos en superficies de la industria alimentaria representa un riesgo tanto desde el punto de vista sanitario como tecnológico. El contacto directo con materias primas o con los productos alimentarios puede causar contaminación cruzada o secundaria llevando a que el producto sea de riesgo desde el punto de vista sanitario. También la contaminación bacteriana y/o sus metabolitos, puede provocar el deterioro del producto y en consecuencia, una disminución de la calidad del mismo. Varios estudios han reportado variación en la producción de compuestos extracelulares por aislamientos de *B. licheniformis* comparando células planctónicas con células sésiles (Yan et al., 2003, Teh et al., 2012).

### 3. Conclusiones

Se constató la capacidad de adhesión de los aislamientos de *B. licheniformis* analizados en este trabajo. Si bien los valores de adhesión no parecen ser importantes, las imágenes confirman la formación de un biofilm que ofrece protección al microorganismo. Se ha informado que factores como el pH de la leche, la temperatura o la presencia de otras especies microbianas en el biofilm afectan la adhesión y el comportamiento de *B. licheniformis* (Dat et al., 2012, Teh et al., 2012). Ensayos complementarios deberían dirigirse a estudiar el comportamiento de estas bacterias en el biofilm formado en la industria láctea, específicamente en la línea de producción de polvos lácteos. El efecto de la temperatura y las relaciones con otras especies contaminantes (ej. *A. flavithermus*) son de gran interés a los efectos de establecer estrategias que apunten a prevenir la formación de incrustaciones o “*biofouling*” en los equipos. La rápida formación de biofilm por microorganismos termófilos en superficies de acero inoxidable nuevas y limpias (Parkar et al., 2003) implica que, aunque la limpieza de la superficie de contacto con alimentos es importante, esto no puede controlar la colonización bacteriana ni prevenir su adhesión.

## **CAPITULO 5**

### **Diseño de cebadores específicos y su utilización en PCR cuantitativa**

#### **Objetivos específicos**

- Diseñar cebadores específicos que permitan discriminar la presencia de *B. licheniformis* en el total de la población.
- Contribuir al desarrollo de un método de cuantificación basado en PCR cuantitativa.

## 1. Materiales y métodos

### 1.1 Diseño de cebadores específicos que permitan discriminar los genotipos de *B. licheniformis* en el total de la población

Veinte secuencias del gen 16S ARNr y 18 del gen *spoOA* pertenecientes a los aislamientos estudiados y cepas de referencia de *B. licheniformis*, así como de otros microorganismos esporulados presentes en los polvos lácteos, se alinearon utilizando el programa MEGA4 (Tamura et al., 2007). En base a este alineamiento se seleccionó para cada gen una zona conservada y específica de la especie *B. licheniformis*. Se utilizó la aplicación Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) para el diseño de cebadores utilizando como secuencias blanco las seleccionadas anteriormente (ver Anexo 2). Los oligos fueron sintetizados en la empresa IDT (Integrated DNA Technologies, EEUU) (Tabla 1). Para evaluar la especificidad de los cebadores se utilizó como molde ADN de los aislamientos de *B. licheniformis* 1055, UY1026, y 56, representantes de los tres genotipos, así como de otros microorganismos contaminantes de polvos lácteos, *A. flavithermus* 1270, *A. flavithermus* UY1409, *G. stearothermophilus* 7, *G. stearothermophilus* 11 y *B. subtilis* UY1067, pertenecientes a la colección de la UTA (Reginensi et al., 2011). La especificidad de los cebadores se evaluó primariamente por PCR tradicional aplicando la siguiente mezcla de reacción (25 µl): 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 y 10 ng

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., 54°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 se resolvieron en geles de agarosa al 1% utilizando buffer TBE y 10 V/cm para la corrida. Los geles se tiñeron con GoodView (3% v/v) y se visualizaron en un transiluminador UV. Las parejas de cebadores específicos para los aislamientos de *B. licheniformis* fueron seleccionados para los ensayos de cuantificación mediante PCR cuantitativa.

## **1.2 Aproximación al uso de los cebadores diseñados en el desarrollo de un método de cuantificación basado en PCR cuantitativa**

Los cebadores BLICH1 F (5'-TGACATGGAGAAAYTTAGT-3'), BLICH1 R (5'-TGGATGATGGTCGTGAT-3'), y SPOA1F (5'-GTTTTTCTTCGGCGATTTCAG-3'), SPOA1R (5'-GACATATCCGCCAGGTCAG-3') fueron seleccionados para el ensayo de cuantificación. Se ensayaron diferentes concentraciones de cada cebador (400 nM y 600 nM) y de MgCl<sub>2</sub> (2 mM, 3 mM y 4 mM). Para evaluar la especificidad de los cebadores se utilizó como molde 10 ng de ADN de los aislamientos de *B. licheniformis* 1055, UY1026, UY62 y 56, *A. flavithermus* 1270, *A. flavithermus* UY1409, *G. stearothermophilus* 7, *G. stearothermophilus* 11 y *B. subtilis* UY1067. Las reacciones de PCR cuantitativa se realizaron utilizando 6 µl de Syber-Master Mix 2X (Bioron International, Alemania), 600 nM de cada cebador, y 3 µl de ADN molde en un volumen de reacción de 12 µl.

Las muestras se analizaron por triplicado en un termociclador LineGeneK FQD-48A (BIOER Technology, China) y el software LineGeneK Fluorescent Quantitative Detection System (BIOER Technology, China) asociado. Las condiciones de amplificación fueron 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de 95°C por 5 segundos, 57°C por 5 seg. y 68°C por 20 seg. Al finalizar cada reacción se analizó la correspondiente curva de disociación para asegurar que el amplicón fuese el correcto y descartar contaminaciones o la formación de dímeros de cebadores. Para la cuantificación absoluta se preparó una curva estándar a partir de diluciones seriadas de ADN genómico de un cultivo de *B. licheniformis* 56 con densidad celular conocida ( $3.1 \times 10^7$  UFC/ml), determinada por recuento en placa en PCA. Un mililitro del cultivo bacteriano fue utilizado para la extracción de ADN genómico utilizando un Kit comercial de ADN genómico (Fermentas International Inc., USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN se resuspendió en buffer Tris-EDTA (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) y se cuantificó con un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific Incorporation, Wilmington, DE, USA). Las extracciones y las determinaciones por PCR cuantitativa se realizaron por triplicado con las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Se calcularon los valores de Ct promedio y el desvío estándar asociado. Se construyó una gráfica incluyendo estos valores en las abscisas, y en las ordenadas se incluyó el logaritmo de la densidad celular. De ese modo se obtuvo la pendiente de la curva por regresión lineal, y se utilizó para los cálculos de eficiencia con la siguiente ecuación:  $E = [10^{(-1/\text{pendiente})}] - 1$  (Klein, 2002).

## 2. Resultados y discusión

### 2.1 Diseño de cebadores específicos para *B. licheniformis*

Los genes 16S ARNr y *spoOA* se eligieron como molde para el diseño de cebadores específicos para la especie *B. licheniformis*. El gen que codifica para el 16S ARNr se ha usado previamente para la cuantificación simultánea de *B. licheniformis* y *A. flavithermus*, y se sabe que al menos ocho copias del mismo están presentes en el genoma de ambos microorganismos (Rüeckert et al., 2005a). Por otra parte el gen *spoOA* codifica para la proteína SpoOA. Esta proteína regula el comienzo de la esporulación controlando la expresión del gen *abrB*, cuyo producto actúa como represor de genes necesarios para la esporulación como *spoOE*, *spoOH* y *spoVG* (Strauch et al., 1990). El gen *spoOA* está presente exclusivamente en las bacterias que forman endosporas, tales como *Bacillus* sp. y *Clostridium* sp., como una secuencia única con una sola copia en el genoma (Brown et al., 1994).

