

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**“CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PROTEOLÍTICA DE  
BACTERIAS PSICRÓTROFAS AISLADAS DE LECHE CRUDA DE TANQUE DE  
LA REGIÓN LITORAL-NORTE DEL URUGUAY”**

**por**

**Alice DA SILVA RODRÍGUEZ  
Lucía GREGORIO FERNÁNDEZ**

TESIS DE GRADO presentada como uno  
de los requisitos para obtener el título de  
Doctor en Ciencias Veterinarias  
Orientación: Higiene, inspección, control y  
tecnología de los alimentos de origen  
animal

MODALIDAD Situación problema

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2023**

**PÁGINA DE APROBACIÓN**

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



---

PhD. Dra. Lucia Grille

Segundo miembro (Tutor):



---

MSc. Dr. Alvaro González Revello

Tercer miembro:



---

MSc. BQ Jimena Viejo

Co- Tutores:



---

MSc. Dra. Mara Olmos Noli

Fecha:

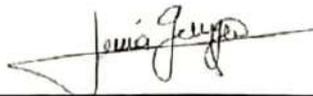
13/12/2023

Autores:



---

Br. Alice da Silva



---

Br. Lucía Gregorio

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, queremos agradecer a nuestras familias y amigos por su apoyo incondicional a lo largo de toda la carrera.

Asimismo, a nuestro tutor Álvaro González y co-tutora Mara Olmos, por orientarnos con gran compromiso y dedicación durante la elaboración de esta tesis de grado.

A la Comisión de Investigación y Desarrollo Científico (CIDEC – Fvet) por la financiación del trabajo.

Por último, agradecemos a todos aquellos que bajo diferentes modalidades nos apoyaron y proveyeron de diferentes materiales y herramientas que fueron claves para el desarrollo de nuestra tesis de grado.

## TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN .....	2
AGRADECIMIENTOS .....	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	6
RESUMEN.....	8
SUMMARY .....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
Calidad microbiológica de la leche bovina .....	10
Grupos microbianos y fuentes de contaminación para la leche .....	10
Recuento de mesófilos aerobios totales.....	10
Termodúricos .....	10
Bacterias psicrótrofas.....	11
Enzimas proteolíticas .....	12
Antecedentes en Uruguay.....	13
HIPÓTESIS .....	14
OBJETIVOS GENERALES.....	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
MATERIALES Y MÉTODOS .....	15
Análisis previos de los tambos seleccionados .....	15
Aislamientos bacterianos y condiciones de cultivos .....	16
Capacidad proteolítica.....	16
Identificación molecular de los aislamientos .....	16
Detección del gen <i>aprX</i> .....	17
Cuantificación de la actividad enzimática.....	17
Producción y cuantificación de enzimas proteolíticas de los aislamientos .....	18
Coagulación de la leche comercial.....	19
Caracterización de la actividad enzimática .....	20
RESULTADOS .....	21
Capacidad proteolítica cualitativa.....	21
Identificación preliminar de los aislamientos .....	21
Identificación molecular de los aislamientos .....	23
Detección del gen <i>aprX</i> .....	23
Curva de azocaseína .....	28

Cuantificación de la actividad enzimática.....	28
Coagulación de la leche comercial.....	29
Caracterización de la estabilidad enzimática .....	34
DISCUSIÓN.....	36
CONCLUSIONES.....	42
BIBLIOGRAFÍA.....	43
ANEXOS.....	53

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

### TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Recuentos de bacterias psicrótrofas totales y de <i>Pseudomonas</i> spp. por productor y estación del año (UFC/ml). .....	15
<b>Tabla 2.</b> Secuencia de cebadores, región amplificada, condiciones de ciclado y referencia de PCR utilizadas para la amplificación de los genes <i>ARNr 16S</i> y <i>aprX</i> . .	17
<b>Tabla 3.</b> Identificación fenotípica de los aislamientos de psicrótrofos con capacidad proteolítica seleccionados para este estudio (n=55). Morfología macroscópica, microscópica, coloración de Gram y prueba de la catalasa. ....	22
<b>Tabla 4.</b> Identificación de los aislamientos mediante secuenciación del gen ribosomal 16S. Resultados del alineamiento mediante Blastn en la base datos de Genbank. ..	24
<b>Tabla 5.</b> Tiempo de coagulación de la leche entera comercial producido por las fracciones enzimáticas primaria y tratada térmicamente (FEP y FET) de los aislamientos de psicrótrofos (n=12, aislamientos que mostraron capacidad de coagular en algún grado) incubadas a 7 y 30 °C.....	30
<b>Tabla 6.</b> Tiempo de coagulación de la leche descremada comercial producido por las fracciones enzimáticas primaria y tratada térmicamente (FEP y FET) de los aislamientos de psicrótrofos (n=11, aislamientos que mostraron capacidad de coagular en algún grado) incubadas a 7 y 30 °C.....	31
<b>Tabla S1.</b> Identificación fenotípica de los 167 aislamientos de bacteria psicrótrofas según productos, estación del año, características morfológicas macroscópicas, microscópicas, coloración de Gram y prueba de la catalasa.....	53
<b>Tabla S2.</b> Concentración y pureza de las muestras de ADNs.....	60

### FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Flujograma ilustrando la técnica para la cuantificación enzimática por Nolasco-Soria, 2020. ....	19
<b>Figura 2.</b> Capacidad proteolítica de los aislamientos de psicrótrofos. Porcentaje de aislamientos positivos (izquierda). Determinación de la actividad proteolítica en agar leche (derecha) de dos aislamientos. 87B positivo (zona clara o halo alrededor de las colonias), 87A negativo (sin halo).....	21
<b>Figura 3.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % teñido con <i>SYBR Safe</i> (INVITROGEN, USA). Carril 1: marcador de peso molecular 1 kb plus (Fermentas, USA); carriles 2-8: amplificación del gen 16S ribosomal en los aislamientos de psicrótrofos (tamaño del amplicón aprox. de 1500 pb); carril 9: agua libre de ADN (control sin amplificación). ....	23
<b>Figura 4.</b> Relaciones filogenéticas entre las cepas de psicrótrofos (n=33) basado en las secuencias del gen ribosomal 16S. Las secuencias alineadas se analizaron con el método de Máxima Verosimilitud y los valores del bootstrap (1000 réplicas), utilizando un modelo de sustitución de Kimura de 2 parámetros.....	26
<b>Figura 5.</b> Relaciones filogenéticas entre la cepa candidata de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (160A) y cepas de referencia, basados en la secuencia del gen <i>aprX</i> . Las secuencias alineadas se analizaron con el método de Máxima Verosimilitud y los valores del bootstrap (1000 réplicas), utilizando un modelo de sustitución de Kimura de 2 parámetros. ....	27
<b>Figura 6.</b> Curva estándar elaborada con concentraciones en un rango de 0 a 1%, utilizando una proteasa comercial de <i>Streptomyces griseus</i> a 37 °C por 30 min, midiendo la absorbancia a 450 nm longitud de onda. ....	28

<b>Figura 7.</b> Cuantificación de la actividad enzimática (UA/mL-1) en aislamientos de psicrótrofos cultivados en leche a 30° C por 72 h. Actividad en las fracciones enzimáticas: ■ primaria (FEP- sin tratamiento térmico) y ■ termoestable (FET- 63,5° C por 30 min). Unidad actividad de proteasa (UA) = incremento en 0,01 unidades de absorbancia a 420 nm. * = sin detección de actividad.....	29
<b>Figura 8.</b> Análisis de supervivencia según tiempo de coagulación de la leche de los 33 aislamientos de bacterias psicrótrofas en leche entera, a dos temperaturas: 30°C y 7°C, con FEP (A) y FET (B).....	32
<b>Figura 9.</b> Análisis de supervivencia según tiempo de coagulación de la leche de los 33 aislamientos de bacterias psicrótrofas en leche entera y leche descremada, con FEP y FET a 30 °C.....	33
<b>Figura 10.</b> Efecto del pH sobre la actividad proteolítica del FEP de los 5 aislamientos seleccionadas. Los resultados se expresan en % de actividad enzimática.....	34
<b>Figura 11.</b> Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad proteolítica de los FEP. Los resultados se expresan en % de actividad enzimática.....	35

## RESUMEN

Las bacterias psicrótrofas son capaces de crecer a bajas temperaturas (4-7 °C), gracias a su elevado metabolismo, predominantemente lipo-proteolítico. Su importancia en la leche y productos lácteos, radica en la habilidad de producción de enzimas extracelulares, principalmente proteasas estables al calor, que permanecen activas en un amplio rango de temperaturas. El objetivo de este trabajo, fue caracterizar la producción de enzimas proteolíticas termoestables de bacterias psicrótrofas, aisladas de leche de tanque de cuatro establecimientos lecheros de la región litoral-norte de Uruguay. Para ello se conformó un cepario de 167 aislamientos los cuales se clasificaron de acuerdo a su capacidad de hidrolizar la caseína. Los aislamientos proteolíticos se identificaron mediante secuenciación del gen que codifica el *ARNr 16S*. La producción de enzima fue evaluada utilizando azocaseína como sustrato, antes y después del tratamiento térmico. También se realizó en estos aislamientos la búsqueda del gen *aprX*, que codifica una metaloproteasa alcalina, principal responsable del deterioro de la leche. Por otra parte, se evaluó la capacidad de coagulación de la leche comercial entera y descremada a temperatura ambiente y de refrigeración. En los aislamientos con mayor producción de enzimas se determinó el rango de actividad a diferentes pH y temperaturas. En relación a los resultados, el 33% de los aislamientos psicrótrofos mostraron actividad proteolítica y el 54,5 % de estos produjeron enzimas termoestables. Una gran variedad de géneros y especies de bacterias psicrótrofas fue identificada. Las especies más frecuentemente aisladas corresponden a psicrótrofos cuyo origen puede ser ambiental (Gram negativos y positivos). Dentro de los Gram negativos, el género *Pseudomonas* spp. fue el aislado con mayor frecuencia, representado por las especies *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*. Otras especies de Gram negativos correspondieron a *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens* y *Stenotrophomonas* spp. Se destacaron por sus mayores títulos de producción de enzimas, actividad enzimática en un amplio rango de pH y estabilidad térmica alta, los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* y *Serratia liquefaciens*. Las enzimas producidas por estos aislamientos mostraron mayor actividad enzimática a pH 8 y a temperatura de 37 °C, lo que podría indicar la producción de proteasas alcalinas termoestables. El gen *aprX* se detectó únicamente en la cepa de *Pseudomonas fluorescens* 160A.

Varios aislamientos presentaron enzimas con capacidad de coagular la leche comercial a temperatura ambiente y de refrigeración, lo que, sumado a la termoestabilidad de estas enzimas, dan cuenta del riesgo potencial de alteración que tendría la leche pasteurizada y UHT durante su almacenamiento y distribución.

## SUMMARY

Psychrotrophic bacteria can grow at low temperatures (4-7 °C) due to their high metabolism, predominantly lipoproteolytic. Its importance in milk and dairy products it is because of the ability to produce extracellular enzymes, mainly heat-stable proteases, which remain active over various temperatures. This work aimed to characterize the production of thermostable proteolytic enzymes of psychrotrophic bacteria isolated from bulk tank milk from four dairy farms in the northern region of Uruguay. For this purpose, a strain collection of 167 isolates was created, classified according to their ability to hydrolyze casein. Proteolytic isolates were identified by sequencing the gene encoding 16S rRNA. Enzyme production was evaluated using azocasein as a substrate before and after heat treatment. The search for the *aprX* gene, which encodes an alkaline metalloprotease mainly responsible for milk spoilage, was also carried out in these isolates.

On the other hand, the coagulation capacity of commercial whole and skim milk was evaluated at room and refrigeration temperatures. In the isolates with higher enzyme production, the range of activity at different pH and temperatures was determined. About the results, 33% of the psychrotrophic isolates showed proteolytic activity, and 54.5% produced thermostable enzymes. A wide variety of genera and species of psychrotrophic bacteria were identified. The most frequently isolated species correspond to psychrotrophs whose origin may be environmental (Gram-negative and positive). Within the Gram-negatives, the genus *Pseudomonas* spp. was the most frequently isolated, represented by the *P. aeruginosa* and *P. fluorescent* species. Other Gram-negative species corresponded to *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, and *Stenotrophomonas* spp. The isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, and *Serratia liquefaciens* stood out for their higher enzyme production titers, enzymatic activity in a wide pH range, and high thermal stability. The enzymes produced by these isolates showed higher enzymatic activity at pH 8 and 37 °C, which could indicate the production of thermostable alkaline proteases. The *aprX* gene was detected only in the *Pseudomonas fluorescens* strain 160A.

Several isolates presented enzymes with the capacity to coagulate commercial milk at room and refrigerated temperatures, which, added to the thermostability of these enzymes, account for the potential risk of alteration that pasteurized and UHT milk would have during its storage and distribution.

## INTRODUCCIÓN

### *Calidad microbiológica de la leche bovina*

La leche cruda, es aquella producida por la secreción de la glándula mamaria y que no ha sido sometida a ningún tratamiento térmico, como la pasteurización. (U.S. Food and Drug Administration, FDA, s.f.; López y Barriga, 2016). La calidad de la leche cruda y pasteurizada, así como la de los productos lácteos derivados, es la consecuencia de todas las actividades desarrolladas durante el proceso de producción, desde el tambo hasta su transformación en la industria láctea (Vilar et al., 2012). La leche bovina es una fuente rica en lípidos, proteínas, aminoácidos, vitaminas y minerales lo que sumado a su alta actividad de agua ( $a_w$ ) la convierten en una excelente matriz para el crecimiento de un gran número de microorganismos deteriorantes y patógenos para el ser humano (Haug, Høstmark, Harstad, 2007; Hill, Smythe, Lindsay y Shepherd, 2012).

La composición microbiológica de la leche cruda varía y se ve influenciada por, los microorganismos presentes en el canal y la piel del pezón, condiciones de las instalaciones, la calidad del suministro de agua y la higiene de los equipos (Vacheyrou et al., 2011; Verdier-Metz, Michel, Delbès y Montel 2009). Sumado a lo anterior, la insuficiente capacidad de frío y/o los prolongados tiempos de almacenamiento en esta condición, pueden aumentar el recuento bacteriano (Elmoslemany, Keefe, Dohoo y Jayarao, 2009). Cuando la contaminación inicial de aerobios mesófilos y coliformes totales es elevada o el almacenamiento es prolongado, puede resultar en la disminución de la calidad en los productos lácteos, debido al crecimiento de bacterias psicrótrofas (Teh et al., 2011).

### *Grupos microbianos y fuentes de contaminación para la leche*

#### *Recuento de mesófilos aerobios totales*

Son las bacterias que pueden crecer entre 30 y 37 °C en condiciones aerobias, ya sean provenientes de la piel de los pezones, las heces, manos del ordeñador, equipos, suelo, agua, etc. Se asocian con agentes etiológicos de la mastitis o la microbiota normal de la piel. En tal sentido, el recuento de mesófilos aerobios determina las condiciones de higiene de la leche. Un alto recuento de mesófilos aerobios totales se puede asociar a: inadecuadas prácticas de ordeño de los productores, uso compartido de toallas no desechables, uso del ternero en la estimulación de la glándula mamaria, no higienizar las ubres, utensilios con impurezas y tanques sucios (Velázquez-Ordoñez et al., 2019).

#### *Termodúricos*

Las bacterias termodúricas poseen un cierto grado de resistencia a los tratamientos térmicos y son capaces de sobrevivir al proceso de pasteurización. Pueden causar deterioro en la calidad de los productos manufacturados, tales como hinchazón tardía en queso y presencia de aminos biógenos en quesos. Las principales fuentes de contaminación en el tambo son el suelo, el alimento (pasturas, reservas forrajeras, concentrados), las heces y el polvo, que se adhieren a la superficie de la ubre y el

pezón, y se transmiten a la leche durante el proceso de ordeño (Muñoz, 2004; Reginensi et al., 2015).

### *Bacterias psicrótrofas*

Si bien bacterias mesófilas y termófilas formadoras de esporas tienen un gran potencial para contaminar productos lácteos procesados, y pueden ser rechazados por no cumplir con los niveles aceptables de esporas en los productos lácteos (Yuan et al., 2018), son las bacterias psicrótrofas las que representan mayores problemas para mantener la calidad y evitar grandes pérdidas por deterioro microbiológico (Vithanage et al., 2016).

Actualmente para controlar el crecimiento bacteriano en leche cruda durante su almacenamiento y transporte se utiliza un sistema de cadena de frío. Este almacenamiento y transporte a bajas temperaturas promueve el crecimiento de bacterias psicrótrofas y la producción de enzimas termoestables. (Yuan et al., 2018). Las fuentes de contaminación de bacterias psicrótrofas son muy variadas, incluyen agua, aire, suelo, y equipos de procesamientos (Vacheyrou et al., 2011).