Mediante el alineamiento de secuencias de los genes 16S ARNr y *spoOA*, propias y tomadas de las bases de datos, se seleccionó para cada gen una zona conservada y específica de la especie *B. licheniformis*. Tomando como molde dicha región, se diseñaron cebadores capaces de discriminar aislamientos de *B. licheniformis* del total de la población esporulada (ver Anexo 2). Dos pares de cebadores fueron diseñados con el gen 16S ARNr como

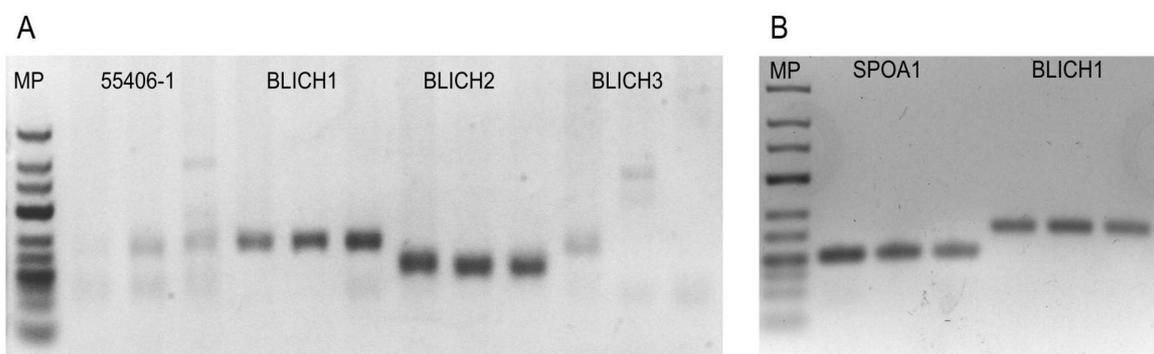
secuencia blanco (BLICH2 y BLICH3) y un tercero, previamente descrito como específico para *B. licheniformis* (55406-1), se tomó de la literatura (Providenti et al., 2009). Mientras que para el fragmento seleccionado del gen *spoA* se diseñaron dos pares de cebadores (BLICH1 y SPOA1) (Tabla 1).

**Tabla 1.-** Características de los cebadores diseñados para el ensayo de cuantificación mediante real time PCR.

Gen blanco	Cebador	Secuencia (5' → 3')	Tamaño del amplicón (pb)	Tm (°C)	Referencia
<i>spoA</i>	BLICH1F	TGACATGGAGAAYTTAGT	153	56.75	Este trabajo
	BLICH1R	ATCACGACCATCATCCA		56.81	
	SPOA1F	CTGAATCGCCGAAGAAAAAC	104	59.82	Este trabajo
	SPOA1R	GACATATCCGCCAGGTCAG		59.05	
16S rDNA	BLICH2F	CTCCCCTTCGGGGGCGAGAGT	94	59.61	Este trabajo
	BLICH2R	CGCAACGAGCGCAACCCTTG		59.78	
	BLICH3F	GCGGCGTGCCTAATACATGC	60	59.70	Este trabajo
	BLICH3R	GAGCTTGCTCCCTTAGGTCAG		58.42	
	55406-1-1F	CGGCAAACCCTCCAACGCAT	138	68.07	Providenti et al. (2009)
	55406-1-1R	TTTCGCTTCCCGCACAGCCT		68.08	

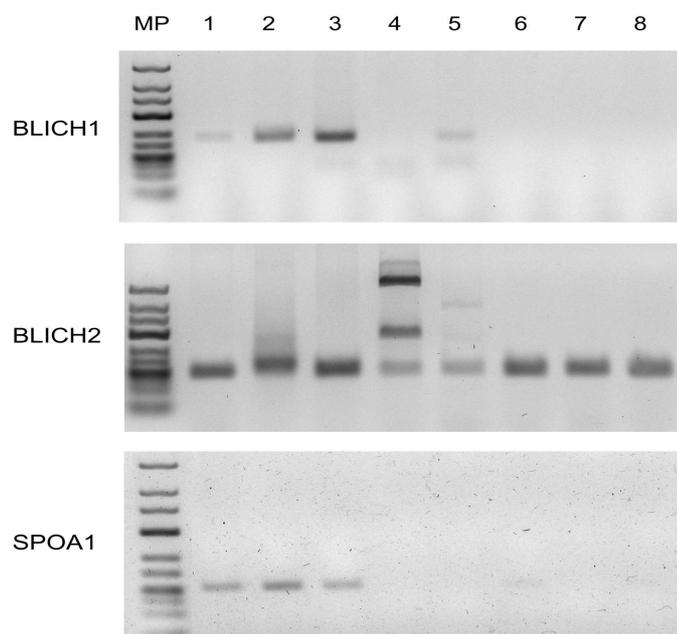
## 2.2 Evaluación de la especificidad de los cebadores diseñados

Para confirmar si los cebadores estuvieron correctamente diseñados, y si generaron amplicones del tamaño esperado, se realizó una amplificación con cada uno de ellos, utilizando como molde ADN genómico de tres aislamientos de *B. licheniformis* correspondientes a los tres perfiles génicos. Los cebadores BLICH1, BLICH2 y SPOA fueron capaces de amplificar a partir de los tres ADN molde ensayados, resultando en amplicones del tamaño esperado, 153, 94 y 104 pb, respectivamente (Fig. 1). Los cebadores 55406-1 y BLICH3 se eliminaron del ensayo ya que no mostraron productos de amplificación del tamaño esperado, al utilizar ADN de *B. licheniformis* como molde.



**Figura 1.** Productos de amplificación obtenidos utilizando los cinco pares de cebadores diseñados para *B. licheniformis*. Se utilizó como molde, para cada uno de los cebadores, ADN genómico de los aislamientos 1055(F1), UY1026 (G) y 56 (F2), respectivamente. MP: Marcador de peso molecular (Generuler Low range DNA Ladder, Fermentas, bandas: 700pb, 500pb, 400pb, 300pb, 200pb, 100pb, 75pb, 50pb, 25pb).

Para evaluar la especificidad de los tres cebadores seleccionados se repitió el ensayo agregando como control ADN de aislamientos de *A. flavithermus*, *G. stearothermophilus*, *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*, todos ellos también microorganismos esporulados contaminantes de polvos lácteos (Reginensi et al., 2011 Rüeckert et al., 2004) pertenecientes a la colección del laboratorio (Fig. 2).



**Figura 2.** Ensayo de especificidad de los cebadores BLICH1, BLICH2 y SPOA1. El orden de los amplicones, para los tres geles, corresponde a: MP, marcador de peso molecular (Generuler Low range DNA Ladder, Fermentas, bandas: 700pb, 500pb, 400pb, 300pb, 200pb, 100pb, 75pb, 50pb, 25pb); carriles 1-3, *B. licheniformis* aislamientos 1055, UY1026 y 56, respectivamente; carril 4-5, *A. flavithermus* aislamientos 1270 y UY1409, respectivamente; carriles 6-7, *G. stearothermophilus* aislamientos 7 y 11, respectivamente; y carril 8: *B. subtilis* UY1067.

Los cebadores BLICH1 y SPOA1, diseñados para amplificar un segmento del gen *spoOA*, fueron los únicos que amplificaron específicamente con los aislamientos de *B. licheniformis*, y por lo tanto se seleccionaron para continuar con los ensayos de cuantificación.

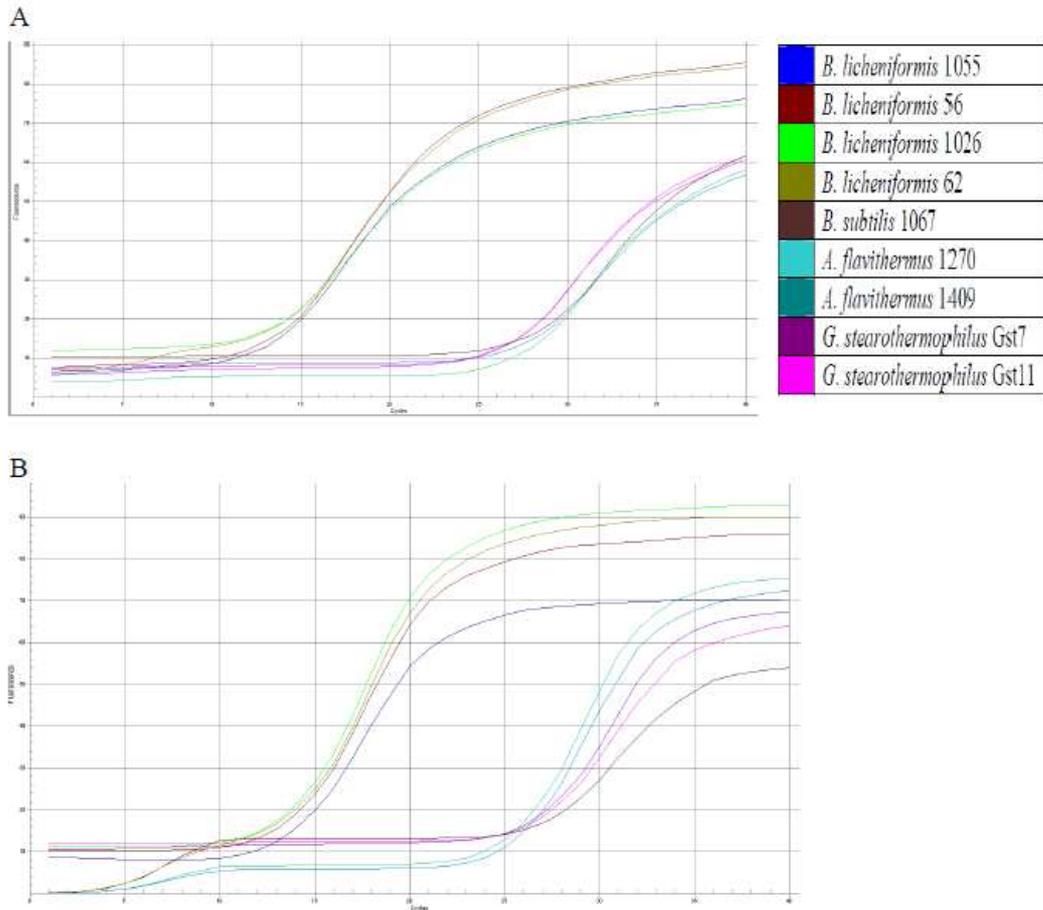
### **2.3 Ensayo de cuantificación con los cebadores BLICH1 y SPOA1**

Utilizando los cebadores BLICH1 y SPOA1, se realizó la puesta a punto del ensayo de cuantificación mediante PCR en tiempo real utilizando SYBER Green como fluoróforo. Para optimizar las condiciones de reacción se probaron diferentes concentraciones de reactivos y los mejores resultados se obtuvieron utilizando 600 nM de cada cebador y 3 mM de MgCl<sub>2</sub>. La concentración de MgCl<sub>2</sub> se varió entre 2 y 4 mM, pero no se observó ningún efecto significativo sobre la eficiencia de amplificación o en la formación de productos no específicos o dímeros de cebadores. La especificidad de los cebadores se ensayó usando las condiciones de reacción definidas y 10 ng de ADN de distintos aislamientos de *B. licheniformis* y otros microorganismos contaminantes de polvos lácteos. En la Tabla 2 se muestran los valores de Ct obtenidos, tanto el par de cebadores BLICH1 como el par SPOA1 mostraron ser específicos para los aislamientos de *B. licheniformis*. Todos los aislamientos de *B. licheniformis* ensayadas amplificaron con valores de Ct entre 14-16, mientras que los otros esporulados presentaron valores de Ct mayores a 26.5 correspondiente a amplificaciones inespecíficas (Fig. 3)

A pesar de que la cantidad de ADN extraído utilizada en el ensayo de especificidad fue alta (10 ng, equivalente a más de  $10^6$  UFC/mL), la amplificación de los aislamientos no pertenecientes a la especie *B. licheniformis* fue inespecífica (Fig. 3).

**Tabla 2.** Valores de Ct en el ensayo de especificidad de los cebadores BLICH1 y SPOA1.

	<b>BLICH1</b>	<b>SPOA1</b>
	<b>Ct (media <math>\pm</math> ds)</b>	<b>Ct (media <math>\pm</math> ds)</b>
<i>B. licheniformis</i> 1055	15.47 $\pm$ 0.13	15.82 $\pm$ 0.19
<i>B. licheniformis</i> 1026	14.78 $\pm$ 0.16	15.70 $\pm$ 0.08
<i>B. licheniformis</i> 56	16.07 $\pm$ 0.06	15.16 $\pm$ 0.17
<i>B. licheniformis</i> 62	15.30 $\pm$ 0.14	15.24 $\pm$ 0.17
<i>B. subtilis</i> UY1067	30.55 $\pm$ 0.01	28.04 $\pm$ 0.12
<i>A. flavithermus</i> 1270	30.15 $\pm$ 0.17	26.69 $\pm$ 0.11
<i>A. flavithermus</i> UY1409	29.31 $\pm$ 0.11	26.58 $\pm$ 0.09
<i>G. stearothermophilus</i> 7	28.67 $\pm$ 0.19	28.50 $\pm$ 0.09
<i>G. stearothermophilus</i> 11	28.68 $\pm$ 0.09	28.72 $\pm$ 0.09



**Figura 3.** Amplificación de aislamientos de *B. licheniformis* y otros microorganismos esporulados contaminantes de polvos lácteos con los cebadores BLICH1 (A) y SPOA1 (B).

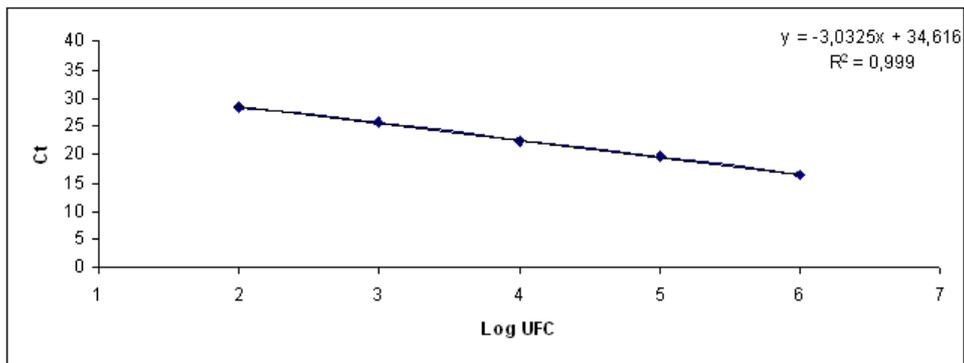
El siguiente paso fue evaluar los límites de detección de BLICH1 y SPOA1, así como determinar la eficiencia del método de cuantificación. Para esto se realizaron curvas estándar construidas a partir de diluciones seriadas de ADN extraído de un cultivo puro de densidad celular conocida ( $3.1 \times 10^7$  UFC/ml) del aislamiento 56 de *B. licheniformis*.

La Tabla 3 muestra los valores de Ct obtenidos de diluciones decimales seriadas de ADN genómico. Las curvas de correlación correspondientes se observan de la Figura 3. Para ambos cebadores (BLICH1 y SPOA1) las curvas estándar presentaron valores buenos de linealidad ( $r^2 = 0.99$  y  $r^2 = 0.99$ , respectivamente), y pendientes de -3.03 y -2.89, respectivamente (Fig. 4). Estos valores son cercanos al óptimo teórico de 3.32 (Higuchi et al., 1993), lo que confirma la aptitud de este ensayo para la cuantificación de *B. licheniformis*. La eficiencia del ensayo, calculada como  $E=10^{(-1/\text{pendiente})}$ , fue de 114% para el cebador BLICH1 ( $y = -3,0325x + 34,616$ ) y de 121% para el cebador SPOA1 ( $y = -2,8922x + 38,626$ ). La correlación entre el log UFC/ml y los valores de Ct fue lineal entre 6.49 log UFC/ml y 2.49 log UFC/ml en ambas curvas, lo que equivale a un rango de  $3.1 \times 10^2$  UFC/ml a  $3.1 \times 10^6$  UFC/ml en un cultivo puro. Si bien con ambos cebadores el límite mínimo de cuantificación fue de  $3.1 \times 10^2$  UFC/ml, el límite mínimo de detección fue de  $3.1 \times 10^1$  UFC/ml para BLICH1, correspondiente a 31 UFC/ml. de *B. licheniformis*, mientras que para SPOA1 el límite mínimo de cuantificación y de detección coincidieron (Tabla 3).

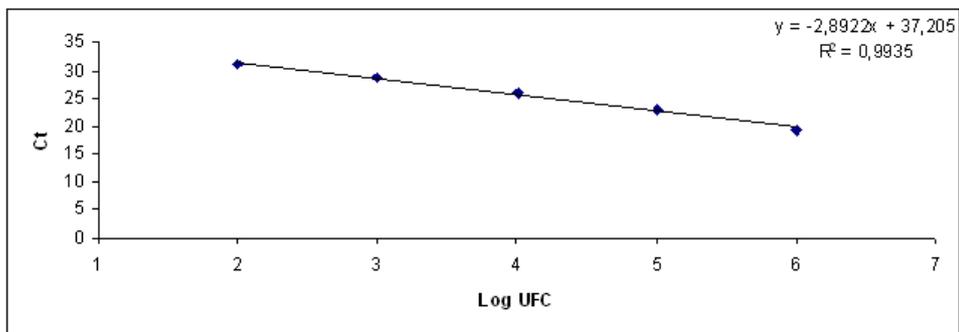
**Tabla 3.** Valores de Ct correspondientes a las curvas estándar resultantes de la amplificación con los cebadores BLICH1 y SPOA1

BLICH1		SPOA1	
UFC/mL	Ct(media±DS)	UFC/mL	Ct(media±DS)
$3.1 \times 10^6$	16.32 ± 0.27	$3.1 \times 10^6$	19.44 ± 0.33
$3.1 \times 10^5$	19.59 ± 0.10	$3.1 \times 10^5$	23.01 ± 0.11
$3.1 \times 10^4$	22.38 ± 0.18	$3.1 \times 10^4$	25.92 ± 0.09
$3.1 \times 10^3$	25.70 ± 0.25	$3.1 \times 10^3$	28.78 ± 0.03
$3.1 \times 10^2$	28.43 ± 0.15	$3.1 \times 10^2$	31.02 ± 0.04
$3.1 \times 10^1$	29.39 ± 0.58	$3.1 \times 10^1$	30.77 ± 0.11

A



B



**Figura 4.** Curvas estándar obtenidas de diluciones seriadas de ADN genómico de cultivos de *B. licheniformis*. A) BLICH1, B) SPOA1.-

El recuento en placa es el método actualmente utilizado en las plantas de producción de polvos lácteos para la evaluación de niveles de contaminantes termodúricos y termofílicos. Los resultados se obtienen 24 o 48 horas después de finalizada la corrida. Esta metodología genera resultados retrospectivos y es por lo que se hace difícil predecir la duración óptima del proceso de producción y aún así asegurar que los niveles de contaminantes están por debajo de los límites especificados. El monitoreo en tiempo real de los microorganismos termodúricos a lo largo de todo el proceso permitirá el procesamiento continuo hasta que se alcancen los límites especificados maximizando los niveles de eficiencia y reduciendo los tiempos y la cantidad de productos químicos de limpieza utilizados.