Las bacterias psicrótrofas son definidas por su capacidad de crecer a bajas temperaturas (4-7°C), independientemente de que su temperatura óptima de crecimiento sea de 20 a 30 °C, por causa de su elevado metabolismo, predominantemente lipo-proteolítico. Estos microorganismos pueden ser bacilos, cocos o vibrios, formadores o no de esporas, Gram negativos o positivos, aerobios o anaerobios (Sørhaug & Stepaniak, 1997). Numerosos géneros de bacterias psicrótrofas han sido aislados de leche cruda: *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Serratia*, *Hafnia*, *Bacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Microbacterium* y *Staphylococcus* (Júnior et al., 2018; Vithanage et al., 2016; Yuan et al., 2017; Yuan, Sadiq, Burmølle, Wang y He, 2019), estimándose que estos microorganismos representan del 37-54 % de la microbiota de la leche cruda refrigerada (Hayes et al., 2001; Raats, Offek, Minz y Halpern, 2011). Sin embargo, varios estudios reportan un gran número de aislamientos con identificación a nivel de especie desconocida, sugiriendo que una importante fracción de la microbiota de la leche cruda permanece sin explorar (Von Neubeck et al., 2015, Yuan et al., 2017).

En términos de calidad, las bacterias psicrótrofas se han convertido en un problema de especial importancia para la industria láctea, siendo reconocidas como uno de los principales agentes causantes de deterioro, llevando a importantes pérdidas económicas del sector (Samaržija, Zamberlin, y Pogačić, 2017).

Además de su capacidad de crecimiento a temperaturas de refrigeración, su importancia radica en la habilidad de producción de enzimas intra y extracelulares (proteasas, lipasas y fosfolipasas), algunas de ellas estables al calor y que permanecen activas en un amplio rango de temperaturas (Baur et al., 2015; Chen, Daniel y Coolbear, 2003), sobreviviendo a las condiciones de procesamiento térmico llevados a cabo actualmente en la industria y permaneciendo activas (Vithanage et al., 2016). Producen cambios bioquímicos que disminuyen la calidad, la vida útil del producto y su valor nutricional. Las enzimas que presentan mayor problema son proteasas y lipasas que mantienen su actividad a 70°C, 80°C e incluso a 90 °C. (Yuan et al., 2018). Las lipasas catalizan la hidrólisis de triglicéridos, causando rancidez y

reducción de propiedades espumantes (Chen et al., 2003), (Bekker et al., 2016) y las proteasas hidrolizan la caseína produciendo sabores amargos y gelación de la leche (Baur et al., 2015). El fenómeno de desestabilización de la leche con formación de gel o sedimento es un síntoma de mala calidad del producto (Baglinière et al., 2013).

La demanda global de productos lácteos, constantemente en crecimiento, requiere que los fabricantes produzcan productos de alta calidad y con prolongada vida útil. La producción de enzimas termorresistentes deteriorantes representa un gran desafío para la industria láctea (Yuan et al., 2018). Es por todo esto que el deterioro causado por bacterias psicrotóficas y sus enzimas son un desafío mayor para la industria láctea. Muchos estudios se han realizado sobre el potencial de deterioro de estas bacterias y sus enzimas, pero se necesitan más estudios para lograr estrategias para evitar estas pérdidas. (Yuan et al., 2018).

### *Enzimas proteolíticas*

Dentro de las bacterias psicrotóficas que crecen en la leche de tanque refrigerada, el género *Pseudomonas* es el más predominante. Produce proteasas extracelulares resistentes a tratamiento UHT y son responsables del deterioro de la leche, coagulación, sabores rancios o amargos (Decimo, Morandi, Silvetti y Brasca, 2014; Matéos et al., 2015).

El género *Pseudomonas* spp. es conocido por su producción de metaloproteasas termorresistentes. Aunque estas bacterias se destruyen fácilmente por los procesos térmicos utilizados en la industria láctea como UHT, sus enzimas resisten estos tratamientos y se mantienen activas en los productos lácteos, provocando problemas de inestabilidad y deterioro incluso mucho antes de su fecha estimada de caducidad. Las lipasas termorresistentes son responsables de la hidrólisis de las grasas, causantes de rancidez, mientras que las proteasas actúan sobre las caseínas, resultando en gelificación de la leche y formación de sabores amargos (Marchand et al., 2009). Como el deterioro lipídico ha sido reportado con menor frecuencia, la mayoría de los investigadores se han enfocado en estudiar la expresión y producción de proteasas. Las proteasas son enzimas que catalizan la degradación de proteínas al hidrolizar enlaces peptídicos, específicamente las alcalinas son aquellas que exhiben su actividad óptima a un pH entre 9 y 11 (Barros Leal Nörnberg, Tondo y Brandelli, 2009; Decimo et al., 2014; Marchand et al., 2009).

Numerosas publicaciones señalan la proteasa extracelular *AprX*, como la principal deteriorante de la leche. Esta es una metaloproteasa dependiente de Zinc, producida por cepas de *Pseudomonas* spp., principalmente por *P. fluorescens*, pero también ha sido descrita en otras especies como *P. fragi*, *P. tolaasii*, *P. rhodesiae*, *P. gessardii*, *P. proteolytica*, *P. brenneri*, y *P. chlororaphis* (Aguilera-Toro et al., 2023; Caldera et al., 2016; Marchand et al., 2009; Martins, De Araújo, Mantovani, Moraes y Vanetti, 2005). Esta proteasa caseinolítica es resistente a las condiciones de calentamiento utilizadas en el procesamiento de la leche a ultra alta temperatura (UHT) y su actividad residual puede conducir al desarrollo de numerosos defectos de calidad y reducción de la vida útil de la leche UHT (Dufour et al., 2008; Marchand et al., 2009). De acuerdo con Zhang et al., (2019) una comprensión integral de la proteasa *AprX*, abordando sus propiedades biológicas, regulación, potencial proteolítico e impacto en la leche UHT, puede contribuir a encontrar enfoques efectivos para detectar, minimizar e inactivar esta proteasa.

Esta proteasa es codificada en el gen *aprX*, que en el genoma de *Pseudomonas* forma parte del operón *aprX-lipA* (Woods, Burger, Beven y Beacham, 2001). Tienen propiedades similares a las metaloproteasas termoestables pertenecientes a la familia de las serralisinas, con una actividad óptima a un pH de 7,5 - 9 (Machado et al., 2017). Su detección en cepas o incluso directamente en la leche ha sido sugerida como indicador indirecto del potencial de deterioro (Zhang et al., 2019).

Las secuencias de aminoácidos de las metaloproteasas producidas por bacterias lejanamente emparentadas como lo son *Serratia marcescens* y *Erwinia chrysanthemi*, tienen aún una homología de un 50- 60 % con las proteasas alcalinas de *P. fluorescens* y *P. aeruginosa* (Marchand et al., 2009).

Se necesitan más investigaciones respecto a la capacidad proteolítica de distintas cepas que poseen el gen *aprX* en leche. Evidentemente, la sola posesión del gen no necesariamente implica su expresión (Marchand et al., 2009).

### *Antecedentes en Uruguay*

En Uruguay, la refrigeración utilizada en los tanques de frío y el efecto de los cambios de temperatura durante el ordeño permiten el crecimiento de bacterias psicrótrofas. Si bien estos microorganismos son sensibles a los tratamientos térmicos aplicados en la industria, las enzimas proteolíticas que producen pueden ser termorresistentes, permaneciendo en los productos elaborados y contribuyendo a su deterioro. Además, la información en nuestro país es escasa y está dirigida principalmente al recuento y la identificación bacteriana (Camarotte, 2013; Grille, 2016; Olmos, 2014); no existiendo datos sobre la caracterización de las enzimas de este grupo bacteriano. Comprender las consecuencias de la presencia de estas enzimas en la leche, es esencial para proponer estrategias que busquen reducir la transferencia de bacterias productoras de enzimas (Bogo et al, 2017). En este sentido, este trabajo busca complementar y ampliar la información existente, con investigación de la capacidad proteolítica de las bacterias psicrótrofas y la caracterización de sus enzimas.

## **HIPÓTESIS**

Las bacterias psicrótrofas aisladas de leche cruda de tanque de establecimientos lecheros de la región litoral norte del Uruguay producen proteasas alcalinas termoestables y son capaces de coagular leche comercial entera y descremada a temperatura ambiente y de refrigeración.

## **OBJETIVO GENERAL**

Identificar las especies de psicrótrofos aislados de leche cruda de tanque de establecimientos lecheros de la región litoral norte y caracterizar la producción de enzimas proteolíticas termoestables.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Sobre un cepario definido de bacterias psicrótrofas de leche de tanque:

- Determinar cualitativamente la actividad proteolítica de bacterias psicrótrofas.
- Determinar la termorresistencia de las enzimas proteolíticas.
- Identificar genotípicamente los aislamientos con actividad proteolítica.
- Determinar la presencia del gen *aprX* en los aislamientos con actividad proteolítica.
- Cuantificar la producción de enzimas termoestables.
- Determinar el tiempo de coagulación de la leche comercial producida por estas enzimas en diferentes condiciones.
- Caracterizar la actividad enzimática (pH y temperaturas óptimas) de los aislamientos con mayor producción.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Análisis previos de los tambos seleccionados*

Este estudio se realizó con muestras de leche cruda de tanque de 4 productores remitentes a dos de las principales industrias lácteas de la región litoral-norte de Uruguay. En la Tabla 1 se pueden observar los resultados previos de los recuentos de bacterias psicrótrofas totales y de *Pseudomonas* spp.

**Tabla 1.** Recuentos de bacterias psicrótrofas totales y de *Pseudomonas* spp. por productor y estación del año (UFC/ml).

N° de productor	Estación del año	Recuento de Psicrótrofos (UFC/ml)	Recuento de <i>Pseudomonas</i> spp. (UFC/ml)
2	Primavera	$8,9 \times 10^4$	$3,0 \times 10^2$
11	Primavera	$2,3 \times 10^5$	<100
13	Primavera	$4,4 \times 10^3$	<100
14	Primavera	$6,1 \times 10^4$	<100
2	Otoño	$4,6 \times 10^4$	<100
11	Otoño	$3,5 \times 10^4$	<100
13	Otoño	$4,0 \times 10^2$	<100
14	Otoño	$5,0 \times 10^2$	<100
2	Verano	$1,9 \times 10^3$	<10
11	Verano	$1,2 \times 10^3$	<10
13	Verano	$2,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^1$
14	Verano	$1,1 \times 10^3$	<10
2	Invierno	$1,1 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$
11	Invierno	$1,3 \times 10^3$	<100
13	Invierno	$9,2 \times 10^2$	<100
14	Invierno	$1,0 \times 10^2$	RE >100

\*RE= Recuento estimado. \*UFC= Unidad Formadora de Colonia

De la colección de aislamientos, 28 % corresponden al productor N° 14, 27 % al N° 11, 23 % al N° 2, y finalmente 22 % corresponden al productor N° 13. En la Tabla S1 (en Anexo), se ilustra la estación del año, características morfológicas de colonias, coloración de Gram y prueba de la catalasa de estos.

### *Aislamientos bacterianos y condiciones de cultivos*

Se utilizó un cepario constituido por 167 aislamientos de bacterias psicrótrofas obtenidas de leche cruda de tanque. Los mismos provenían de 4 tambos remitentes a dos de las industrias lácteas principales de la región litoral norte del Uruguay y fueron colectados en el período de abril 2012 a marzo 2013, durante las cuatro estaciones del año (Grille, 2016). Las muestras fueron analizadas previamente mediante el recuento total de bacterias psicrótrofas y de *Pseudomonas* spp.

Los aislamientos fueron mantenidos a -20 °C en criotubos conteniendo leche descremada estéril (10 %) y glicerol (10 %) hasta su utilización.

Para la reactivación de las cepas, las mismas se cultivaron en caldo triptona soya (TSB, HIMEDIA, India) y se incubaron a 30 °C por 48 horas en aerobiosis. Los caldos que presentaron crecimiento fueron estriados repetidamente en la superficie de placas con agar triptona soya (TSA, HIMEDIA, India) hasta obtener cultivos puros, incubándose en las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Las colonias fueron evaluadas macroscópicamente (morfología, pigmentación, etc.) y mediante frotis con tinción de Gram y prueba de la catalasa (Bogo, 2016).

### *Capacidad proteolítica*

La actividad proteolítica de las bacterias psicrótrofas fue evaluada según (Ruaro Andrighetto, Torriani y Lombardi, 2013). Para ello, una colonia aislada se estrió en la superficie de agar leche (10 % de leche en polvo descremada) y se incubó a 30 °C por 48hs en aerobiosis. Como control positivo se utilizó la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. La actividad proteolítica se confirmó al observar la formación de un halo o zona clara alrededor de la colonia. Los aislamientos se clasificaron de acuerdo con su capacidad de hidrolizar la caseína en proteolíticos o no proteolíticos.

### *Identificación molecular de los aislamientos*

La identificación de los aislamientos se realizó mediante la amplificación parcial y secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S utilizando los cebadores universales 27F y 1492R (Weisburg, Barns, Pelletier y Lane, 1991).

El ADN genómico de los cultivos bacterianos se extrajo utilizando el método de ebullición con Tween 20 (Merck, Alemania) al 0,05 % (Longhi et al., 2003). La concentración y pureza del ADN genómico se determinó mediante espectrofotometría en NanoDrop (Thermo Scientific, EE. UU) y la integridad mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %.

La PCR se realizó en un volumen final de 50 µL y por duplicado. Para la reacción se utilizó el kit de PCR (Invitrogen, Life Technologies, Brasil) conteniendo: Buffer de PCR (1X), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), dNTP's (0,2 mM), cebadores (0,5 µM), Taq ADN polimerasa (1 U) y 5 µL de ADN. El ciclado se realizó en un termociclador (Sensoquest, Alemania). Las condiciones y la secuencia de los cebadores se describen en la Tabla 1.

Los productos de PCR obtenidos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % teñidos con SYBR Safe (INVITROGEN, EE. UU.) y se visualizaron en un transiluminador de luz UV (Labnet International, Inc. EE. UU). Para estimar el tamaño de los productos se utilizó el marcador de peso molecular 1 KB plus

(Fermentas, EE. UU). Posteriormente, los amplicones se enviaron a MacroGen Inc. (Seúl, Corea) para su purificación y posterior secuenciación.

Los cromatogramas de las secuencias obtenidas se analizaron mediante el software BioEdit 7.2.6.1 (Hall, 2011) obteniendo una secuencia consenso. El género y/o especie de los aislamientos se asignó mediante la comparación con la base de datos de secuencias de GenBank utilizando la herramienta *BLAST* (Altschul et al., 1997).

#### *Detección del gen aprX*

La detección del gen *aprX* se realizó mediante PCR utilizando los cebadores diseñados por Marchand et al., (2009) y de acuerdo a lo descrito por Morandi et al., 2021. Los reactivos utilizados para la mix de PCR se colocaron a igual concentración final que lo descrito anteriormente para el gen ARNr 16S, a excepción de los cebadores cuya concentración fue de 1  $\mu$ M. La secuencia de los cebadores y condiciones del ciclado se describen en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Secuencia de cebadores, región amplificada, condiciones de ciclado y referencia de PCR utilizadas para la amplificación de los genes *ARNr 16S* y *aprX*.

Cebadores	Secuencia (5' - 3')	Región amplificada	Ciclado	Referencia
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Gen <i>ARNr 16S</i> (1465 pb)	95 °C x 5min. 30 ciclos de: 95 °C x 1 min, 50 °C x 1 min y 72 °C por 1,5 min. 72 °C x 10 min	(Weisburg et al., 1991)
1492R	CTACGGCTACCTTGTTACGA			
SM2F	AAATCGATAGCTTCAGCCAT	Gen <i>aprX</i> (850 pb)	95 °C x 5min. 30 ciclos de 95 °C x 0,5 min, 60 °C x 0,5 min y 72 °C x 1 min. 72 °C x 8 min	(Marchand et al., 2009; Morandi et al., 2021)
SM3R	TTGAGGTTGATCTTCTGGTT			

#### *Cuantificación de la actividad enzimática*

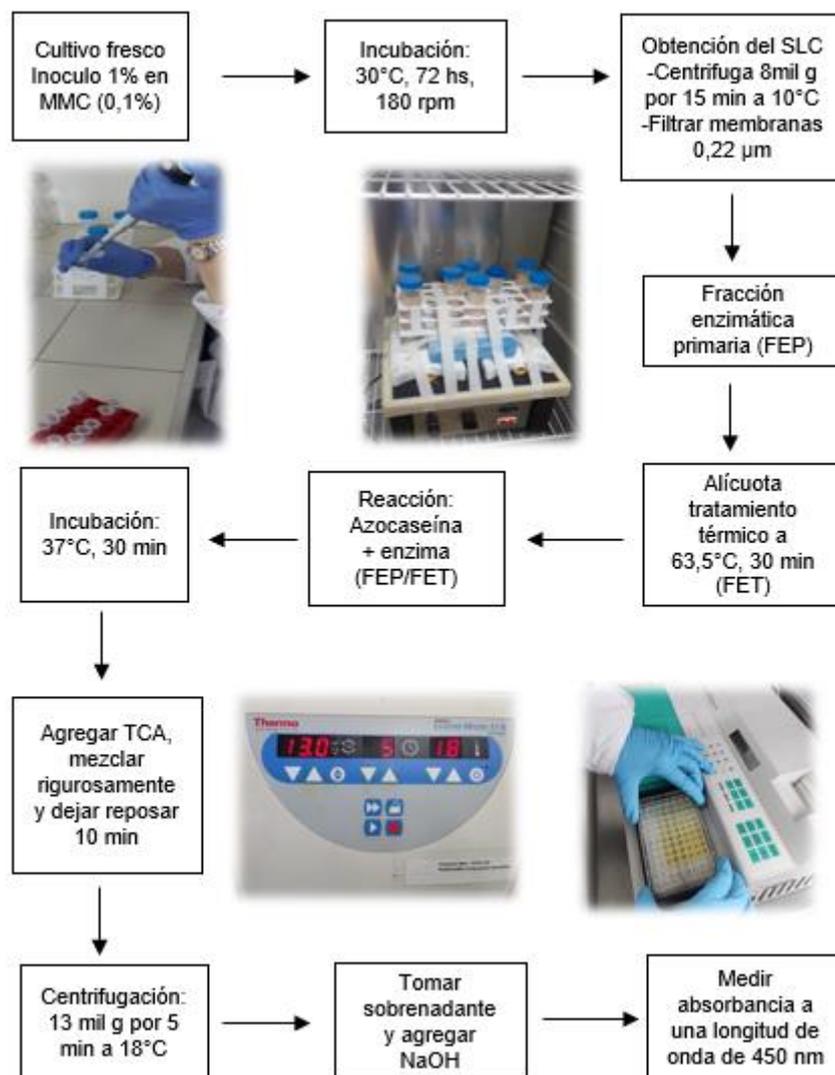
La actividad de proteasa de los aislamientos se cuantificó utilizando azocaseína como sustrato. Esta es un derivado cromogénico de la caseína que se emplea ampliamente en cultivos de bacterias para estimar la producción de proteasas no específicas (Coêlho et al., 2016). Las proteasas degradan la azocaseína para producir azopéptidos solubles en ácido tricloroacético (TCA) y la liberación del colorante azo se detecta midiendo la absorbancia a 440 nm. La técnica de cuantificación se puso a punto en el laboratorio de acuerdo a lo descrito por Nolasco-Soria, (2021) con algunas modificaciones.