Varios autores consideran que las técnicas basadas en la PCR cuantitativa brindan resultados en tiempo real que permiten optimizar los tiempos efectivos de trabajo entre dos limpiezas consecutivas. Rüeckert et al. (2005a, 2006) han desarrollado métodos para la detección cuantitativa de las siete especies contaminantes de polvos lácteos predominantes incluyendo *G. stearothermophilus*, *A. flavithermus*, *B. licheniformis* y *B. subtilis*. En el primero de los estudios se describe una técnica capaz de detectar conjuntamente todas las especies contaminantes de polvos lácteos utilizando una sonda Taqman y el gen 16S ARNr como amplicón (Rüeckert et al., 2005a). El segundo presenta un ensayo de PCR cuantitativa basado en la tecnología SYBR Green para la detección conjunta de estos contaminantes con el gen *spoOA* como blanco (Rüeckert et al., 2006). En el caso de los polvos lácteos uruguayos la

cuantificación y seguimiento del aumento de la población de *B. licheniformis* en el producto brinda una clara idea de la calidad. Esta observación se fundamenta la predominancia de la especie en la totalidad de las muestras analizadas por Reginensi et al. (2011), mientras que *A. flavithermus* fue aislado solo en el 40% de las muestras, aunque en cantidades equivalentes a *B. licheniformis*.

En la práctica, la cuantificación de microorganismos esporulados, contaminantes de polvos lácteos, se realiza por recuento en placa, cuyos resultados generalmente se obtienen después de 16 a 48 horas. Debido a estas limitaciones microbiológicas, es una práctica común en la industria terminar el ciclo de procesamiento y comenzar la limpieza CIP “a ciegas”, con la expectativa de que el número de microorganismo esporulados estará por debajo de los límites especificados para el producto. Un método en tiempo real para el seguimiento de nivel de contaminación durante el ciclo de producción permitiría que continúe el procesamiento hasta que los límites de especificación esten a punto de alcanzarse. Esto maximizaría la eficiencia de la planta, y reduciría la cantidad de productos químicos utilizados en la limpieza.

### **3. Conclusiones**

Teniendo en cuenta la especificidad, la sensibilidad y la eficiencia de los cebadores ensayados, el par de cebadores BLICH1 muestra el mayor potencial como herramienta para la cuantificación de cepas de *B. licheniformis*. Cabe

destacar que este ensayo pretendió diseñar los cebadores y evaluar su capacidad para la cuantificación en cultivos puros, debería estudiarse la competencia de esta técnica para la cuantificación de *B. licheniformis* directamente a partir de ADN extraído de leche en polvo. Sin embargo, cuando se utilizan muestras de leche en polvo para la detección por técnicas de PCR, otros dos aspectos deben ser tenidos en cuenta. Se requiere de una técnica de extracción de ADN bacteriano rápida para remover grasas, proteínas y minerales del producto y aún así con este molde mantener los niveles de sensibilidad y robustez necesarios para un análisis cuantitativo. Por otro lado, la contribución de las células no viables sobre la cuantificación también debe tenerse en cuenta. Varias técnicas, como la hibridación con etidio monoazida (EMA) o tratamientos con DNAsa I (Rüeckert et al., 2005b), se han utilizado tratando de minimizar esta interferencia en la cuantificación pero los resultados no ha sido buenos. La hibridación con EMA resultó citotóxica para las células bacterianas, mientras que muestras tratadas con DNAsa I presentaron valores de carga microbiana mayores a los del control positivo. Pese a esto, si se detecta que los niveles de células viables y muertas es bajo esto es un indicador de buena higiene de la planta, mientras que un recuento viable bajo pero niveles altos de células muertas podrían indicar una higiene inadecuada, enmascarada por el efecto de las altas temperaturas del secado por pulverizado final (115 – 120°C).

## Conclusiones finales y perspectivas

Se evaluó la diversidad genotípica y fenotípica intraespecífica del principal contaminante de los polvos lácteos uruguayos, *B. licheniformis*. La metodología de RAPD- PCR permitió dividir esta especie en dos grupos: F y G, siendo el primero ampliamente mayoritario con respecto al segundo. Los aislamientos pertenecientes al genotipo F se subdividió en dos subgrupos (F1 y F2) por la presencia de una banda adicional de 650 pb en el perfil de RAPD obtenido utilizando el cebador OPR13. Esta región codifica para un presunto transportador de membrana del tipo ABC del cuál no se ha encontrado homología a nivel de secuencia de ADN en las bases de datos.

Las características fenotípicas estudiadas indican que estos grupos, definidos por diferencias genotípicas, son muy heterogéneos internamente y muchas de estas características son específicas de cada aislamiento. Esta variabilidad fenotípica de los contaminantes de leche en polvo indica que no todos los aislamientos representan el mismo riesgo para la calidad del producto. La producción de enzimas hidrolíticas es un claro ejemplo, si el principal contaminante de una planta es una cepa con baja capacidad hidrolítica, entonces la calidad del producto no se verá comprometida hasta que los recuentos bacterianos sean altos. Mientras que si trata de una cepa con alta capacidad hidrolítica, la calidad del producto será afectada, incluso con recuentos bacterianos bajos. Es clara la capacidad de los aislamientos de *B.*

*licheniformis* estudiados de producir enzimas hidrolíticas (amilasas, lipasas y proteasas). En especial lipasas y proteasas, potencialmente capaces de comprometer la integridad del producto, particularmente cuando es utilizado como ingrediente. Sin embargo, la actividad enzimática, así como la variación de ésta frente a factores como la temperatura es altamente aislamiento dependiente.

Las diferencias observadas para los distintos aislamientos en la capacidad de producción de EPS y de adhesión también indicaría la presencia de aislamientos que podrían tener ventajas competitivas para su establecimiento en las líneas de producción, y probablemente puedan asociarse a la sucesión de especies presentes en el biofilm. El estudio detallado de la microflora que forma parte del biofilm e incrustaciones en las superficies de la industria brindaría resultados que podrían confirmar estas hipótesis.

Actualmente el método de cuantificación utilizado para detectar contaminantes en polvos lácteos brinda los resultados posteriormente a la elaboración y se basa en el recuento en placa a las 24 a 48 horas de la obtención de la muestra. El desarrollo de una metodología exacta y fiable en tiempo real para la determinación de los niveles de contaminación permitiría continuar el procesamiento hasta niveles cercanos a los límites de especificación, lo que maximizaría la eficiencia de la planta. En el presente trabajo se diseñaron cebadores específicos para *B. licheniformis* y se evaluó su potencial uso como herramienta de cuantificación por PCR cuantitativa. El límite de cuantificación

fue de  $3.1 \times 10^2$  UFC/ml, que se corresponde con los límites de especificaciones para el producto. Sin embargo, estos datos son preliminares ya que se obtuvieron a partir de cultivos puros. La extracción de ADN es el primer paso en el proceso de análisis, probablemente sea el más importante para asegurar la reproducibilidad del análisis y para preservar el significado biológico. Por lo que como paso siguiente correspondería evaluar la aplicabilidad de esta técnica utilizando ADN extraído a partir de polvos lácteos y adecuarla a su potencial uso en las plantas elaboradoras como técnica cuantitativa de rutina.

El impacto de la contaminación por esporas en la industria láctea es importante desde el punto de vista de la calidad de los productos, así como económicamente. En el caso particular de los polvos lácteos uruguayos, *B. licheniformis* es el principal contaminante siendo el genotipo F el mayoritario. Algunas características fenotípicas estudiadas en este trabajo, como la tolerancia a temperaturas de 60-65°C y la capacidad de adhesión, confirman una potencial ventaja adaptativa frente a otros microorganismos. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas que puedan explicar la baja presencia de individuos pertenecientes al genotipo G. Los resultados sugieren que los niveles de diversidad de la población de *B. licheniformis* son mayores fenotípica que genotípicamente, y que cualquier estrategia dirigida a su cuantificación o su control como contaminante debe abarcar al total de la población.

## ANEXO 1

### 1. Pruebas bioquímicas primarias

#### 1.1 Tinción de Gram

La tinción se realiza sobre un frotis de cultivo fresco fijado por calor (flameado 3 veces), según el protocolo siguiente:

- Cubrir el frotis con solución de cristal violeta (1%p/v, en agua destilada) y esperar 1 minuto.
- Enjuagar con agua.
- Cubrir el frotis con lugol (1g de I<sub>2</sub>, 2g de KI, agua destilada csp. 300ml), y esperar entre 1 minuto.
- Enjuagar con agua.
- Decolorar con mezcla 1:2 de acetona y alcohol 95%.
- Enjuagar con agua.
- Cubrir el frotis con el colorante de contraste safranina (0.5%p/v, en agua destilada), y esperar 45 segundos.
- Enjuagar con agua y dejar secar.

Se observa al microscopio óptico con un aumento de 100x con aceite de inmersión.

## **1.2 Prueba de enzima catalasa**

La prueba para detección de la enzima catalasa se realizó en portaobjetos a partir de colonias frescas, según el siguiente protocolo:

- Se coloca en un portaobjetos una gota de solución de peróxido de hidrógeno al 3%.
- Se toma con palillo estéril una pequeña porción de la colonia y se coloca sobre la gota de peróxido de hidrógeno.
- Si la enzima está presente se observa un burbujeo.

## **1.3 Prueba de enzima oxidasa**

La prueba para la detección de la enzima oxidasa se realizó a partir de colonias frescas utilizando el kit comercial BD Taxo™ N Discs For the oxidase test (Cat. 231045), según las especificaciones de fabricante.

## **2. Buffers y soluciones**

### **2.1 5X Tris-borato-EDTA (TBE)**

Tris base: 54 g

Acido bórico: 27.5 g

EDTA 0.5 M: 20 ml

Ajustar pH a 8.0

Agua destilada c.s.p. 1 L

### **2.2 Buffer fosfato salino (*Phosphate buffered saline, PBS*)**

NaCl: 8 g

KCl: 0,2 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1,44 g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0,24 g

Ajustar pH a 7,4

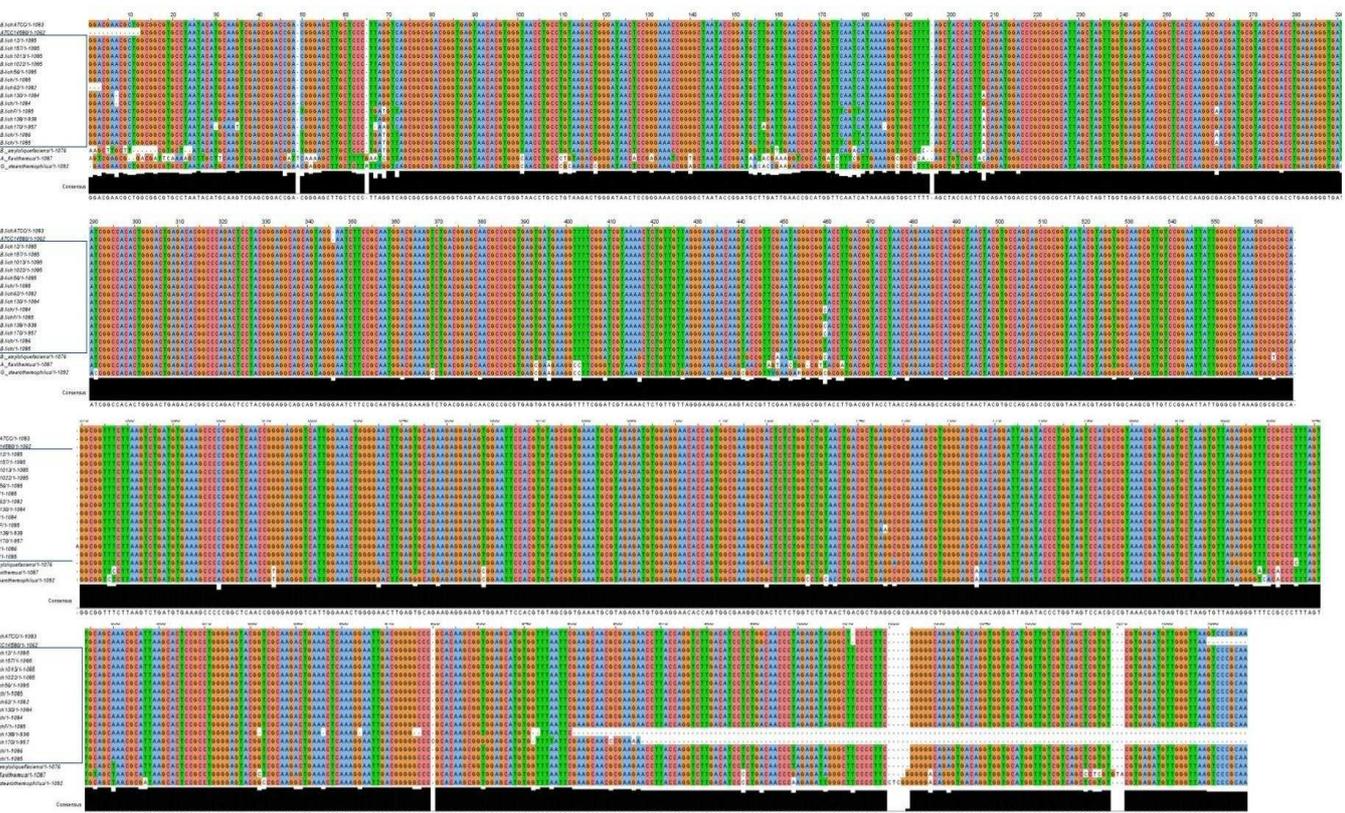
Agua destilada c.s.p. 1L

## ANEXO 2

### 2. Alineamiento de secuencias utilizadas para el diseño de cebadores específicos para el gen 16s ARNr de *B. licheniformis*

1.1 Alineamiento de secuencias de aproximadamente 1000 pb de aislamientos de *B. licheniformis* (secuencias en recuadro), y secuencias obtenidas de las bases de datos (NCBI BLAST database:

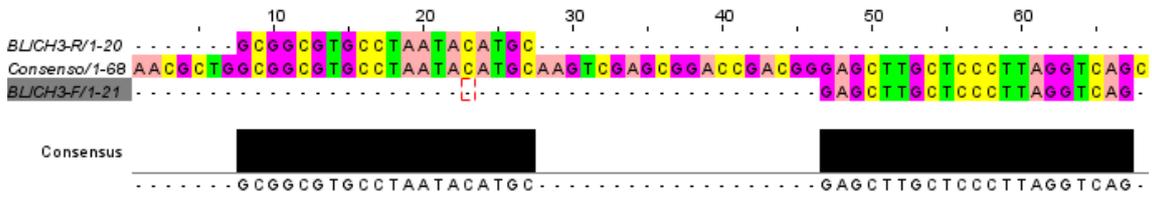
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).