La concentración óptima de azocaseína en los ensayos se determinó, realizando una curva estándar con concentraciones en un rango de 0 a 1 % y utilizando una proteasa comercial de *Streptomyces griseus* (SIGMA P8811). Las diferentes concentraciones de azocaseína se prepararon en 900  $\mu\text{L}$  de buffer Tris-HCl (50 mM, pH 8) a temperatura ambiente. La reacción inició cuando se agregó 100  $\mu\text{l}$  de la enzima comercial (35 U/ $\mu\text{L}$ ). La mezcla se incubó por 30 min a 37 °C. Para detener la reacción se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético al 20 % seguido de la agitación vigorosa en Vortex. Los tubos se dejaron reposar por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, para separar los productos no precipitados, los tubos se centrifugaron a 13.000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. Para alcalinizar la mezcla antes de realizar la lectura, una alícuota de 1500  $\mu\text{L}$  del sobrenadante fue adicionado de 250  $\mu\text{L}$  de NaOH (0,25 M). Las reacciones se cargaron en placas de 96 pocillos (utilizando octuplicados de cada concentración) y la absorbancia fue leída a una longitud de onda de 450 nm en un lector de Elisa (Senova MR1100, Alemania). Como blanco para las lecturas se preparó una reacción donde la enzima fue remplazada por 100  $\mu\text{l}$  del mismo buffer.

Una unidad de actividad de proteasa (UA) se definió como la cantidad de enzima que causa un aumento de 0,01 unidades de absorbancia en las condiciones de ensayo definidas (Nolasco-Soria, 2021).

#### *Producción y cuantificación de enzimas proteolíticas de los aislamientos*

La producción de enzimas por los aislamientos se realizó de acuerdo a lo descrito por Bogo et al., (2017) utilizando un medio de cultivo mineral con caseína (MMC) al 0,1 % (0,5 g/L de NaCl, 0,3 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,4 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y 1 g/L de Caseína). Los pasos secuenciales se ilustran en la Figura 1. Brevemente, tubos con 40 mL de MMC fueron inoculados (1 % V/V) con un cultivo fresco de cada aislamiento. Para conocer la concentración inicial de bacterias del inóculo una alícuota de cada cultivo fue sembrado en placas con TSA e incubado en las condiciones anteriormente citadas. Los tubos inoculados se incubaron a 30 °C por 72 horas bajo agitación a 180 rpm (agitador orbital). Posteriormente, para la obtención del sobrenadante libre de células (SLC), se centrifugó a 8.000 x g por 15 min a 10 °C y se filtró con membranas de tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore, Inglaterra). Este SLC representa el extracto crudo de la enzima o fracción enzimática primaria (FEP). Posteriormente, para determinar si las enzimas producidas eran termoestables, una alícuota del FEP fue tratado térmicamente a temperatura de pasteurización (63,5 °C por 30 minutos) utilizando un termobloque (Thermo Scientific, EE. UU.). Esta constituye la fracción enzimática tratada térmicamente (FET). Ambas fracciones se cuantificaron utilizando la técnica puesta a punto anteriormente descrita. Las enzimas producidas por los aislamientos se consideraron termoestables cuando la actividad proteolítica se mantuvo ( $\geq 50\%$ ) luego del tratamiento térmico (Abidi, Limam y Marzouki, 2007).



**Figura 1.** Flujograma ilustrando la técnica para la cuantificación enzimática por Nolasco-Soria, 2020.

### *Coagulación de la leche comercial*

Para determinar si la grasa láctea influiría en la coagulación, se evaluó el tiempo de coagulación de la leche bovina comercial ([www.conaprole.uy](http://www.conaprole.uy)) entera y descremada y a dos temperaturas 7 y 30 °C (simulando refrigeración y temperatura ambiente) de acuerdo con lo propuesto por (Bogo, 2016). Para ello, se mezcló 1 mL de la FEP de cada bacteria psicrótrofa con 2 mL de leche pasteurizada bovina descremada y entera, luego se les adicionó 110 µL de una solución al 1 % de azida sódica (Merck, Alemania) para la inactivación de las células bacterianas y se incubó a las temperaturas mencionadas. Una alícuota de la FEP se utilizó como control. El mismo procedimiento se realizó para la FET. Los cambios en la leche inoculada se inspeccionaron visualmente a las 2, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas de incubación registrando el tiempo de coagulación. Como controles se utilizó leche comercial inoculada con la solución de azida sódica (control negativo) y leche comercial inoculada con una solución de quimosina con concentración 50 IMCU/l (Chr. Hansen, Dinamarca, control positivo).

Los resultados obtenidos del ensayo de coagulación de la leche comercial, se analizaron mediante estadística descriptiva. Luego se utilizó el análisis de supervivencia por el método Kaplan-Meier, que es un método estadístico no-paramétrico, tomando en cuenta los tiempos de supervivencia hasta la aparición del evento (coagulación) durante las 120 h del experimento.

#### *Caracterización de la actividad enzimática*

Se determinó temperatura y pH óptimos de las enzimas de aquellos aislamientos que presentaron los títulos más altos, según lo descrito por (Matéos et al., 2015).

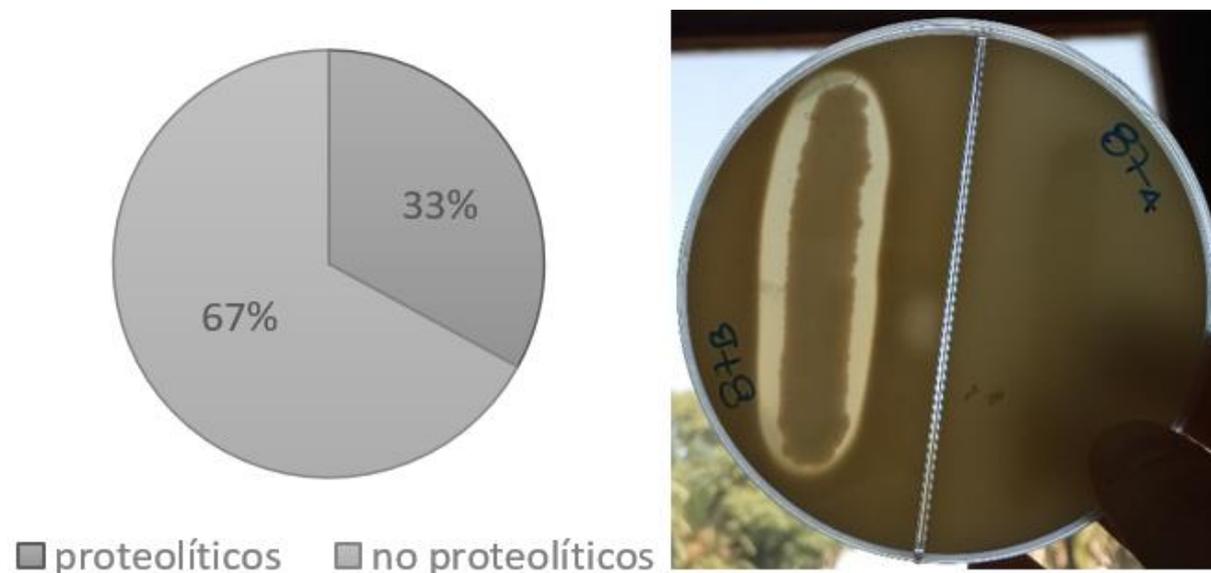
Se testearon diferentes pH en el rango de 5 a 11 (pH 5, buffer acetato de sodio 0,2 M; pH 6, 7 y 8, buffer fosfato de sodio 0,2 M; pH 9, 10 y 11, buffer carbonato bicarbonato de sodio 0,2 M) a 37 °C por 30 minutos.

De acuerdo con lo obtenido anteriormente, se experimentaron diferentes temperaturas (30, 37, 40, 50, 60, 70 y 80 °C) cuantificando la actividad de acuerdo con el método ya mencionado utilizando azocaseína como sustrato.

## RESULTADOS

### *Capacidad proteolítica cualitativa*

En el presente estudio se obtuvieron 167 aislamientos de bacterias psicrotrofas provenientes de los 4 productores. Se observó que 55 aislamientos (33%) presentaron una zona clara o halo alrededor de la colonia. Algunos con halos mayores cuando se compararon con el control positivo (Figura 2).



**Figura 2.** Capacidad proteolítica de los aislamientos de psicrotrofos. Porcentaje de aislamientos positivos (izquierda). Determinación de la actividad proteolítica en agar leche (derecha) de dos aislamientos. 87B positivo (zona clara o halo alrededor de las colonias), 87A negativo (sin halo).

### *Identificación preliminar de los aislamientos*

Para la identificación de los aislamientos, los 55 se agruparon según el número de productor y estación del año, características macroscópicas idénticas de las colonias, coloración de Gram y prueba de la catalasa (Tabla 3). Se identificaron 33 aislamientos, dado que, si el aislamiento provenía del mismo productor y tenía las mismas características anteriormente mencionadas, se identificaba uno representativo.

**Tabla 3.** Identificación fenotípica de los aislamientos de psicrotrofos con capacidad proteolítica seleccionados para este estudio (n=55). Morfología macroscópica, microscópica, coloración de Gram y prueba de la catalasa.

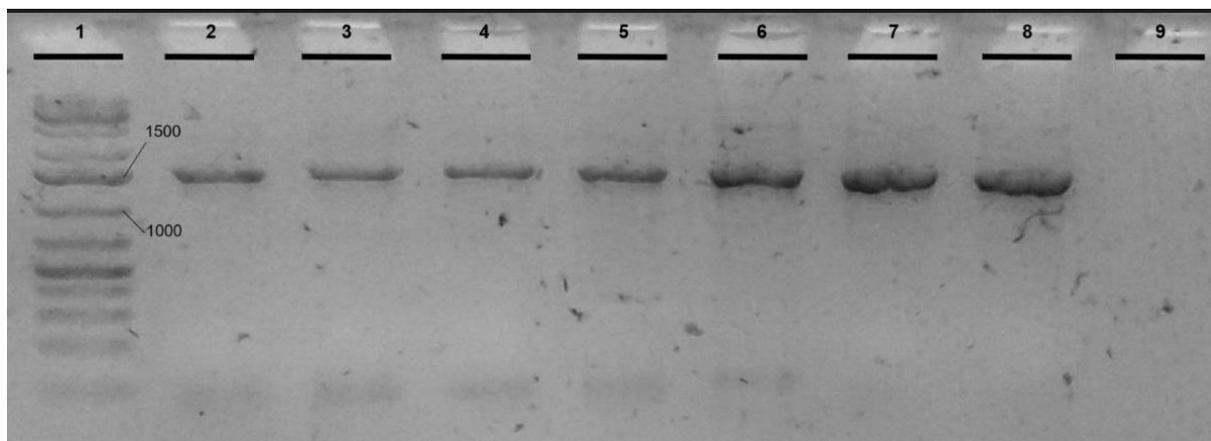
Código de aislamiento*	Morfología colonia	Gram	Catalasa
<b>8A, 8B, 8C</b>	pequeña, circular, amarilla	Cocos, Gram +	Positivo
<b>56C</b>	pequeña, punta alfiler, crema	Bacilos, Gram +	Positivo
<b>67</b>	grande, mucosa, blanca	Bacilos, Gram +	Positivo
<b>74B</b>	pequeña, esférica, crema	Cocos, Gram +	Negativo
<b>79B</b>	pequeña, esférica, blanca	Cocos, Gram +	Negativo
<b>87B</b>	pequeña, mucosa, transparente	Bacilo, Gram -	Positivo
<b>92A,92B,93</b>	pequeña, punta de alfiler, crema	Bacilos, Gram +	Positivo
<b>95</b>	pequeña, mucosa, transparente	Bacilos, Gram -	Negativo
<b>96</b>	esférica, amarilla	Bacilos, Gram +	Positivo
<b>97,106A1</b>	Salmón	Cocos, Gram +	Positivo
<b>107,108,109,110A y 111A</b>	grande, esférica, blanca	Cocos, Gram +	Positivo
<b>111B,112,113A</b>	esférica, mucosa, naranja	Cocos, Gram +	Positivo
<b>113B, 114</b>	esférica, mucosa, naranja	Bacilos, Gram +	Positivo
<b>115</b>	esférica, mucosa, naranja	Bacilos, Gram +	Positivo
<b>116</b>	bordes irregulares, mucosa, amarilla	Bacilos, Gram-	Positivo
<b>117</b>	bordes irregulares, mucosa, amarilla	Bacilos, Gram -	Positivo
<b>118</b>	bordes irregulares, mucosa, amarilla	Bacilos, Gram -	Positivo
<b>119</b>	circular, centro blanco	Bacilos, Gram -	Positivo
<b>120</b>	irregular, amarilla	Bacilos, Gram -	Positivo
<b>122</b>	esférica, mucosa, amarilla	Bacilos, Gram +	Positivo
<b>136,137</b>	pequeña, esférica, amarilla	Bacilos, Gram +	Positivo
<b>138</b>	esférica, amarilla	Cocos, Gram +	Positivo
<b>153,154,155,157</b>	pequeña, blanca	Bacilos, Gram +	Negativo
<b>160A,160B, 161</b>	punta alfiler, blanca	Bacilos, Gram -	Positivo
<b>167B,168</b>	grande, irregular	Bacilos, Gram +	Positivo
<b>170A</b>	crema, bordes irregulares	Bacilos, Gram +	Positivo
<b>171,172</b>	grande, esférica, blanca	Cocos, Gram +	Negativo
<b>178A</b>	Crema	Bacilos, Gram +	Positivo
<b>181</b>	pequeña, esférica, amarilla	Bacilos, Gram +	Positivo
<b>183</b>	amarilla cremosa	Bacilos, Gram +	Positivo
<b>184,185,186</b>	grande, esférica, blanca	Cocos, Gram +	Positivo
<b>187</b>	pequeña, rosada	Cocos, Gram +	Positivo
<b>189</b>	bordes irregulares, mucosa, amarilla	Bacilos, Gram -	Positivo

\* En negrita el aislamiento seleccionado representativo del grupo que finalmente se identificó (n=33)

### Identificación molecular de los aislamientos

Para realizar la identificación molecular de los 33 aislamientos, primeramente, se verificó la concentración y pureza de los ADN, mediante espectrofotometría NanoDrop (Thermo Scientific). La integridad y la calidad se comprobó en geles de agarosa al 1 % (Tabla S2 en Anexo).

En todos los casos se logró amplificar una única banda de aproximadamente 1465 pb, correspondiente al tamaño esperado.



**Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % teñido con SYBR Safe (INVITROGEN, USA). Carril 1: marcador de peso molecular 1 kb plus (Fermentas, USA); carriles 2-8: amplificación del gen 16S ribosomal en los aislamientos de psicrotrofos (tamaño del amplicón aprox. de 1500 pb); carril 9: agua libre de ADN (control sin amplificación).

Una vez obtenidas y procesadas las secuencias, se analizaron utilizando BLASTn para comparar con la base de datos de secuencias de GenBank. Los 33 aislamientos finalmente identificados con género y/o especie, porcentaje de cobertura e identidad y número de acceso al Genbank (Tabla 4).

La diversidad de las especies de psicrotrofos se ilustra en la Figura 4

### Detección del gen *aprX*

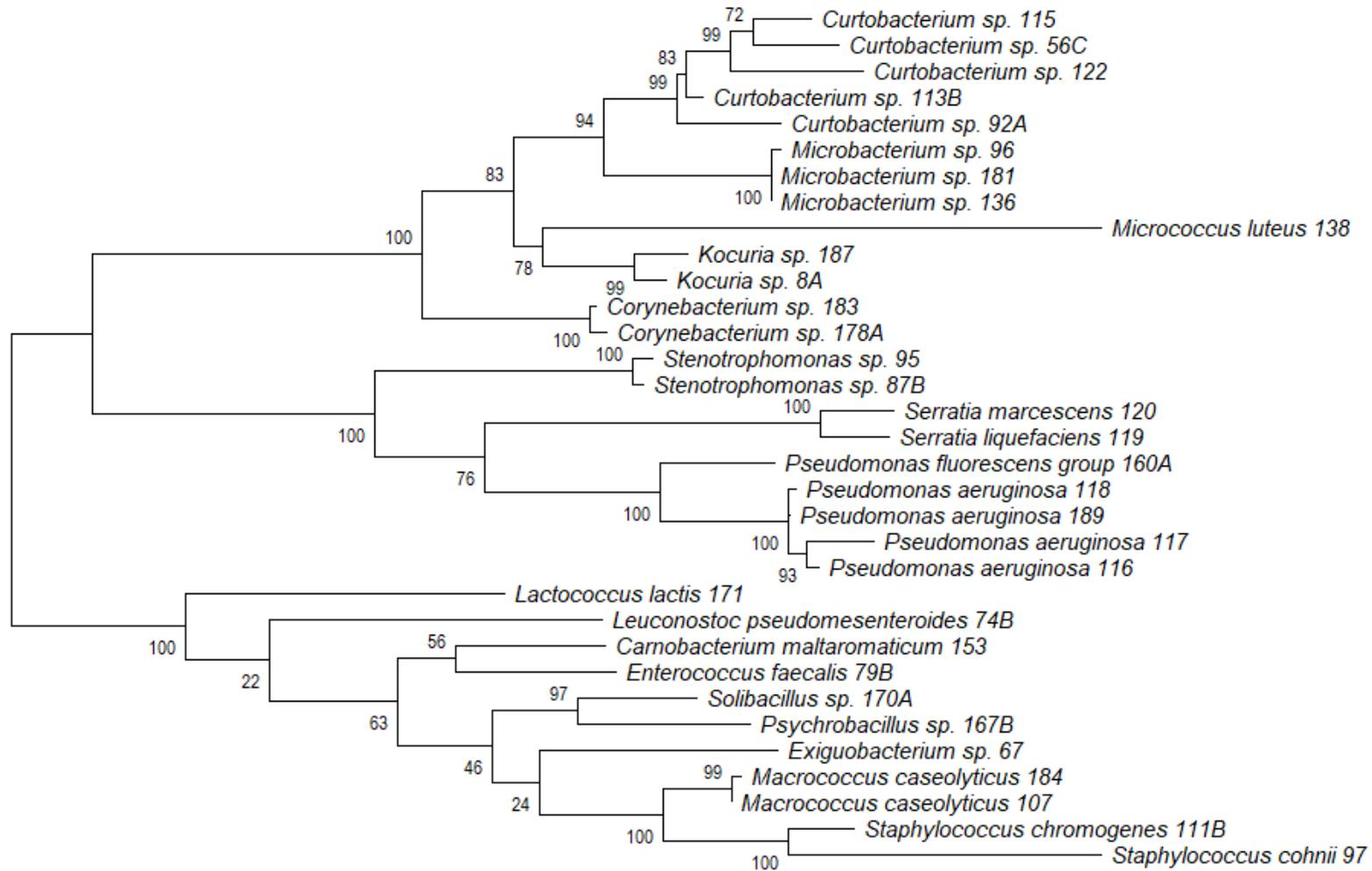
El gen *aprX* solo fue detectado en la cepa de *Pseudomonas fluorescens* (160A). La identidad de la secuencia con dicho gen fue confirmada mediante BLAST. En la figura 5, se ilustran las relaciones filogenéticas obtenidas a partir de la secuencia del gen *aprX* de esta cepa y de cepas de referencia. En la misma se observa que las cepas con mayor similitud de secuencia se limitan a las especies *P. fluorescens* (mayoritariamente), *P. synxantha*, *P. salmasensis* y *P. libanensis*.

**Tabla 4.** Identificación de los aislamientos mediante secuenciación del gen ribosomal 16S. Resultados del alineamiento mediante Blastn en la base datos de Genbank.

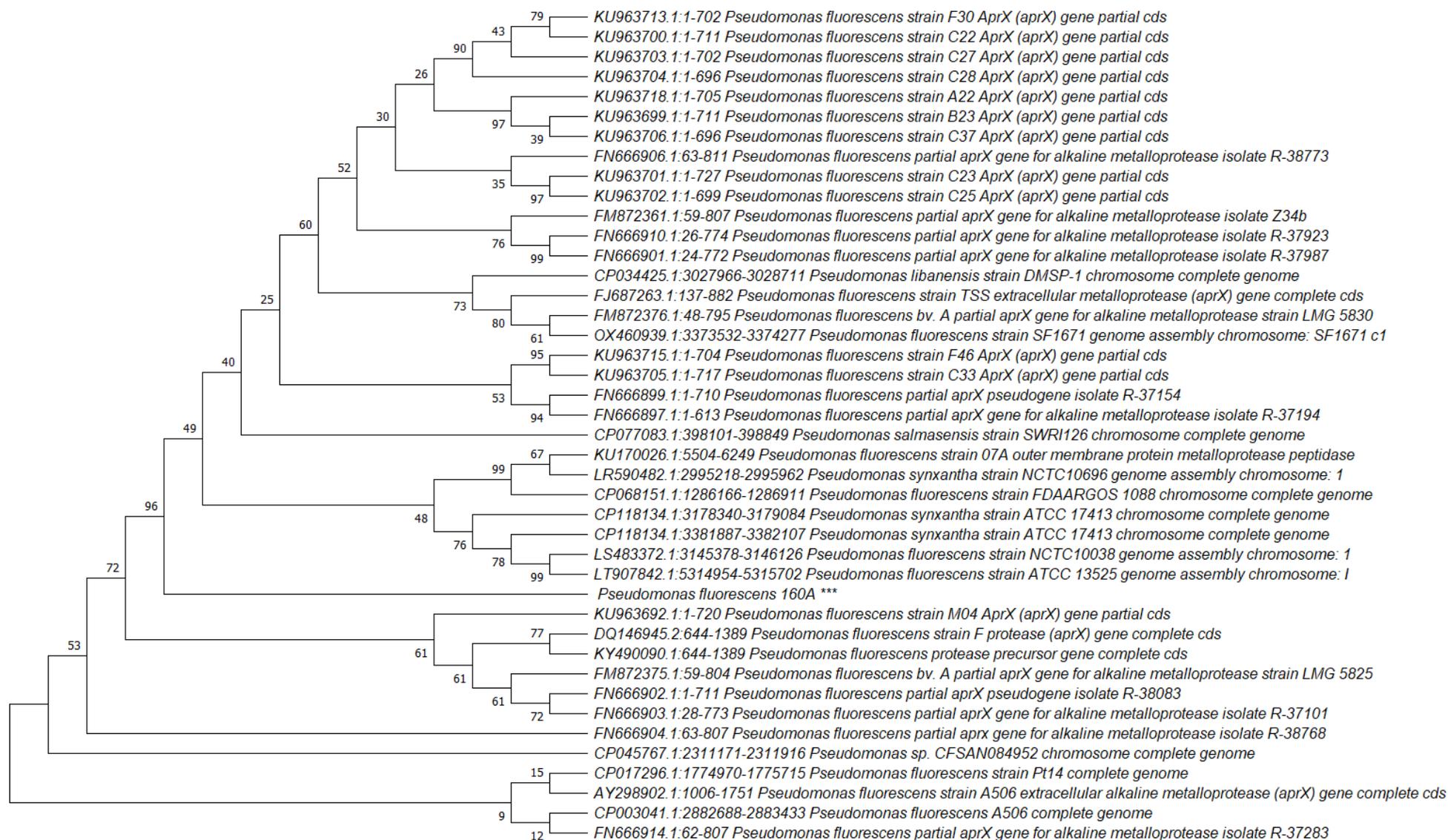
<b>Código de aislamiento</b>	<b>Tamaño del amplicón (pb)</b>	<b>Género y especie*</b>	<b>Cobertura (%)</b>	<b>Identidad (%)</b>	<b>N° acceso Genbank</b>
8A	1296	<i>Kocuria</i> sp. ( <i>K. salsicia</i> , <i>K. varians</i> , <i>K. rhizophila</i> )	100	99,69	LN589841.1
56C	1179	<i>Curtobacterium</i> sp. ( <i>C.flaccumfacie</i> , <i>C.pusillum</i> , <i>C. allii</i> )	100	96,1	HQ256794.1
67	1378	<i>Exiguobacterium</i> sp. ( <i>E. undae</i> )	99	99,93	JQ977690.1
74B	1336	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	100	100	MF354834.1
79B	1418	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	99,93	CP100596.1
87B	1386	<i>Stenotrophomonas</i> sp. ( <i>S. rhizophila</i> , <i>S. bentonitica</i> )	100	99,71	JF900084.1
92A	1217	<i>Curtobacterium</i> sp. ( <i>C.pusillum</i> )	100	100	MT505089.1
95	1292	<i>Stenotrophomonas</i> sp. ( <i>S. rhizophila</i> , <i>S. maltophilia</i> )	100	99,38	MH127809.1
96	1314	<i>Microbacterium</i> sp. ( <i>M. oxydans</i> , <i>M. maritypicum</i> , <i>M. saperdae</i> )	100	99,32	MT533951.1
97	1418	<i>Staphylococcus cohnii</i>	93	94,22	MK482636.1
107	1361	<i>Macrococcus caseolyticus</i>	100	99,85	MG722794.1
111B	1415	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	100	99,29	MT072170.1
113B	1117	<i>Curtobacterium</i> sp. ( <i>C.flaccumfacie</i> , <i>C.pusillum</i> )	100	99,9	CP081964.1
115	1189	<i>Curtobacterium</i> sp. ( <i>C.flaccumfacie</i> , <i>C.pusillum</i> )	100	96,4	CP081964.1
116	1373	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	99,05	CP095923.1
117	1331	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	97,09	CP095770.1
118	1195	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	99,83	CP097383.1

119	1229	<i>Serratia liquefaciens</i>	99	99,7	MT279350.1
120	1386	<i>Serratia marcescens</i>	100	99,86	CP053572.1
122	1290	<i>Curtobacterium</i> sp. ( <i>C.flaccumfacie</i> , <i>C.pusillum</i> )	100	94,96	CP081964.1
136	1367	<i>Microbacterium</i> sp. ( <i>M. oxydans</i> , <i>M. maritypicum</i> , <i>M. saperdae</i> <i>M. liquefaciens</i> )	100	99,93	MT533951.1
138	1128	<i>Micrococcus luteus</i>	89,53	75	LR897842.1
153	1378	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	100	99,85	MT631976.1
160A	1388	<i>Pseudomonas fluorescens</i> group ( <i>P. azotoformans</i> , <i>P. synxanta</i> , <i>P. fluorescens</i> )	100	99,43	MN594835.1
167B	1403	<i>Psychrobacillus</i> sp. ( <i>P. psychrodurans</i> )	100	99,22	JQ337293.1
170A	1375	<i>Solibacillus</i> sp. ( <i>S.silvestris</i> , <i>S. isronensis</i> )	100	99,42	MH712078.1
171	1404	<i>Lactococcus lactis</i>	100	99,86	GQ337877.1
178A	1284	<i>Corynebacterium</i> sp.	100	99,45	MK104475.1
181	1333	<i>Microbacterium</i> sp. ( <i>M. oxydans</i> , <i>M. maritypicum</i> , <i>M. saperdae</i> )	100	100	MT533951.1
183	1261	<i>Corynebacterium</i> sp. ( <i>C. efficiens</i> )	100	99,68	X89005.1
184	1409	<i>Macrococcus caseolyticus</i>	100	99,79	KJ783380.1
187	1182	<i>Kocuria</i> sp. ( <i>K. gwangalliensis</i> , <i>K. carniphila</i> )	100	99,32	KR085939.1
189	1390	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	99,93	ON799394.1

\*Entre paréntesis se indican la o las especies posibles con los scores más altos. pb= pares de bases.



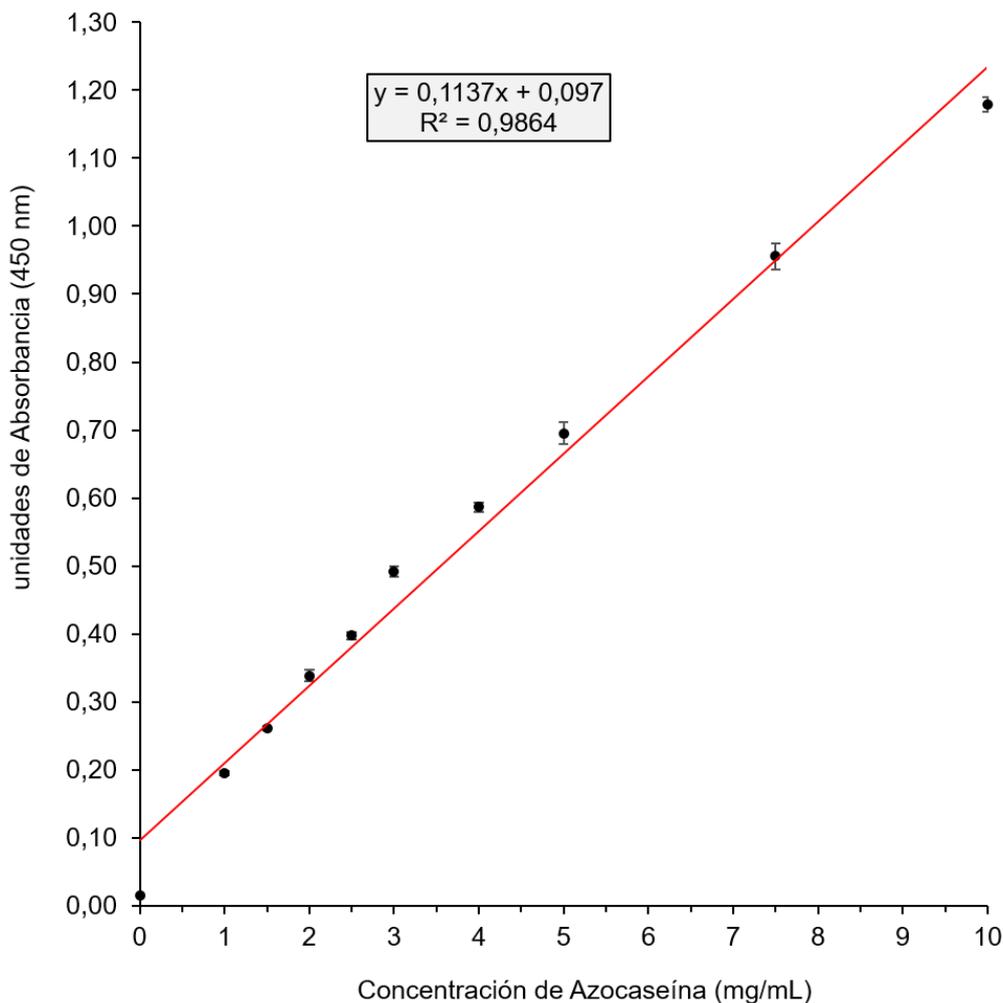
**Figura 4.** Relaciones filogenéticas entre las cepas de psicrótrofos (n=33) basado en las secuencias del gen ribosomal 16S. Las secuencias alineadas se analizaron con el método de Máxima Verosimilitud y los valores del bootstrap (1000 réplicas), utilizando un modelo de sustitución de Kimura de 2 parámetros.



**Figura 5.** Relaciones filogenéticas entre la cepa candidata de *Pseudomonas fluorescens* (160A) y cepas de referencia, basados en la secuencia del gen *aprX*. Las secuencias alineadas se analizaron con el método de Máxima Verosimilitud y los valores del bootstrap (1000 réplicas), utilizando un modelo de sustitución de Kimura de 2 parámetros.