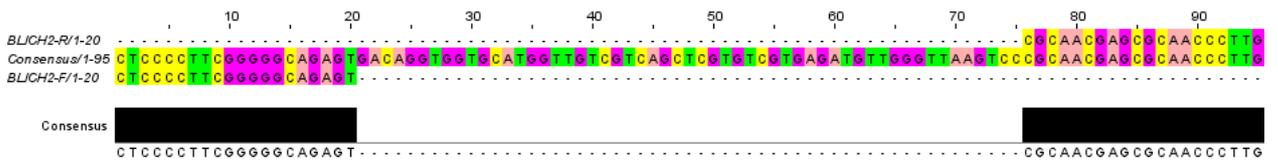


### 1.3 Secuencia consenso de las secciones seleccionadas y sitios de hibridación de los cebadores.

#### BLICH3

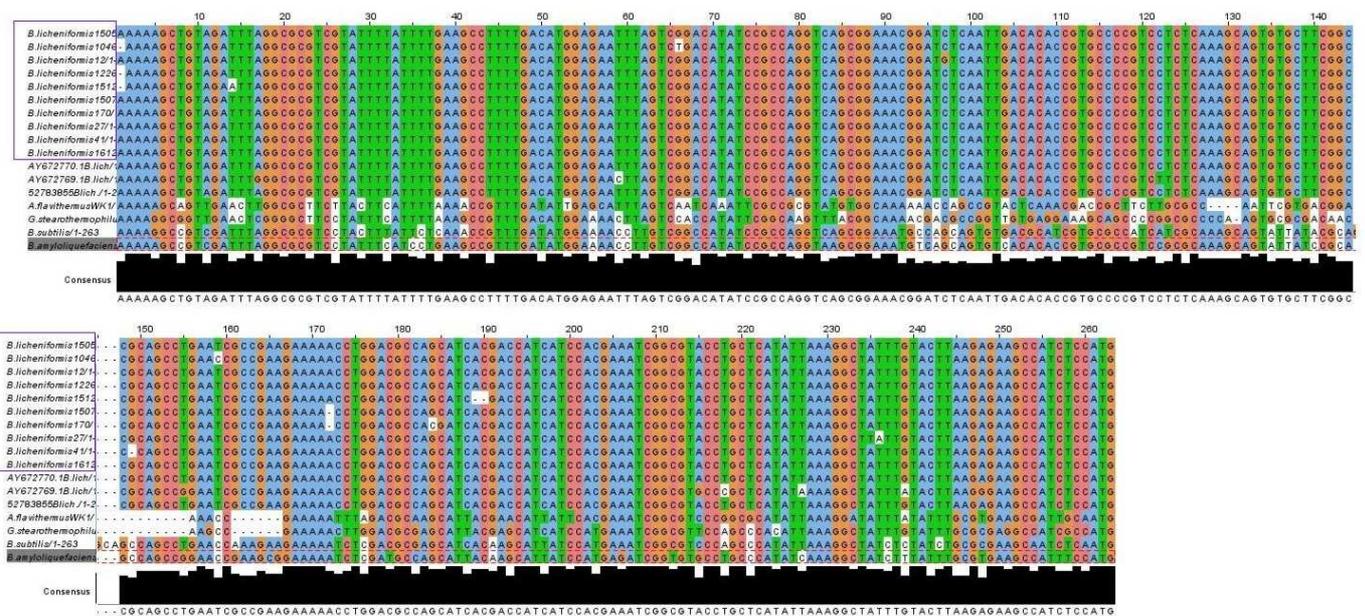


#### BLICH2

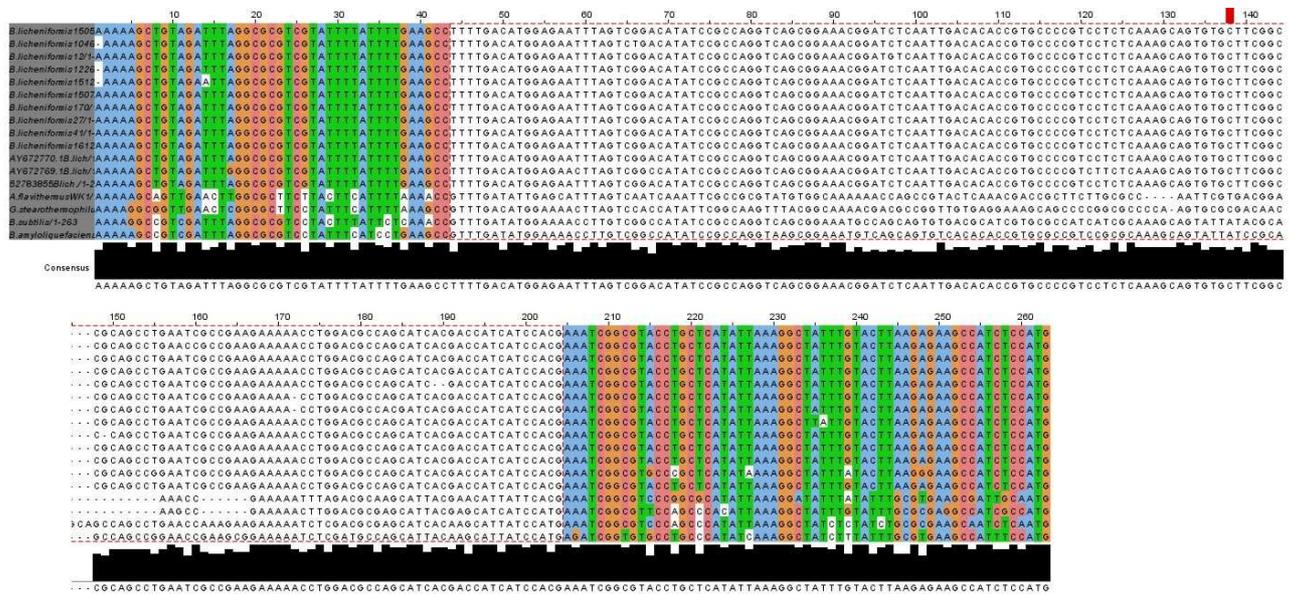


### 3. Alineamiento de secuencias utilizadas para el diseño de cebadores específicos para el gen *spoOA* de *B. licheniformis*

2.1 Alineamiento de secuencias de aproximadamente 260 pb de aislamientos de *B. licheniformis* (secuencias en recuadro), y secuencias obtenidas de las bases de datos (NCBI BLAST *database*: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

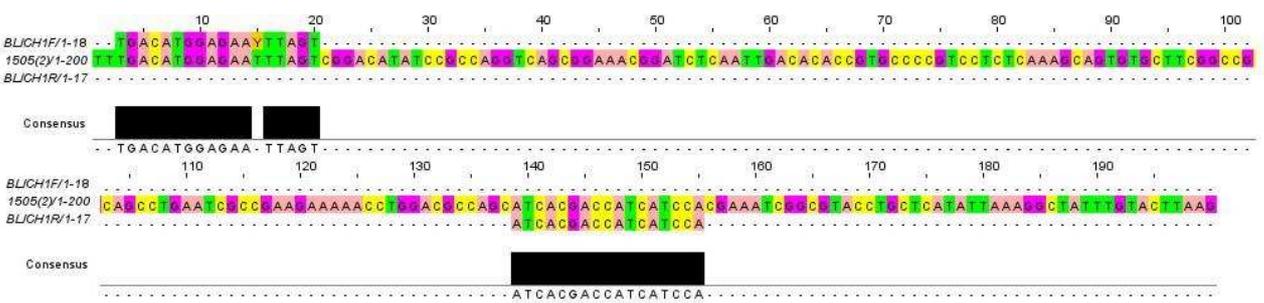


## 2.2 Secuencia seleccionada para el diseño de cebadores específicos (selección en blanco).

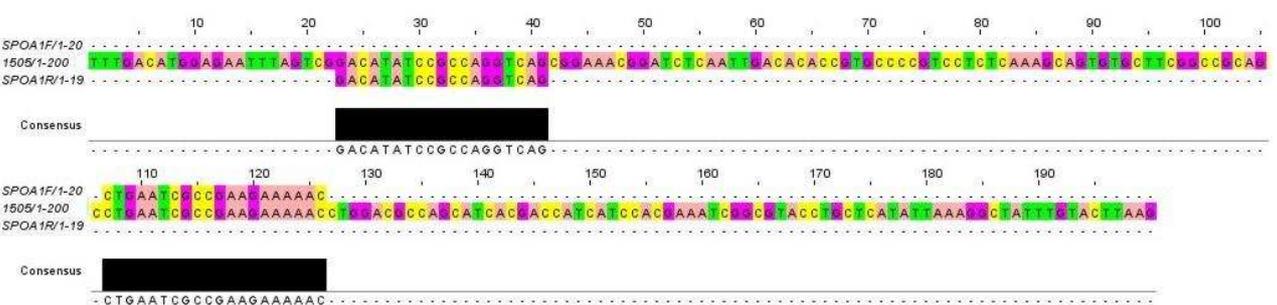


## 2.3 Secuencia consenso de la sección seleccionada y sitios de hibridación de los cebadores.

### BLICH1



### SPOA1



## Referencias bibliográficas

Andrews, B.A., Asenjo, J.A. 1986. Synthesis and regulation of extracellular  $\alpha$  (1–3) glucanase and protease by *Cytophaga* sp. in batch and continuous culture. *Biotechnol Bioeng* 28, 1366–1375.

Al-Shabibi, M. M. A., Langner, E. H., Tobias, J., Tuckey, S. L. 1964. Effect of added fatty acids on the flavor of milk. *Journal of Dairy Science* 47, 295–296.

Arnold, R. G., Shahani, K. M., Dwivedi, B. K. 1975. Application of lipolytic enzymes to flavor development in dairy products. *Journal of Dairy Science* 58, 1127–1143.

Ash, C., Farrow, J.A.E., Wallbanks, S., Collins, M.D., 1991. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Letters in Applied Microbiology* 13, 202–206.

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

Banyko, J., Vyleťlová, M. 2009. Determining the source of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* isolated from raw milk, pasteurized milk and yoghurt. *Letters in Applied Microbiology* 48, 318-323.

Beattie, S.H., Williams, A.G., 1999. Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. with an improved cytotoxicity assay. *Letters in Applied Microbiology* 28, 221–225.

Bellow, F.M., Yagoub, S.O., El Zubeir, I.E.M., 2007. Effects of temperature and days of storage on the survival and spoilage rate of *Bacillus subtilis* and *B. cereus* in sterilized milk. *Research Journal of Microbiology* 2, 619-624.