### Curva de azocaseína

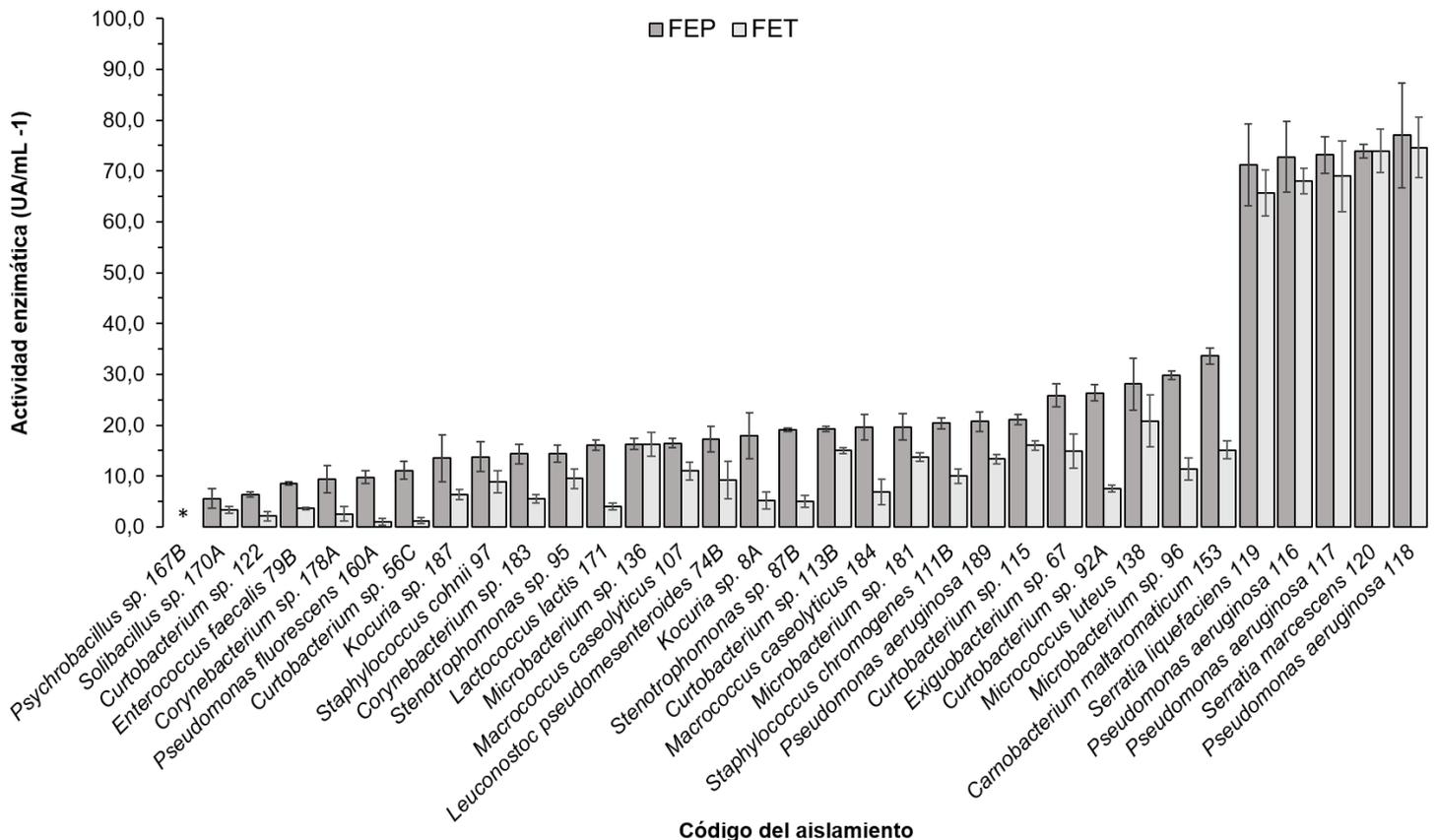
Se determinó la concentración de azocaseína para la cuantificación de la actividad enzimática, se elaboró una curva estándar que se muestra en la Figura 6. Se observó una relación lineal entre la absorbancia y la concentración de azocaseína con un alto coeficiente de correlación. La concentración de 10 mg/ml de azocaseína fue seleccionada para los siguientes ensayos de cuantificación.



**Figura 6.** Curva estándar elaborada con concentraciones en un rango de 0 a 1%, utilizando una proteasa comercial de *Streptomyces griseus* a 37 °C por 30 min, midiendo la absorbancia a 450 nm longitud de onda.

### Cuantificación de la actividad enzimática

En este estudio se cuantificó la actividad enzimática en las fracciones primaria (FEP) y en la tratada térmicamente (FET) de los 33 aislamientos de bacterias psicrótrofas. En la Figura 7 se ilustran los resultados obtenidos. *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* y *Serratia liquefaciens* se destacaron por su mayor producción de enzimas y termoestabilidad.



**Figura 7.** Cuantificación de la actividad enzimática (UA/mL-1) en aislamientos de psicrotrofos cultivados en leche a 30° C por 72 h. Actividad en las fracciones enzimáticas: ■ primaria (FEP- sin tratamiento térmico) y ■ termoestable (FET- 63,5° C por 30 min). Unidad actividad de proteasa (UA) = incremento en 0,01 unidades de absorbancia a 420 nm. \* = sin detección de actividad.

### Coagulación de la leche comercial

En el presente trabajo, se evaluó la capacidad de coagulación de las fracciones enzimáticas (FEP y FET) sobre la leche comercial entera y descremada incubada a 7 y 30 °C. Observamos que 12/33 aislamientos (36,4%) coagularon la leche entera mientras que 11/33 aislamientos (33,3%) coagularon la leche descremada. En las Tablas 5 y 6, se observan los aislamientos que mostraron distintos grados de coagulación: inicial, parcial y total. El resto de los aislamientos no coaguló la leche en ningún grado durante el período de tiempo estudiado.

**Tabla 5.** Tiempo de coagulación de la leche entera comercial producido por las fracciones enzimáticas primaria y tratada térmicamente (FEP y FET) de los aislamientos de psicrótrofos (n=12, aislamientos que mostraron capacidad de coagular en algún grado) incubadas a 7 y 30 °C.

		Tiempo de observación (horas)													
		2	12	24	48	72	96	120	2	12	24	48	72	96	120
		7° C						30° C							
<i>E. faecalis</i> 79B	FEP	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	++	+++	+++	+++
	FET	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
<i>Exiguobacterium</i> sp. 67	FEP	---	---	---	---	---	---	---	---	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	FET	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
<i>M. caseolyticus</i> 184	FEP	---	+-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	FET	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
<i>Microbacterium</i> sp. 96	FEP	---	---	---	---	---	+-	+-	---	---	---	---	+-	+++	+++
	FET	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	+-	+++	+++
<i>P. aeruginosa</i> 116	FEP	---	---	---	---	---	---	---	---	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	FET	---	---	---	---	---	---	---	---	+-	+-	+-	+-	+++	+++
<i>P. aeruginosa</i> 117	FEP	---	---	---	---	---	---	---	---	+-	+++	+++	+++	+++	+++
	FET	---	---	---	---	---	---	---	---	---	+-	+++	+++	+++	+++
<i>P. aeruginosa</i> 118	FEP	---	---	---	---	---	---	---	---	+-	+++	+++	+++	+++	+++
	FET	---	---	---	---	---	---	---	---	+-	+++	+++	+++	+++	+++
<i>P. aeruginosa</i> 189	FEP	---	---	---	---	---	---	---	+-	+-	+++	+++	+++	+++	+++
	FET	---	---	---	---	---	---	---	---	---	+-	+++	+++	+++	+++
<i>S. chromogenes</i> 111B	FEP	---	+-	+-	+++	+++	+++	+++	+-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	FET	---	---	---	---	---	---	---	---	---	+-	+++	+++	+++	+++
<i>S. liquefaciens</i> 119	FEP	---	---	---	+-	+++	+++	+++	+-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	FET	---	---	---	+-	+-	+++	+++	+-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>S. marcenscens</i> 120	FEP	---	+-	+-	+++	+++	+++	+++	+-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	FET	---	---	---	+++	+++	+++	+++	+-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Stenotrophomonas</i> sp. 95	FEP	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	+-	+++	+++
	FET	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Control Positivo		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Control Negativo		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

FET: fracción enzimática tratada térmicamente; FEP: fracción enzimática primaria; sin coagulación (- - -), coagulación inicial (+ - -), coagulación parcial (+ + -), coagulación total (+++).

Control Positivo: quimosina comercial.

Control negativo: leche sin inoculación de enzima.

**Tabla 6.** Tiempo de coagulación de la leche descremada comercial producido por las fracciones enzimáticas primaria y tratada térmicamente (FEP y FET) de los aislamientos de psicrótrofos (n=11, aislamientos que mostraron capacidad de coagular en algún grado) incubadas a 7 y 30 °C.

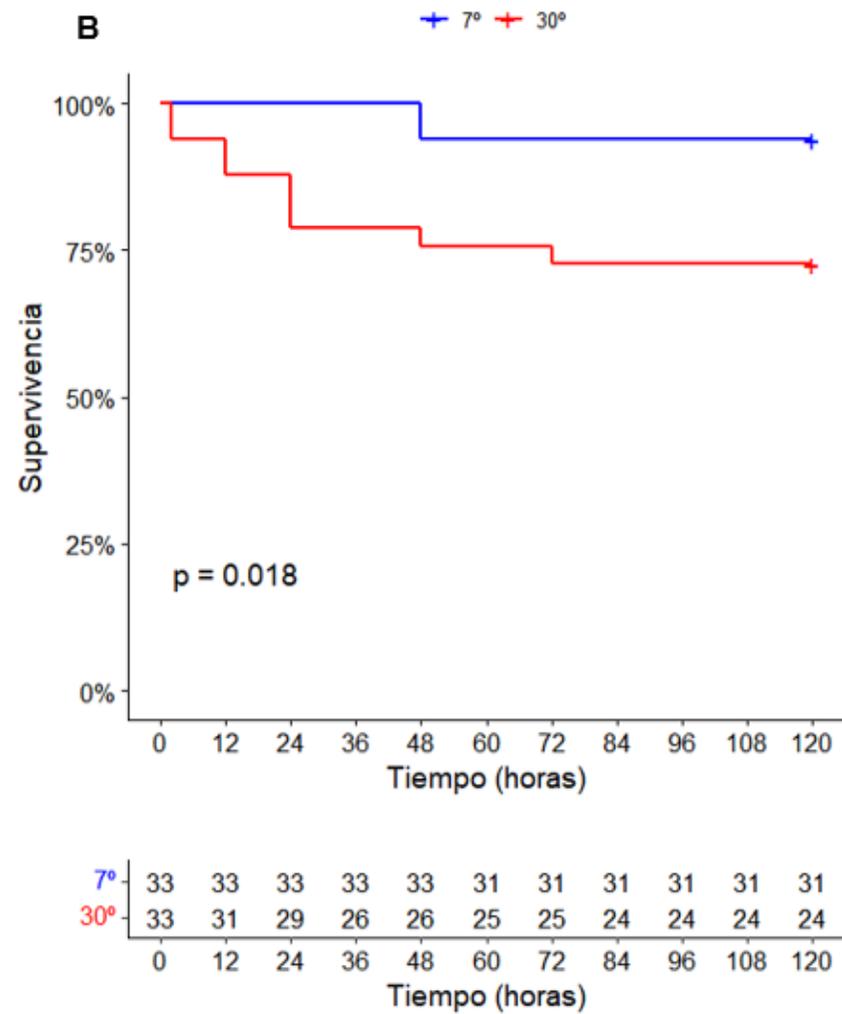
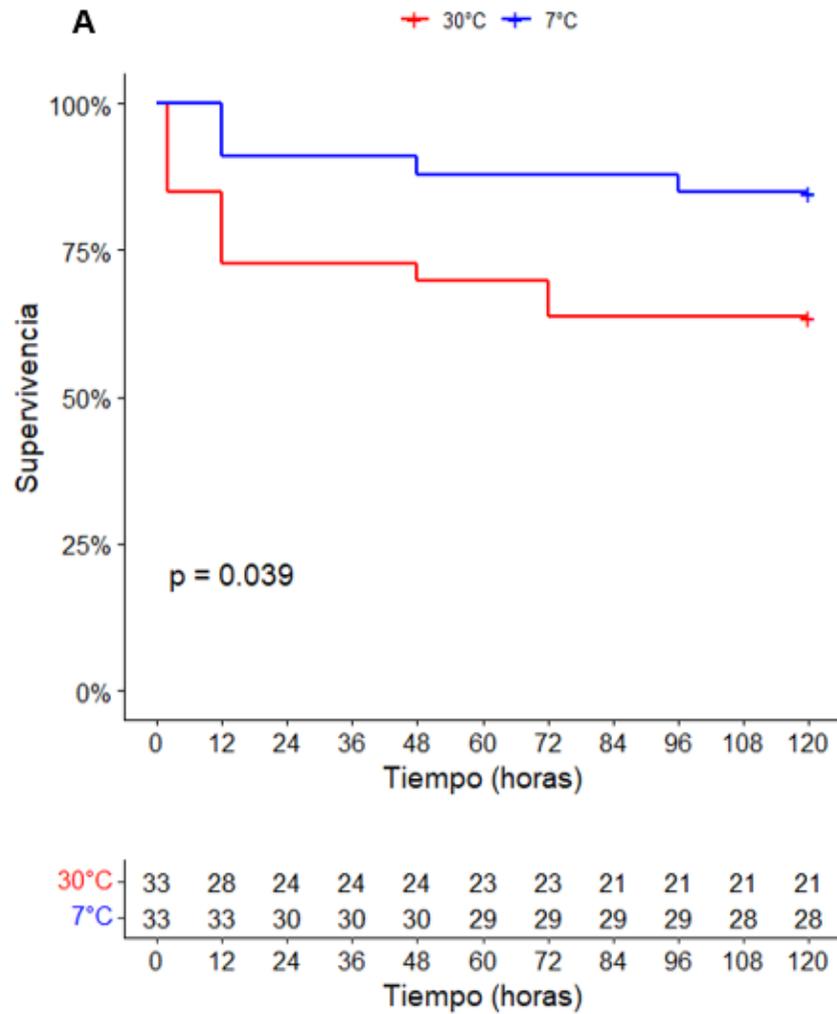
		Tiempo de observación (horas)													
		2	12	24	48	72	96	120	2	12	24	48	72	96	120
		7° C						30° C							
<i>E. faecalis</i> 79B	FEP	--	--	--	--	--	--	--	--	--	+++	+++	+++	+++	
	FET	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
<i>Exiguobacterium</i> sp. 67	FEP	--	--	--	--	--	--	--	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	FET	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
<i>M. caseolyticus</i> 184	FEP	--	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	FET	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
<i>P. aeruginosa</i> 116	FEP	--	--	--	--	--	--	--	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	FET	--	--	--	--	--	--	--	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
<i>P. aeruginosa</i> 117	FEP	--	--	--	--	--	--	--	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	FET	--	--	--	--	--	--	--	--	+-	+++	+++	+++	+++	
<i>P. aeruginosa</i> 118	FEP	--	--	--	--	--	--	--	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	FET	--	--	--	--	--	--	--	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
<i>P. aeruginosa</i> 189	FEP	--	--	--	--	--	--	--	--	+++	+++	+++	+++	+++	
	FET	--	--	--	--	--	--	--	--	--	+++	+++	+++	+++	
<i>S. chromogenes</i> 111B	FEP	--	+-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	FET	--	--	--	--	--	--	--	--	+++	+++	+++	+++	+++	
<i>S. liquefaciens</i> 119	FEP	--	--	--	--	+-	+++	+-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	FET	--	--	--	--	+-	+++	+-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
<i>S. marcenscens</i> 120	FEP	--	--	++	+++	+++	+++	+-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	FET	--	--	--	++	+++	+++	+-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
<i>Stenotrophomonas</i> sp 95	FEP	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	+++	+++	+++	
	FET	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
Control Positivo		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
Control Negativo		--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	

FET: fracción enzimática tratada térmicamente; FEP: fracción enzimática primaria; sin coagulación (- - -), coagulación inicial (+ - -), coagulación parcial (+ + -), coagulación total (+++).

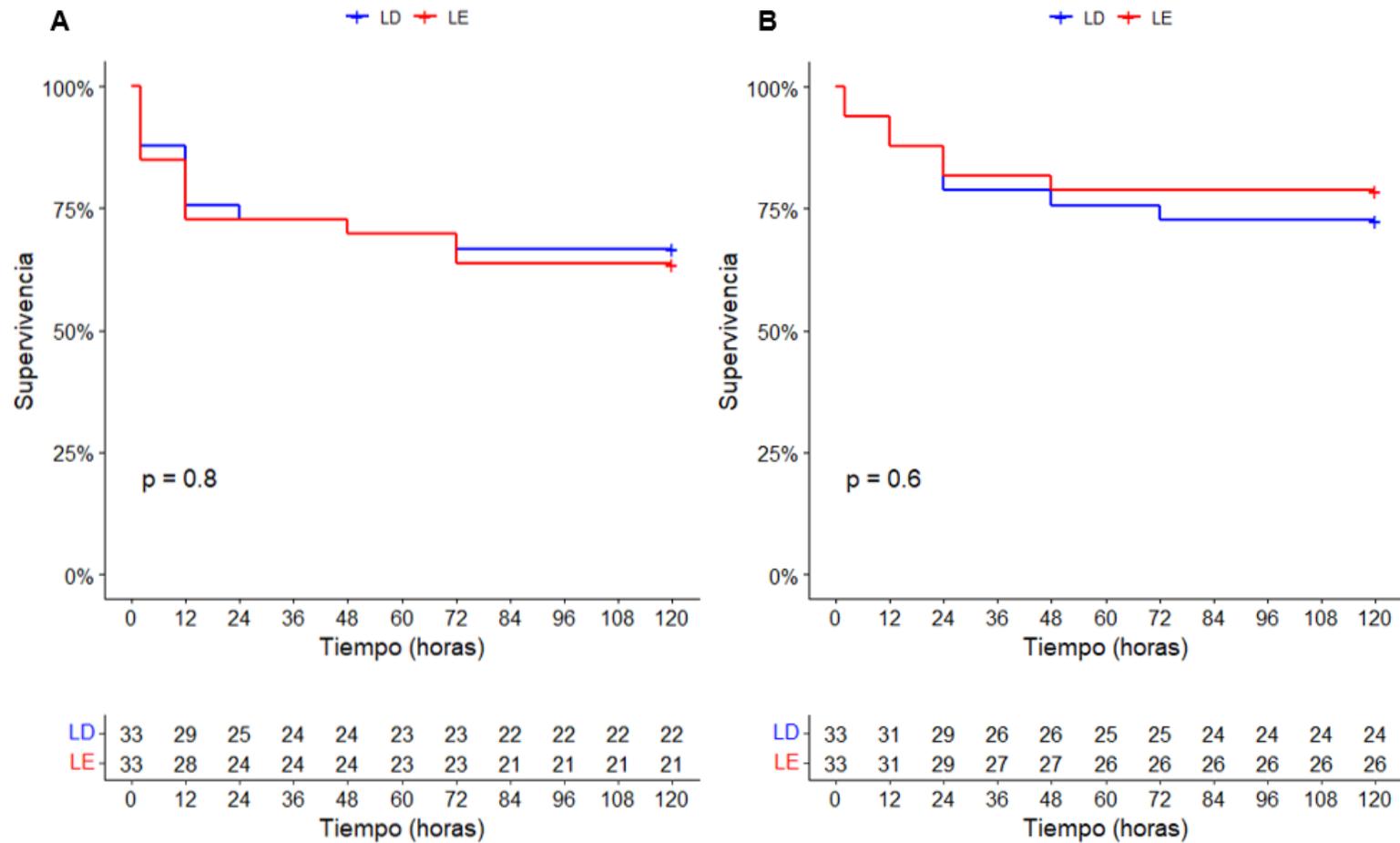
Control Positivo: quimosina comercial.

Control negativo: leche sin inoculación de enzima.

Al analizar las fracciones enzimáticas de las 33 cepas existieron diferencias significativas en la coagulación de la leche entera cuando se incubó a 7 o 30 °C tanto en la FEP como en la FET (Figura 8). No se observaron diferencias entre la capacidad de coagulación de la leche descremada y entera incubada 30 °C en ninguna de las fracciones, como se observa en la Figura 9.



**Figura 8.** Análisis de supervivencia según tiempo de coagulación de la leche de los 33 aislamientos de bacterias psicrótrofas en leche entera, a dos temperaturas: 30°C y 7°C, con FEP (A) y FET (B).

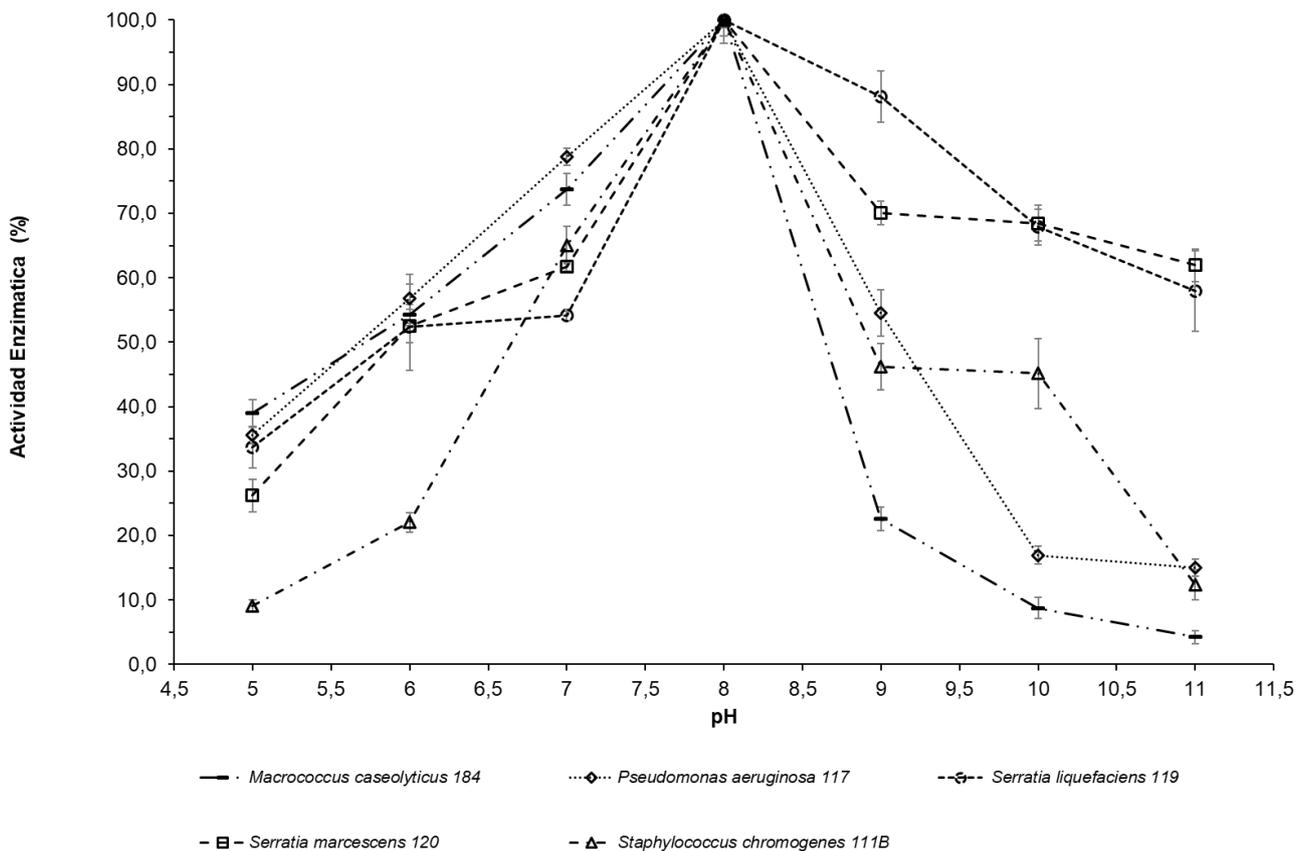


**Figura 9.** Análisis de supervivencia según tiempo de coagulación de la leche de los 33 aislamientos de bacterias psicrótrofas en leche entera y leche descremada, con FEP y FET a 30 °C.

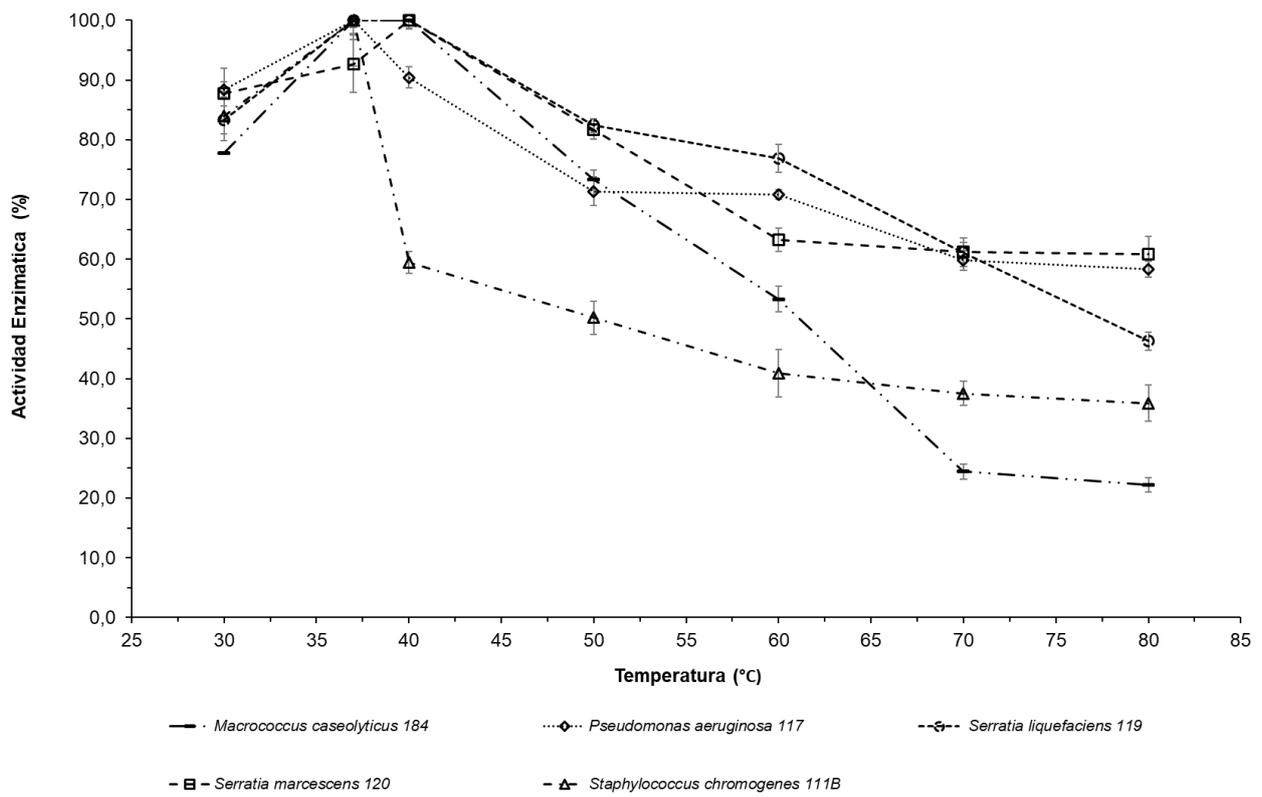
\*LD: Leche descremada; LE: Leche entera

### Caracterización de la estabilidad enzimática

Se seleccionaron los aislamientos con mayor producción de enzima (*Pseudomonas aeruginosa* 117, *Serratia liquefaciens* 119 y *Serratia marcescens* 120), adicionalmente se estudiaron 2 aislamientos que coagularon la leche comercial a temperatura de refrigeración (*M. caseolyticus* 184 y *S. chromogenes* 111B). Las enzimas producidas por los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* y *Serratia liquefaciens* mostraron actividad residual en un rango más amplio de pH, así como también elevada estabilidad térmica (actividad remanente  $\geq 50\%$  a  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 min), (figuras 10 y 11).



**Figura 10.** Efecto del pH sobre la actividad proteolítica del FEP de los 5 aislamientos seleccionadas. Los resultados se expresan en % de actividad enzimática.



**Figura 11.** Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad proteolítica de los FEP. Los resultados se expresan en % de actividad enzimática.

## DISCUSIÓN

El presente trabajo se diseñó para caracterizar la producción de enzimas proteolíticas termoestables producidas por bacterias psicrótrofas aisladas de leche cruda de tanque de tambos de la región litoral norte del Uruguay. En nuestro país el enfoque en la temática se ha centrado en conocer el número de bacterias psicrótrofas e identificar fenotípicamente algunos de los géneros, principalmente especies de *Pseudomonas* spp. (Bermúdez, Moreno, González y Reginensi, 2011; Camarotte, 2013; Grille, 2016; Olmos, 2014). Este trabajo resulta novedoso, ya que incluye la identificación molecular de todos los aislamientos que presentaron actividad proteolítica de un cepario robusto (n=167) que abarca muestras de 4 tambos a lo largo de 1 año. Así mismo, se cuantificó la producción de enzimas termoestables de cada aislamiento y su capacidad de coagulación sobre la leche comercial. Por último, en aquellas cepas con mayor título de enzimas y/o capaces de coagular en temperaturas de refrigeración, se profundizó en el conocimiento de las características de las enzimas producidas evaluando el pH y temperatura óptima.

En Uruguay, en 1995 se crea el Sistema Nacional de Calidad de la Leche. Actualmente se establecen valores máximos de recuento de células somáticas y recuento bacteriano. Sin embargo, no hay valores fijados en cuanto al recuento de bacterias psicrótrofas (Uruguay, 2016). En algunos países el recuento de psicrótrofos se utiliza como complemento para determinar la calidad de la leche y es requerido principalmente cuando la leche va a ser sometida a procesos tecnológicos específicos (Grille, 2016).

El límite establecido por la Unión Europea para leche de alta calidad es  $<5 \times 10^3$  UFC/mL para bacterias psicrótrofas (Samaržija, et al., 2017). Además, recuentos de bacterias psicrótrofas en el orden de  $10^6$  y  $10^7$  UFC/mL en la leche cruda aumentan la posibilidad de contener enzimas hidrolíticas extracelulares, suficientes para que se produzca proteólisis y cambios organolépticos en el producto, por lo que no sería recomendable elaborar productos lácteos a partir de esta (Barros Leal Nörnberg, Tondo y Brandelli, 2009, Camarotte, 2013, de Oliveira, Lopes Martins, Dantas Vanetti, 2006).

En el presente estudio, el 33% de los aislamientos psicrótrofos (55/167) mostraron actividad proteolítica en agar leche a 30°C. Comparando con otras investigaciones de la región, nuestro resultado es similar a lo reportado por Molineri et al., (2009), que en establecimientos lecheros de Argentina tuvo una media de recuentos de psicrótrofos de  $6,67 \times 10^4$  UFC/mL y una media de recuento de psicrótrofos proteolíticos de  $2,72 \times 10^4$  UFC/mL, representando así el 40 % del recuento de psicrótrofos totales. Sin embargo, otros estudios indican un mayor porcentaje de aislamientos proteolíticos cercanos al 50% (Barros Leal Nörnberg et al., 2009; Lampugnani, Zanatta, Maziero, Nero y dos Santos, 2019; Munsch-Alatossava y Alatossava, 2006).

Desde un punto de vista práctico, los psicrótrofos pueden clasificarse en distintos grupos según su posible origen o tipo de microorganismo. En relación con las especies identificadas en nuestro trabajo, 79% de los aislamientos son de origen ambiental (55% Gram positivos y 24% Gram negativos), 12% pertenecen al grupo de las bacterias ácido-lácticas (BAL) y finalmente el 9% son de origen comensal.

Los aislamientos de origen ambiental Gram positivos, estuvieron representados por los siguientes géneros/especies en orden de frecuencia: *Curtobacterium spp.* (14,5%), *Macrococcus caseolyticus* (14,5%), *Kocuria spp.* (7%), *Microbacterium spp.* (7%), *Psychrobacillus spp.* (3%), *Corynebacterium spp.* (3%), *Exiguobacterium spp.* (2%), *Micrococcus luteus* (2%) y *Solibacillus spp.* (2%). Según la literatura, la principal fuente de contaminación de la leche cruda con microorganismos psicrótrofos, es de origen ambiental, ya sea por microorganismos del agua, suelo, aire, provenientes de la alimentación de los animales o por utensilios que se emplean en el ordeño y superficies que contactan con la leche (Frazier y Westhoff, 1993; Velázquez-Ordoñez et al., 2019; Verdier-Metz et al., 2012). Esta última fuente, aportaría una baja cantidad de bacterias contaminantes a la leche cuando se aplican buenas prácticas de higiene durante la cadena productiva (Frazier y Westhoff, 1993). En este sentido, se ha reportado que, en la leche obtenida bajo condiciones de higiene, menos del 10 % de los microorganismos totales son psicrótrofos. Por el contrario, cuando no se contemplan medidas higiénicas su valor asciende al 75% de la carga microbiana total (Signorini et al., 2003).

En cuanto a las especies de psicrótrofos aislados, la mayoría han sido reportadas anteriormente como parte de la microbiota psicrótrofa cultivable de la leche (Hantsis-Zacharov y Halpern, 2007; Patil 2019; Weber, Geißert, Kruse y Lipski, 2014), cuajada y quesos (Alegría et al., 2009; Alessandria et al., 2010; Giannino, Marzotto, Dellaglio y Feligini, 2009). Además, especies como *Macrococcus caseolyticus*, *Curtobacterium spp.* y *Bacillus spp.* forman parte de la microbiota Gram positiva deteriorante de la leche cruda almacenada a 4 °C, debido a la producción de enzimas proteolíticas y lipolíticas (Giannino et al., 2009; Kuddus y Ramteke, 2008; Ntuli et al., 2022; Velázquez-Ordoñez et al., 2019).

Por otra parte, el enfriamiento rápido de la leche cruda y su almacenamiento durante periodos prolongados a temperatura de refrigeración modifican los equilibrios entre las distintas poblaciones de especies de la leche de tanque. De acuerdo con Montel et al., (2014) tras la refrigeración a 4 °C durante al menos 70 h, la dominancia en las poblaciones de leche del tanque cambia de bacterias Gram positivas (*Macrococcus*) a bacterias Gram negativas (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*). En este sentido, numerosos estudios señalan que la refrigeración sostenida crea condiciones selectivas para el crecimiento de bacterias Gram negativas, especialmente *Pseudomonas spp.* (Barbano, Ma y Santos, 2006; De Jonghe et al., 2010; Fricker, Skånseng, Rudi, Stessl y Ehling-Schulz, 2011; Martins, Pinto, Rocha, De Araujo y Vanetti, 2006; Raats et al., 2011; Rasolof, St-Gelais, LaPointe y Roy, 2010; Stoeckel et al., 2016). En este trabajo, los Gram negativos ocuparon el segundo lugar del total de los aislamientos, con el género *Pseudomonas spp.* aislado con mayor frecuencia (12,8 %), representado por las especies *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* (7,3 y 5,5 % respectivamente). Algunos estudios señalan al género *Pseudomonas spp.* como predominante dentro de los Gram negativos (Camarotte, 2013; Decimo et al., 2014), incluso como especie dominante en la microbiota total de la leche cruda cuando es refrigerada (Decimo et al., 2014). Resultados similares son reportados en nuestro país por Camarotte (2013), quienes evaluaron un cepario de 200 aislamientos de psicrótrofos obtenidos de leche de tanque de tambos remitentes a industria del departamento de San José. Estos autores reportan al género *Pseudomonas spp.* como el microorganismo psicrótrofo predominante (63 %) y a la especie *P. fluorescens* como la dominante (56 %).