Bienvenue, A., Piteski, M., Jimenez-Flores, R., 1999. Direct PCR assay for the detection and monitoring of thermal resistance of Bacilli in California milk powder. Third International Symposium on Recombined Milk and Milk Products. Proceedings of the IDF Symposium. Penang, Malaysia, p. 180.

Bozic, N., Ruiz, J., Lopez-Santin, J., Vujcic, Z. 2011. Production and properties of the highly efficient raw starch digesting  $\alpha$ -amylase from a *Bacillus licheniformis* ATCC 9945. *Biochemical Engineering Journal* 53, 203–209.

Brown, D.P., Ganova-Raeva, L., Green, B.D., Wilkinson, S.R., Young, M., Youngman, P. 1994. Characterization of *spo0A* homologues in diverse *Bacillus* and *Clostridium* species identifies a probable DNA-binding domain. *Molecular Microbiology* 14, 411–426.

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

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

Celestino, E. L., Iyer, M., Roginski, H. 1997a. The effects of refrigerated storage of raw milk on the quality of whole milk powder stored for different periods. *International Dairy Journal* 7, 119-127.

Celestino, E. L., Iyer, M., Roginski, H. 1997 b. 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, 129-140.

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, 255-275.

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, 495–504.

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

Crielly, E.M., Logan, N.A. , Anderton, A. 1994. Studies on the *Bacillus* flora of milk and milk products. *Journal of Applied Bacteriology* 77, 256-263.

Dat, N. M., Hamanaka, D., Tanaka, F., Uchino, T. 2012. Control of milk pH reduces biofilm formation of *Bacillus licheniformis* and *Lactobacillus paracasei* on stainless steel. *Food Control* 23, 215-220.

De Clerck, E., De Vos, P. 2004. Genotypic diversity among *Bacillus licheniformis* strains from various sources. *FEMS Microbiology Letters* 23, 91-98.

De Jonghe, V., Coorevits, A., Vandroemme, J., Heyrman, J., Herman, L., De Vos, P., Heyndrickx, M. 2008. Intraspecific genotypic diversity of *Bacillus* species from raw milk. *International Dairy Journal* 18, 496-505.

De Jonghe, V., Coorevits, A., De Block, J., Van Coillie, E., Grijspeerd, K., Herman, L., De Vos, P., Heyndrickx, M. 2010. Toxinogenic and spoilage potential of aerobic sporeformers isolated from raw milk. *International Journal of Food Microbiology* 136, 318–325.

Dhakal, R., Chauhan, K., Seale, R. B., Deeth, H. C., Pillidge, C. J., Powell, I. B., Craven, H., 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, 344-351

DIEA-MGAP. 2012. Anuario Estadístico Agropecuario 2012 [En línea]. Montevideo: MGAP. Consultado 13 marzo 2013. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/Dieaanterior/Anuario2012/DIEA-Anuario-2012web.pdf>

Divakaran, D., Chandran, A., Pratap Chandran, R. 2011. Comparative study on production of  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus licheniformis* strains. *Brazilian Journal of Microbiology* 42, 1397-1404.

Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C., Schorr-Galindo, S. 2012. Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers* 87, 951-962.

Fakhfakh, N. F. N., Kanoun, S. K. S., Manni, L. M. L., Nasri, M. N. M. 2009. Production and biochemical and molecular characterization of a keratinolytic serine protease from chicken feather-degrading *Bacillus licheniformis* RPK. *Canadian Journal of Microbiology* 55, 427-436.

Flint, S.H., Bremer, P.J., Brooks, J.D. 1996. Biofilms in dairy manufacturing plant—description, current concerns and methods. *Biofouling* 11, 81–97.

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

Fritze, D. 2004. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. *Phytopathology* 94, 1245–1248.

Gandhi, H.P., Ray, R. M., Pate, R. M. 1997. Exopolymer production by *Bacillus* species. *Carbohydrate Polymers* 34, 325-327.

Gummadi, S., Kumar, K. 2005. Production of extracellular water insoluble b-1,3-glucan (curdlan) from *Bacillus* sp. SNC07. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 10, 546–551.

Han, Y.W., 1989. Levan production by *Bacillus polymyxa*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 4, 447–451.

He, L., Chen, W., Liu, Y. 2006. Production and partial characterization of bacteriocin-like peptides by *Bacillus licheniformis* ZJU12. *Microbiological Research* 161, 321-326.

Hinton, A. R. 2003. Thermophiles and fouling deposits in milk powder plants. PhD Tesis, Massey University, Nueva Zelanda. Recuperado el 6 de noviembre de 2012 de: [http://mro.massey.ac.nz/bitstream/handle/10179/1861/02\\_whole.pdf?sequence=1](http://mro.massey.ac.nz/bitstream/handle/10179/1861/02_whole.pdf?sequence=1)

Hood, S.K., Zottola, E.A. 1997. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *International Journal of Food Microbiology* 37, 145-153.

Ishihara, H., Takoh, M., Nishibayashi, R., Sato, A. 2002. Distribution and variation of bacitracin synthetase gene sequences in laboratory stock strains of *Bacillus licheniformis*. *Current Microbiology* 45, 18-23.

Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., van Heuvel, M., Misset, O. 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews* 15, 29–63.

Janstova B. y J. Lukasova. 2001. Heat resistance of *Bacillus* spp. spores isolated from cow milk and farm environment. *Acta Veterinaria BRNO* 70, 179-184.

Janstova B., Vorlova L., Drackova M. 2006. The effect of lipolytic enzymes of *Bacillus* spp. on quality of ultra-high-temperature-treated milk. *Acta Veterinaria BRNO* 75, 427-435.

Joshi, S., Yadav, S., Desai, A. J. 2008. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum medium components for the enhanced production of lichenysin by *Bacillus licheniformis* R2. *Biochemical Engineering Journal* 41, 122-127.

Khyami-Horani, H. 1996. Thermotolerant strain of *Bacillus licheniformis* producing lipase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 12, 399-401.

Kim, S. Y., Shin, S. J., Song, C. H., Jo, E. K, Kim, H. J.,. Park, J. K. 2009. Destruction of *Bacillus licheniformis* spores by microwave irradiation *Journal of Applied Microbiology* 106, 877–885.

Klein, D. 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine* 8, 257-260.

Kudan, S., Pichyangkura, R. 2009. Purification and characterization of thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* SK-1. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 157, 23–35.

Kwee, W. S., Dommet, T. W., Giles, J. E., Roberts, R., Smith, R.A.D. 1986. Microbiological parameters during powdered milk manufacture: I. Variation between processes and stages. *The Australian Journal of Dairy Technology*, March, 3-6

Larpin, S., Sauvageot, N., Pichereau, V., Laplace, J.M., Auffray, Y. 2002. Biosynthesis of exopolysaccharide by a *Bacillus licheniformis* strain isolated from ropy cider. *International Journal of Food Microbiology* 77, 1 – 9.

Lee, I.Y., W.T. Seo, G.J. Kim, M.K. Kim, S.G. Ahn, G.S. Kwon y Y.H. Park. 1997. Optimization of fermentation conditions for production of exopolysaccharide by *Bacillus polymyxa*. *Bioprocess Engineering* 16, 71–75.

Lee, S., Oneda, H., Minoda, M., Tanaka, A., Inouye, K. 2006a. Comparison of starch hydrolysis activity and thermal stability of two *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylases and insights into engineering  $\alpha$ -amylase variants active under acidic conditions. *Journal of Biochemistry* 139, 997–1005.

Lee, P.L., Lee, S., Kim, C.S., Son, J.H., Song, J.H., Lee, K. Y., Kim, H. J., Jung, S. J., Moon, B. J. 2006b. Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biological Control* 37, 329–337.

Li, X.Z., Hauer, B., Rosche, B. 2007. Single-species microbial biofilm screening for industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76, 1255–1262.

Lindsay, D., Mosupye, F.M., Brozel, V.S., von Holy, A. 2000. Cytotoxicity of alkalinetolerant dairy-associated *Bacillus* spp. Letters in Applied Microbiology 30, 364–369.

Liu, C., Lu, J., Lu, L., Liu, Y., Wang, F., Xiao, M. 2010. Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1. Bioresource Technology 101, 5528-5533.

Madslie, E.H., Olsen, J.S., Granum, P.E., Blatny, J.M. 2012. Genotyping of *B. licheniformis* based on a novel multi-locus sequence typing (MLST) scheme. BMC Microbiology 12, 230

Mansour, M., Amri, D., Bouttefroy, A., Linder, M., Milliere, J.B. 1999. Inhibition of *Bacillus licheniformis* spore growth in milk by nisin, monolaurin, and pH combinations. Journal of Applied Microbiology 86, 311–324.

Meer, R.R., Baker, J., Bodyfelt, F.W., Griffiths, M.W. 1991. Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: A review. Journal of Food Protection 54, 969-979.