Otras especies identificadas correspondieron a *Serratia liquefaciens* (3,6 %), *Serratia marcescens* (3,6 %) y *Stenotrophomonas spp.* (3,6 %), concordando con otras publicaciones, quienes los reportan junto a *Pseudomonas spp.* como los principales psicrótrofos Gram negativos alterantes de la leche cruda refrigerada (Machado et al., 2017). Por lo tanto, evitar la contaminación exterior y extremar las medidas higiénicas durante el ordeño, es clave para minimizar su presencia en la leche.

Las bacterias lácticas representaron el 12,7 % de los aislamientos psicrótrofos proteolíticos, identificándose las especies de *Carnobacterium maltaromaticum* (7,3 %), *Lactococcus lactis* (1,8 %), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (1,8 %), y *Enterococcus faecalis* (1,8 %). Las BAL, que abarcan especies de *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium* y *Enterococcus*, son generalmente beneficiosas para los alimentos. Se utilizan para la fermentación de una variedad de materias primas, donde contribuyen al sabor, la textura y la vida útil. Sin embargo, algunas especies pueden desempeñar un papel importante en el deterioro y la descomposición de la leche y productos lácteos (Machado et al., 2017; Remenant, Jaffrès, Dousset, Pilet y Zagorec, 2015). Si bien su capacidad de crecimiento a temperaturas de refrigeración suele ser baja, muchos aislamientos pueden ser capaces de producir enzimas proteolíticas (Von Neubeck et al., 2015).

En relación a los microorganismos comensales, se identificaron las especies *Staphylococcus chromogenes* (5,5 %) y *Staphylococcus cohnii* (3,6 %). Durante el ordeño, la leche está expuesta a contaminarse con los microorganismos del propio animal que se encuentran en la piel de la ubre, pezón o material fecal (comensales). Además de ser considerado microorganismo comensal, *Staphylococcus chromogenes*, es uno de los principales estafilococos coagulasa negativo (SCN) aislados de mastitis de vacas lecheras, por lo que puede estar presente en leche de tanque (Cabral dos Santos, 2016). En tambos de nuestro país, esta especie junto a *S. haemolyticus* han sido reportadas como predominantes dentro de los SCN aislados de mastitis subclínicas (De los Santos et al., 2022).

En relación con la producción de enzimas proteolíticas, un 54,5 % de los aislamientos (18/33) produjeron enzimas termoestables a 30°C. El mayor título de producción de enzimas, entre 71-77 UA/mL<sup>-1</sup>, se observó en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (aislamientos 116,117 y 118) y *Serratia spp.* (aislamientos 119 y 120). En estos aislamientos, los títulos de actividad proteolítica luego del tratamiento de pasteurización (63, 5° C por 30 min) se mantuvieron entre un 92-100% respecto a su valor inicial, indicando la estabilidad térmica de las enzimas producidas. De acuerdo a lo descrito por Machado et al., (2017) *Pseudomonas* y *Serratia* poseen un marcado poder enzimático proteolítico. Muchos investigadores concuerdan que *Pseudomonas spp.* es el género principal relacionado al deterioro de la leche y productos lácteos y que *P. fluorescens* sería la principal especie entre otras (Boubendir, Serrazanetti, Hamidechi, Vannini y Guerzoni, 2016; Vithanage et al., 2016). En nuestro trabajo se observó un mayor número de aislamientos de *P. aeruginosa* que mostraron valores más elevados de producción enzimática que lo observado en *P. fluorescens*. En cuanto a la termoestabilidad de sus enzimas, diversos estudios señalan que *Pseudomonas* es el género que produce enzimas hidrolíticas termoestables más predominante aislado de leche cruda refrigerada (Boubendir et al., 2016; Vithanage et al., 2016). Algunas especies de *Serratia spp.*, como *S. liquefaciens* y *S. marcescens*,

también son conocidas como deteriorantes de la leche cruda por ser capaces de producir enzimas proteolíticas termoestables (Rabêlo et al., 2021).

Los aislamientos Gram positivos mostraron menores títulos de producción de enzimas proteolíticas que los Gram negativos ( $\leq 40$  UA/mL<sup>-1</sup>) la especie con mayor producción de enzimas fue la cepa de *Carnobacterium maltaromaticum*. Esta especie, pertenece al grupo de las BAL, su presencia en los productos lácteos ha resultado en un incremento de las investigaciones científicas dirigidas a conocer su ecología, rol y efectos en los alimentos. Por décadas, se ha hecho énfasis en su inclusión en el desarrollo de productos lácteos, debido a su posible influencia en las propiedades organolépticas, inocuidad alimentaria y control de patógenos alimentarios (Afzal et al., 2010). Si bien el género *Carnobacterium* tiene propiedades tecnológicas favorables, la producción de enzimas proteolíticas ha sido reportada como causante de defectos en la leche cruda y productos lácteos (Afzal et al., 2010). En este trabajo, también se observó la producción de enzimas proteolíticas de otras especies de BAL como *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, y *Enterococcus faecalis*. En general, todos los aislamientos de BAL produjeron bajo título de enzimas proteolíticas y mostraron reducida estabilidad frente al tratamiento de pasteurización (25-53% de actividad remanente) lo cual ha sido reportado en otros trabajos (Kieliszek, Pobiega, Piwowarek y Kot, 2021; Moussa et al., 2008).

En cuanto a las enzimas proteolíticas causantes de deterioro de la leche producidas por psicrótrofos, numerosas publicaciones señalan como principal la proteasa extracelular *AprX*, codificada en el gen con el mismo nombre. En el presente trabajo, el gen *aprX* se detectó únicamente en la cepa de *Pseudomonas fluorescens* (160A), quien mostró bajo título de actividad enzimática y una baja estabilidad térmica, lo que podría indicar la falta de expresión en las condiciones de ensayo. También es destacable que el gen no fue detectado en otras especies con mayor actividad enzimática, como *P. aeruginosa*, *S. marcescens* o *S. liquefaciens*. Resultados similares son reportados por otros investigadores, quienes utilizando los mismos cebadores detectaron el gen en *P. fluorescens*, pero no en *P. aeruginosa* y/o *S. marcescens* (Marchand et al., 2009; Morandi et al., 2021). En contraposición, Martins et al., (2005) utilizando otros cebadores reportan la presencia del gen *apr* en *P. aeruginosa* y *S. marcescens*. Estos resultados reflejan la variabilidad existente en la secuencia del gen *aprX* (Aguilera-Toro et al., 2023) e indican que los cebadores utilizados para la amplificación del gen *aprX* (SM2F/SM3R) estarían limitados a ciertas especies de *Pseudomonas* spp. como *P. fluorescens*. Adicionalmente se realizó la evaluación *in silico* de los cebadores (resultados no mostrados) confirmando que no amplificarían en *P. aeruginosa* y especies de *Serratia* spp. por lo que no descartamos la presencia del gen *aprX* en estos aislamientos.

En relación con la capacidad de las enzimas de coagular la leche, las proteasas producidas por psicrótrofos como *Pseudomonas* spp. hidrolizan la K-caseína a para-k-caseína y desestabilizan la micela de caseína, lo que a su vez provoca la coagulación de la leche. En la leche cruda, la k-caseína y la b-caseína son los componentes proteicos más susceptibles a la proteólisis bacteriana psicrótrófica (Teh et al., 2011). En nuestro trabajo 33-36 % de los aislamientos produjeron enzimas termoestables con capacidad para coagular la leche comercial según las condiciones de estudio. Existieron diferencias de acuerdo a la temperatura de incubación de la leche (30 °C vs 7 °C). Estas diferencias se explican porque un mayor número de

aislamientos (12/33) producen enzimas con actividad a 30° C, en tanto solo 5 de estos, también mostraron actividad a 7 °C, lo cual estaría relacionado con la temperatura óptima de actividad, particular de cada tipo de enzima (Button, Roginski, Deeth y Craven, 2011). Otros trabajos señalan las mismas diferencias en la actividad enzimática entre las mismas temperaturas de incubación (Decimo et al., 2014; Yuan et al 2018). Estos resultados sugieren que el almacenamiento de leche pasteurizada a bajas temperaturas, podría ser efectivo, pero solo hasta cierto punto, ya que una vez producidas las proteasas éstas mantienen actividad suficiente para coagular la leche. Entre los aislamientos productores de enzimas termoestables capaces de coagular la leche comercial a temperatura de refrigeración se encuentran *S. liquefaciens* 119 y *S. marcescens* 120. Ambos produjeron la coagulación total de la leche entre las 48-72 h de almacenamiento. En las últimas décadas, el género *Serratia*, en especial *S. liquefaciens*, ha ganado interés en relación a su capacidad de producir proteasas termoestables. Es frecuentemente aislado en plantas lácteas, muestras de leche cruda almacenada a 4 °C y en tanques de almacenamiento de leche a granel (Decimo, et al.,2014; Machado et al., 2015; Teh et al., 2011). Estudios realizados en Brasil reportan que *S. liquefaciens* fue la especie más frecuentemente aislada en la leche cruda, con capacidad de secretar proteasas termoestables (Machado et al., 2015; Machado et al.,2016). Otros aislamientos presentaron enzimas capaces de coagular la leche comercial a temperatura de refrigeración, *M. caseolyticus* 184, *Microbacterium* sp. 96 y *S. chromogenes* 111B. Sin embargo, la actividad enzimática residual luego del tratamiento térmico no fue suficiente para coagular la leche comercial.

La presencia de materia grasa en la leche no influyó sobre la capacidad coagulativa de las enzimas en ninguna de las temperaturas evaluadas. En contraposición, Zhang et al., (2020) reportan que la grasa presente en la leche entera puede inducir la actividad proteolítica de *Pseudomonas* spp. lo que representaría mayor vulnerabilidad de la leche entera sobre la leche descremada.

Caracterizar el espectro de actividad enzimática en cuanto a temperatura, pH y otras variables es importante para comprender el comportamiento de las enzimas potencialmente presentes en las muestras de leche (Bogo et al., 2017). En nuestro estudio se caracterizaron estas variables en 5 aislamientos, seleccionados en base a su mayor producción de enzimas y/o capacidad proteolítica coagulativa a temperatura de refrigeración. Los aislamientos corresponden a las especies *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*, *Macroccoccus caseolyticus* y *Staphylococcus chromogenes*. Las enzimas producidas por los cinco aislamientos mostraron mayor actividad enzimática a pH 8 y a temperatura de 37 °C. La naturaleza ligeramente alcalina de las enzimas producidas por los aislamientos podría indicar la producción de proteasas alcalinas. Resultados similares son reportados en varios estudios que caracterizaron la actividad proteolítica de *Pseudomonas* spp. e indican pH óptimos entre 7-9 y temperaturas óptimas de actividad entre 35- 45 °C, confirmando luego la producción de la metaloproteasa *Apr* (Bogo et al., 2017; Martins et al., 2005; Matéos et al. 2015; Raj et al. 2012; Zambare, Nilegaonkar y Kanekar, 2011).

La mayor actividad residual de las enzimas producidas por *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* y *Serratia liquefaciens* con un alto rango de pH, y elevada estabilidad térmica, coinciden con los rangos de actividad descritos para la metaloproteasa *AprX* en *Pseudomonas fluorescens*. En relación a las proteasas de

*Serratia* spp., se han descrito dos metaloproteasas extracelulares, *Ser1* y *Ser2*, pertenecientes a la familia de las serralisinas (Kaibara et al., 2012). En cuanto a *Ser2* se ha reportado su amplio rango de actividad, capacidad de resistir el tratamiento térmico UHT, hidrolizar la caseína y provocar la desestabilización de la leche UHT (Baglinière et al., 2017; Machado et al., 2016). La similitud entre las proteasas *aprX* y *ser2* (amplios rangos de actividad y patrones de liberación de péptidos a partir de la hidrólisis de la caseína) ha sido reportado por Baglinière et al., (2017). Sin embargo, son necesarios estudios más precisos para caracterizar e identificar las proteasas producidas por nuestros aislamientos.

## CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se extraen de esta tesis son:

- Una variedad de géneros y especies de bacterias psicrótrofas con capacidad de producir enzimas proteolíticas extracelulares fue aislada e identificada en la leche de tanque refrigerada de tambos de la cuenca litoral-norte del país.
- Las especies más frecuentemente aisladas corresponden a psicrótrofos cuyo origen puede ser ambiental (Gram negativos y positivos).
- La caracterización parcial de las fracciones enzimáticas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*, *Macrococcus caseolyticus* y *Staphylococcus chromogenes* podrían indicar la producción de proteasas alcalinas termoestables.
- La capacidad potencial para producir la proteasa AprX fue confirmada en un aislamiento de *Pseudomonas fluorescens* no descartando la presencia del gen que codifica esta enzima en otros aislamientos de *Pseudomonas* spp.
- Los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* y *Serratia liquefaciens* se destacaron dados sus mayores títulos de producción de enzimas, actividad enzimática en un amplio rango de pH y estabilidad térmica alta.
- La capacidad de coagular la leche comercial que presentaron las enzimas de varios aislamientos a temperatura ambiente y de refrigeración, sumado a la termoestabilidad de estas enzimas, dan cuenta del riesgo potencial de alteración de la leche pasteurizada y UHT durante su almacenamiento y distribución.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abidi, F., Limam, F., y Marzouki, M. N. (2007). Purification and characterization of an alkaline protease Prot 1 from *Botrytis cinerea*: biodetergent catalyst assay. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 141, 361-376.
- Afzal, M. I., Jacquet, T., Delaunay, S., Borges, F., Millière, J. B., Revol-Junelles, A. M., y Cailliez-Grimal, C. (2010). *Carnobacterium maltaromaticum*: identification, isolation tools, ecology and technological aspects in dairy products. *Food Microbiology*, 27(5), 573-579. doi:10.1016/j.fm.2010.03.019
- Aguilera-Toro, M., Kragh, M. L., Thomassen, A. V., Piccini, V., Rauh, V., Xiao, Y., ... Larsen, L. B. (2023). Proteolytic activity and heat resistance of the protease AprX from *Pseudomonas* in relation to genotypic characteristics. *International Journal of Food Microbiology*, 391, 110147. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110147
- Alegría, Á., Álvarez-Martín, P., Sacristán, N., Fernández E., Delgado, S., y Mayo, B. (2009). Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a classical Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. *International Journal of Food Microbiology* 136, 44-51. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.023
- Alessandria, V., Dolci, P., Rantsiou, K., Pattono, D., Dalmaso, A., Civera, T., y Cocolin, L. (2010). Microbiota of the Planalto de Bolona: an artisanal cheese produced in uncommon environmental conditions in the Cape Verde Islands. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26, 2211-2221. doi 10.1007/s11274-010-0406-7
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., y Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 25(4), 977-984. doi: 10.2503/jjshs.58.977
- Baglinière, F., Matéos, A., Tanguy, G., Jardin, J., Briard-Bion, V., Rousseau, F., ... Gaucheron, F. (2013). Proteolysis of ultra high temperature-treated casein micelles by AprX enzyme from *Pseudomonas fluorescens* F induces their destabilisation. *International Dairy Journal*, 31(2), 55-61. doi: 10.1016/j.idairyj.2013.02.011
- Baglinière, F., Tanguy, G., Salgado, R. L., Jardin, J., Rousseau, F., Robert, B., ... Gaucheron, F. (2017). Ser2 from *Serratia liquefaciens* L53: A new heat stable protease able to destabilize UHT milk during its storage. *Food Chemistry*, 229, 104-110. doi:10.1016/j.foodchem.2017.02.054



oi=fnd&pg=PA3&dq=Animal+Food+Production&ots=H-szea1kMC&sig=yBID0xk1whvVxx\_4bgwknxy\_G14

- Caldera, L., Franzetti, L., Van Coillie, E., De Vos, P., Stragier, P., De Block, J., y Heyndrickx, M. (2016). Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods. *Food Microbiology*, 54, 142-153. doi:10.1016/j.fm.2015.10.004
- Camarote, A. (2013). *Caracterización de cepas proteolíticas de bacterias psicrótrofas aisladas de leche cruda bovina refrigerada* (Tesis de grado). Facultad de Ciencias, UDELAR, Montevideo.
- Chen, L., Daniel, R. M., y Coolbear, T. (2003). Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal*, 13(4), 255-275. doi:10.1016/S0958-6946(02)00171-1
- Coêlho, D. F., Saturnino, T. P., Fernandes, F. F., Mazzola, P. G., Silveira, E., y Tambourgi, E. B. (2016). Azocasein substrate for determination of proteolytic activity : Reexamining a traditional method using bromelain samples. *BioMed Research International*, 2016, 409183.
- De Almeida, K. M., Bruzaroski, S. R., Zanol, D., de Melo, M., Sifuentes dos Santos, J., Aragon Alegre, L. C., ... Walter de Santana, E. H. (2017). *Pseudomonas* spp. e *P. fluorescens*: População em leite cru refrigerado. *Ciencia Rural*, 47(1). doi:10.1590/0103-8478cr20151540
- De Jonghe, V., Coorevits, A., Van Hoorde, K., Messens, W., Van Landschoot, A., De Vos, P., y Heyndrickx, M. (2010). Influence of storage conditions on the growth of *pseudomonas* species in refrigerated raw milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(2), 460-470. doi:10.1128/AEM.00521-10
- De Los Santos, R., González-Revello, Á., Majul, L., Umpiérrez, A., Aldrovandi, A., Gil, A., ... Zunino, P. (2022). Subclinical bovine mastitis associated with *Staphylococcus* spp. in eleven Uruguayan dairy farms. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 16(04), 630-637. doi:10.3855/jidc.12960
- De Oliveira Pinto, C., Lopes Martins, M., y Dantas Vanetti, M.C. (2006). Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrótrofas proteolíticas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(3), 645-651.
- Decimo, M., Morandi, S., Silvetti, T., y Brasca, M. (2014). Characterization of Gram-negative psychrotrophic bacteria isolated from Italian bulk tank milk. *Journal of Food Science*, 79(10), M2081-M2090. doi:10.1111/1750-3841.12645
- Dufour, D., Nicodème, M., Perrin, C., Driou, A., Brusseau, E., Humbert, G., ... Dary, A. (2008). Molecular typing of industrial strains of *Pseudomonas* spp. isolated from milk and genetical and biochemical characterization of an extracellular