Mondal, K. C., Banerjee, R., Pati, B. R. 2000. Tannase production by *Bacillus licheniformis*. Biotechnology Letters 22, 767-769.

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.

Muir, D. D., Griffiths, M. W., Phillips, J. D., Sweetsur, A.W. M., West, I. G. 1986. Effect of the bacterial quality of raw milk on the bacterial quality and some other properties of low-heat and high-heat dried milk. International Journal of Dairy Technology 39, 115–118.

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 Science* 52, 45–50.

Nagorska, K., Ostrowski, A., Hinc, K., Holland, I.B., Obuchowski, M. 2010. Importance of *eps* genes from *Bacillus subtilis* in biofilm formation and swarming. *Journal of Applied Genetics* 51, 369–381.

O'Donnell, A.G., Norris, J.R., Beerkeley, R.C.W., Claus, D., Kaneko, T., Logan, N.A., Nozaki, R. 1980. Characterization of *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, and *Bacillus amyloliquefaciens* by pyrolysis gas-liquid chromatography, deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization, biochemical tests, and API systems. *International Journal of Systematic Bacteriology* 30, 448-459.

OECD/FAO. 2011. Agricultural outlook 2011-2020. Disponible en: <http://www.oecd.org/site/oecd-faoagriculturaloutlook/48186214.pdf> (último acceso 14 de marzo de 2013).

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

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

Parkar, S.G., Flint, S.H., Brooks, J.D. 2004. Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel. *Journal of Applied Microbiology* 96, 110–116.

Petchkongkaew, A., Taillandier, P., Gasaluck, P., Lebrihi, A. 2008. Isolation of *Bacillus* spp. from Thai fermented soybean (Thuanao): screening for aflatoxin B1 and ochratoxin A detoxification. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1495–1502.

Priest, F. G. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriological Reviews* 41, 711–753.

Postollec, F., Bernard, M., Lochardet, A., Sohier, D. 2011. Prevalence and heat resistance of thermophilic spore-forming bacteria contaminating milk powder. International Association of Food Protection Annual Meeting abstracts, poster presentation P1-02 [http://www.foodprotection.org/files/annual\\_meeting/poster-abstracts-2011.pdf](http://www.foodprotection.org/files/annual_meeting/poster-abstracts-2011.pdf)

Rachadech, W., Navacharoen, A., Ruangsit, W., Pongtharangkul, T., Vangnai, A. S. 2010. An organic solvent, detergent, and thermostable alkaline protease from the mesophilic, organic solvent\_tolerant *Bacillus licheniformis* 3C51. *Microbiology* 79, 620–629.

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

Rey, M.W., Ramaiya, P., Nelson, B.A., Brody-Karpin, S.D., Zaretsky, E.J., Tang, M., Lopez de Leon, A., Xiang, H., Gusti, V., Clausen, I.G., Olsen, P.B., Rasmussen, M.D., Andersen, J.T., Jorgensen, P.L., Larsen, T.S., Sorokin, A., Bolotin, A., Lapidus, A., Galleron, N., Ehrlich, S.D., Berka, R.M. 2004. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biology* 5, R77.

Rodionova, T. A., Shekhovtsova, N. V., Panikov, N. S., Nikolaev, Y.A. 2003. Effect of cultivation conditions on growth and adhesion of *Bacillus licheniformis*. Microbiology 72, 466–471 .

Rodionova, T. A., Nikolaev, Y. A. 2004. Reversible adhesion protects the thermophilic bacterium *Bacillus licheniformis* 603 from *N*- ethylmaleimide. Microbiology 73, 113–114.

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

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

Ronimus, R.S., Rückert, A., Morgan, H. W. 2006. Survival of thermophilic spore forming bacteria in a 90 years old milk powder from Ernest Shackelton´s Cape Royds Hut in Antarctica. Journal of Dairy Research 73, 235-243.

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

Rückert, A., Ronimus, R.S., Morgan, H.W. 2005a. Development of a rapid detection and enumeration method for thermophilic bacilli in milk powders. Journal of Microbiological Methods 60, 155–167.

Rückert, A., Ronimus, R. S., Morgan, H. W. 2005b. Rapid differentiation and enumeration of the total, viable vegetative cell and spore content of thermophilic bacilli in milk powders with reference to *Anoxybacillus flavithermus*. Journal of Applied Microbiology 99, 1246-1255.

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

Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406-425.

Sangeetha, R., Geetha, A., Arulpandi, I. 2010. Concomitant production of protease and lipase by *Bacillus licheniformis* VSG1: production, purification and characterization. *Brazilian Journal of Microbiology* 41, 179-185.

Sayem, S. M., Manzo, E., Ciavatta, L., Tramice, A., Cordone, A., Zanfardino, A., De Felice, M., Varcamonti, M. 2011. Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*. *Microbial Cell Factories* 10, 74.

Schallmeyer, M., Singh, A., Ward, O.P. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology* 50, 1–17.

Scheldeman, P., Pil, A., Herman, L., De Vos, P., Heyndrickx, M. 2005. Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farm. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 1480-1494.

Schleifer, K. 2009. Phylum XIII. *Firmicutes* Gibbons and Murray 1978, 5 (*Firmacutes* [sic] Gibbons and Murray 1978, 5) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 3: The Firmicutes, p. 19-1317

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

Scurrah, K.J., Robertson, R.E., Craven, H.M., Pearce, L.E., Szabo, E.A. 2006. Inactivation of *Bacillus* spores in reconstituted skim milk by combined high pressure and heat treatment. *Journal of Applied Microbiology* 101, 172–180.

Setlow, P. 2003. Spore germination. *Current Opinion in Microbiology* 6, 550–556.

Shamsuzzaman, K., Modler, W., McKellar, R. C. 1986. Survival of lipase during manufacture of nonfat dry milk. *Journal of Dairy Science* 70, 746–751.

Singh, R.P., Shukla, M.K., Mishra, A., Kumari, P., Reddy, C.R.K., Jha, B. 2011. Isolation and characterization of exopolysaccharides from seaweed associated bacteria *Bacillus licheniformis*. *Carbohydrate Polymers* 84, 1019–1026.

Sneath, P. H., Sokal, R. R. 1973. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. Freeman, San Francisco.

Song, Y.R., Song, N.E., Kim, J.H., Nho, Y.C., Baik, S.H. 2011. Exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* strains isolated from Kimchi. *Journal of General Applied Microbiology* 57, 169-175.

Stadhouders, J., Hup, G. 1982. Index and indicator organisms in milk powder. *Antonie van Leeuwenhoek* 48, 633–635.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., Costerton, J.W. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology* 56, 187–209.

Strauch, M., Webb, V., Spiegelman, G., Hoch, J. A. 1990. The SpoOA protein of *Bacillus subtilis* is a repressor of the *abrB* gene. Proceedings of the National Academy of Sciences 87, 1801-1805.

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, 279–292.

Sutherland, I.W. 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Microbiology 147, 3–9.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular biology and evolution 24, 1596-1599.

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, 28–34.

Tumpang, N.H.M., Salleh, M.M., Abd-Aziz, S. 2011. Screening of factors influencing exopolymer production by *Bacillus licheniformis* strain T221a using 2-level factorial design. Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications, Angelo Carpi (Ed.), ISBN: 978-953-307-268-5, InTech, Available from 9/11/12: <http://www.intechopen.com/books/progress-in-molecular-and-environmental-bioengineering-from-analysis-and-modeling-to-technology-applications/screening-of-factors-influencing-exopolymer-production-by-bacillus-licheniformis-strain-t221a-using->

Vaerewijck, M. J., De Vos, P., Lebbe, L., Scheldeman, P., Hoste, B., Heynrickx, M. 2001. Occurrence of *Bacillus sporothermodurans* and other aerobic spore-forming species in feed concentrate for dairy cattle. *Journal of Applied Microbiology* 91, 1074-1084.

Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J. O. R., Maurer, K. H., Ehrenreich, P., Bäumer, S., Henne, A., Liesegang, H., Merkl, R., Ehrenreich, A., Gottschalk, G. 2004. The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 7, 204-211.

Vlkova, H., Babak V., Seydlova R., Pavlik I., Schlegelova J. 2008. Biofilms and hygiene on dairy farms and in the dairy industry: sanitation chemical products and their effectiveness on biofilms - a review. *Czech Journal of Food Science* 26, 309–323.

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.

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, 727–733.

Yan, L., Boyd, K. G., Adams, D. R., Burgess, J. G. 2003. Biofilm-specific cross-species induction of antimicrobial compounds in bacilli. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 3719-3727.

Yi, P. J., Pai, C. K., Liu, J. R. 2010. Isolation and characterization of a *Bacillus licheniformis* strain capable of degrading zearalenone. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* DOI 10.1007/s11274-010-0548-7

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

Zhang, X. Q., Bishop, P. L., Kupferle, M. J. 1998. Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. *Water Science and Technology* 37, 345-348.