- protease produced by one of them. *International Journal of Food Microbiology*, 125(2), 188-196. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.004
- Elmoslemany, A. M., Keefe, G. P., Dohoo, I. R., y Jayarao, B. M. (2009). Risk factors for bacteriological quality of bulk tank milk in prince edward Island dairy herds. Part 1: Overall risk factors. *Journal of Dairy Science*, 92(6), 2634-2643. doi:10.3168/jds.2008-1812
- Frazier, W.C., y Westhoff, D.C. (1993). *Microbiología de los Alimentos* (4<sup>a</sup> ed.). Zaragoza: Acribia
- Fricker, M., Skånseng, B., Rudi, K., Stessl, B., y Ehling-Schulz, M. (2011). Shift from farm to dairy tank milk microbiota revealed by a polyphasic approach is independent from geographical origin. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 24-30. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.025
- Giannino, M.L., Marzotto, M., Dellaglio, F., y Feligini, M. (2009). Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture independent methods. *International Journal of Food Microbiology*. 130,188-195. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.022
- Grille, L. (2016). *Caracterización estacional de la calidad de la leche de tanque en predios de la región litoral norte del Uruguay* (Tesis de maestría). Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo.
- Hall, T. (2011). BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences*, 2(1), 60-61.
- Hantsis-Zacharov, E., y Halpern, M. (2007). Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(22), 7162-7168. doi: 10.1128/AEM.00866-07
- Haug, A., Høstmark, A. T., y Harstad, O. M. (2007). Bovine milk in human nutrition - A review. *Lipids in Health and Disease*, 6(25), 1-16. doi:10.1186/1476-511X-6-25
- Hayes, M. C., Ralyea, R. D., Murphy, S. C., Carey, N. R., Scarlett, J. M., y Boor, K. J. (2001). Identification and characterization of elevated microbial counts in bulk tank raw milk. *Journal of Dairy Science*, 84(1), 292-298. doi:10.3168/jds.S0022-0302(01)74479-7
- Hill, B., Smythe, B., Lindsay, D., y Shepherd, J. (2012). Microbiology of raw milk in New Zealand. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 305-308. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.031
- Júnior, J. R., De Oliveira, A. M., Silva, F. D. G., Tamanini, R., De Oliveira, A. L. M., y Beloti, V. (2018). The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. *Journal of Dairy Science*, 101(1), 75-83.

- Kaibara, F., Iiyama, K., Chieda, Y., Man Lee, J., Kusakabe, T., Yasunaga-Aoki, C. y Shimizu, S., (2012). Construction of serralysin-like metalloprotease-deficient mutants of *Serratia liquefaciens* and their virulence in the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, 81, 55-61.
- Kieliszek, M., Pobiega, K., Piwowarek, K., y Kot, A. M. (2021). Characteristics of the proteolytic enzymes produced by lactic acid bacteria. *Molecules*, 26(7), 1858. doi:10.3390/molecules26071858
- Kuddus, M., y Ramteke, P. W. (2008). A cold-active extracellular metalloprotease from *Curtobacterium luteum* (MTCC 7529): Enzyme production and characterization. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 54(6), 385-392. doi: 10.2323/jgam.54.385
- Lampugnani, C., Zanatta Was, M., Maziero Montanhini, M. T., Nero, L. A., y dos Santos Bersot, L. (2019). Quantification of psychrotrophic bacteria and molecular identification of *Pseudomonas fluorescens* in refrigerated raw milk. *Arquivos Do Instituto Biológico*, 86, e1212018. doi:10.1590/1808-1657001212018
- Longhi, C., Maffeo, A., Penta, M., Petrone, G., Seganti, L., y Conte, M. P. (2003). Detection of *Listeria monocytogenes* in Italian-style soft cheeses. *Journal of Applied Microbiology*, 94(5), 879-885. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01921.x>
- López, Á. L., y Barriga, D. (2016). *La leche, composición y características*. Sevilla: Junta de Andalucía. Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica.
- Machado, S. G., Baglinière, F., Marchand, S., Van Coillie, E., Vanetti, M. C. D., De Block, J., y Heyndrickx, M. (2017). The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 8, 302. doi:0.3389/fmicb.2017.00302
- Machado, S. G., da Silva, F. L., Bazzolli, D. M. S., Heyndrickx, M., Costa, P. M. d. A., y Vanetti, M. C. D. (2015). *Pseudomonas* spp. and *Serratia liquefaciens* as Predominant Spoilers in Cold Raw Milk. *Journal of Food Science*, 80(8), M1842-M1849. doi:10.1111/1750-3841.12957
- Machado, S. G., Heyndrickx, M., De Block, J., Devreese, B., Vandenberghe, I., Vanetti, M. C. D., y Van Coillie, E. (2016). Identification and characterization of a heat-resistant protease from *Serratia liquefaciens* isolated from Brazilian cold raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 222, 65-71. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.014
- Marchand, S., De Block, J., De Jonghe, V., Coorevits, A., Heyndrickx, M., y Herman, L. (2012). Biofilm Formation in Milk Production and Processing Environments; Influence on Milk Quality and Safety. *Comprehensive Reviews in Food Science*

and *Food Safety*, 11(2), 133-147. doi:10.1111/j.1541-4337.2011.00183.x

- Marchand, S., Vandriesche, G., Coorevits, A., Coudijzer, K., De Jonghe, V., Dewettinck, K.,... De Block, J. (2009). Heterogeneity of heat-resistant proteases from milk *Pseudomonas* species. *International Journal of Food Microbiology*, 133(1-2), 68-77. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.027
- Martins, M. L., De Araújo, E. F., Mantovani, H. C., Moraes, C. A., y Vanetti, M. C. D. (2005). Detection of the apr gene in proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 102, 203-211. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.016
- Martins, M. L., Pinto, C. L., Rocha, R. B., De Araujo, E. F., y Vanetti, M. C. (2006). Genetic diversity of Gram-negative, proteolytic, psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 111(2), 144-148. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.020
- Matéos, A., Guyard-Nicodème, M., Baglinière, F., Jardin, J., Gaucheron, F., Dary, A., ... Gaillard, J. L. (2015). Proteolysis of milk proteins by AprX, an extracellular protease identified in *Pseudomonas* LBSA1 isolated from bulk raw milk, and implications for the stability of UHT milk. *International Dairy Journal*, 49, 78-88. doi:10.1016/j.idairyj.2015.04.008
- Molineri, A. I., Signorini, M. L., Cuatrin, A. L., Canavesio, V. R., Neder, V. E., Russi, ... Calvino, L. F. (2009). Calidad bacteriológica y relación entre grupos bacterianos en leche de tanque de frío. *FAVE Sección Ciencias Veterinarias*, 8(2), 75-86. doi:10.14409/favecv.v8i2.1490
- Montel, M. C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D. A., Desmasures, N., y Berthier, F. (2014). Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 136-154. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019
- Moussa, O. B., Mankai, M., Setti, K., Boulares, M., Maher, M., y Hassouna, M. (2008). Characterisation and technological properties of psychotropic lactic acid bacteria strains isolated from Tunisian raw milk. *Annals of Microbiology*, 58, 461-469.
- Munsch-Alatossava, P., y Alatossava, T. (2006). Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. *Microbiological Research*, 161(4), 334-346. doi:10.1016/j.micres.2005.12.004
- Muñoz, S. del C. (2004). *Perfil microbiológico de la leche de estanque de tres centros de acopio lecheros (CAL) de la Provincia de Valdivia* (Tesis de grado). Escuela de Ingeniería en Alimentos, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

- Nolasco-Soria, H. (2021). Improving and standardizing protocols for alkaline protease quantification in fish. In *Reviews in Aquaculture*, 13(1), 1-23. doi:10.1111/raq.12463
- Ntuli, V., Sibanda, T., Elegbeleye, J. A., Mugadza, D. T., Seifu, E., y Buys, E. M. (2022). Dairy production: Microbial safety of raw milk and processed milk products. En *Present Knowledge in Food Safety* (pp. 439-454). Londres: Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-819470-6.00076-7
- Olmos, M. J. (2014). *Evaluación de la calidad microbiológica de la leche producida en establecimientos de la región litoral noroeste del país, período 2012- 2013*. (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo.
- Patil, S. H. (2019). Psychrotrophic microbiota in milk and fermented milk products. *Journal of Pure Applied Microbiology*, 113(2), 1257-1266.
- Raats, D., Offek, M., Minz, D., y Halpern, M. (2011). Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. *Food Microbiology*, 28(3), 465-471. doi:10.1016/j.fm.2010.10.009
- Rabêlo, C. A., Ricardo, M., Assis Porfírio, J., Colombo Pimentel, T., dos Santos Nascimento, J., y de Oliveira Costa, L. E. (2021). Psychrotrophic bacteria in brazilian organic dairy products: Identification, production of deteriorating enzymes and biofilm formation. *Food Science and Technology*, 41(3), 799-806. <https://doi.org/10.1590/fst.68420>
- Raj, A., Khes, N., Pujari, N., Bhattacharya, S., Das, A., y Rajan, S. S. (2012). Enhancement of protease production by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from dairy effluent sludge and determination of its fibrinolytic potential. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(3), 1845-1851. doi:10.1016/S2221-1691(12)60506-1
- Rasolofo, E.A., St-Gelais, D., LaPointe, G., y Roy, D. (2010). Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. *International Journal of Food Microbiology*, 138, 108-118. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.008
- Reginensi, S., González, M. J., Olivera, J. A., Infante, I., Juliano, P., y Bermúdez, J. (2015). Microorganismos termotóxicos en la leche causantes de defectos en la producción quesera. *Latin American Archives of Animal Production*, 23(5), 38-40.
- Remenant, B., Jaffrès, E., Dousset, X., Pilet, M. F., y Zagorec, M. (2015). Bacterial spoilers of food: behavior, fitness and functional properties. *Food Microbiology*, 45, 45-53. doi:10.1016/j.fm.2014.03.009
- Ruaro, A., Andrighetto, C., Torriani, S., y Lombardi, A. (2013). Biodiversity and characterization of indigenous coagulase-negative staphylococci isolated from raw milk and cheese of North Italy. *Food Microbiology*, 34(1), 106-111.

doi:10.1016/j.fm.2012.11.013

- Samaržija, D., Zamberlin, Š., y Pogačić, T. (2017). Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. *Journal of Food Science*, 62(2), 75-93. doi:10.1111/j.1439-0523.1995.tb00795.x
- Signorini, M. L., Sequeira, G. J., Bonazza, J. C., Dalla S, R., Otero, J. L., y Rosmini, M. R. (2003). Variación estacional en los principales indicadores de higiene en leche cruda de un tambo de la cuenca central. *FAVE-Ciencias Veterinarias*, 2(2), 97-110. doi:10.14409/favecv.v2i2.1391
- Sørhaug, T., y Stepaniak, L. (1997). Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science and Technology*, 8(2), 35-41. doi:0.1016/S0924-2244(97)01006-6
- Stoeckel, M., Lidolt, M., Achberger, V., Gluck, C., Krewinkel, M., Stressler, T., . . . Hinrichs, J. (2016). Growth of *Pseudomonas weihenstephanensis*, *Pseudomonas proteolytica* and *Pseudomonas* sp. in raw milk: Impact of residual heat-stable enzyme activity on stability of UHT milk during shelf-life. *International Dairy Journal*, 59, 20-28. doi:10.1016/j.idairyj.2016.02.045
- Teh, K. H., Flint, S., Palmer, J., Lindsay, D., Andrewes, P., y Bremer, P. (2011). Thermo-resistant enzyme-producing bacteria isolated from the internal surfaces of raw milk tankers. *International Dairy Journal*, 21(10), 742-747. doi:10.1016/j.idairyj.2011.04.013
- Uruguay. (2016, diciembre 13). Decreto N° 382/016: Modificación del decreto 359/013, relativo al sistema nacional de calidad de la leche. Recuperado de <https://www.impo.com.uy/bases/decretos/382-2016>
- U.S Food and Drug Administration (s.f.). *Los Peligros de la leche cruda: La leche sin pasteurizar puede representar un riesgo grave para la salud*. Recuperado de <https://www.fda.gov/es/node/390100>
- Vacheyrou, M., Normand, A. C., Guyot, P., Cassagne, C., Piarroux, R., y Bouton, Y. (2011). Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *International Journal of Food Microbiology*, 146(3), 253-262. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.033
- Velázquez-Ordoñez, V., Valladares-Carranza, B., Tenorio-Borroto, E., Talavera-Rojas, M., Varela-Guerrero, J. A., Acosta-Dibarrat, J., ... Pareja, L. (2019). Microbial contamination in milk quality and health risk of the consumers of raw milk and dairy products. En G. Mózsik y M. Figler *Nutrition in Health and Disease*. Londres: IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.86182
- Verdier-Metz, I., Gagne, G., Bornes, S., Monsallier, F., Veisseire, P., Delbès- Paus, C. y Montel, M.C. (2012). Cow teat skin, a potential source of diverse microbial populations for cheese production. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 326-333. doi: 10.1128/AEM.06229-11

- Verdier-Metz, I., Michel, V., Delbès, C., y Montel, M. C. (2009). Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food Microbiology*, 26(3), 305-310. doi:10.1016/j.fm.2008.12.005
- Vilar, M. J., Rodríguez-Otero, J. L., Sanjuán, M. L., Diéguez, F. J., Varela, M., y Yus, E. (2012). Implementation of HACCP to control the influence of milking equipment and cooling tank on the milk quality. *Trends in Food Science and Technology*, 23(1), 4-12. doi:10.1016/j.tifs.2011.08.002
- Vithanage, N. R., Dissanayake, M., Bolge, G., Palombo, E. A., Yeager, T. R., y Datta, N. (2016). Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions, seasonality and their spoilage potential. *International Dairy Journal*, 57, 80-90. doi:10.1016/j.idairyj.2016.02.042
- Von Neubeck, M., Baur, C., Krewinkel, M., Stoeckel, M., Kranz, B., Stressler, T., ... Wenning, M. (2015). Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. *International Journal of Food Microbiology*, 211, 57-65.
- Weber, M., Geißert, J., Kruse, M., y Lipski, A. (2014). Comparative analysis of bacterial community composition in bulk tank raw milk by culture-dependent and culture-independent methods using the viability dye propidium monoazide. *Journal of Dairy Science*, 97(11), 6761-6776.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., y Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697-703. doi:10.1128/jb.173.2.697-703.1991
- Woods, R.G., Burger, M., Beven, C.A., y Beacham, I.R. (2001). The aprX-lipA operon of *Pseudomonas fluorescens* B52: a molecular analysis of metalloprotease and lipase production. *Microbiology*, 147 (2), 345-354. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-2-345>
- Yuan, L., Sadiq, F. A., Burmølle, M., Wang, N. I., y He, G. (2019). Insights into psychrotrophic bacteria in raw milk: a review. *Journal of Food Protection*, 82(7), 1148-1159.
- Yuan, L., Sadiq, F. A., Liu, T., Flint, S., Chen, J., Yang, H., ... He, G. (2017). Psychrotrophic bacterial populations in Chinese raw dairy milk. *LWT*, 84, 409-418.
- Yuan, L., Sadiq, F. A., Liu, T., Li, Y., Gu, J., Yang, H., y He, G. (2018). Spoilage potential of psychrotrophic bacteria isolated from raw milk and the thermo-stability of their enzymes. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 19(8), 630-642. doi:10.1631/jzus.B1700352
- Zambare, V., Nilegaonkar, S., y Kanekar, P. (2011). A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: enzyme production and its partial

characterization. *New Biotechnology*, 28(2), 173-181.  
doi:10.1016/j.nbt.2010.10.002

Zhang, C., Bijl, E., Svensson, B., y Hettinga, K. (2019). The extracellular protease AprX from *Pseudomonas* and its spoilage potential for UHT milk: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(4), 834-852.  
doi:10.1111/1541-4337.12452

Zhang, D., Palmer, J., Teh, K. H., Calinisan, M. M. A., y Flint, S. (2020). Milk fat influences proteolytic enzyme activity of dairy *Pseudomonas* species. *International Journal of Food Microbiology*, 320, 108543.  
doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108543

## ANEXOS

**Tabla S1.** Identificación fenotípica de los 167 aislamientos de bacteria psicrótrofas según productos, estación del año, características morfológicas macroscópicas, microscópicas, coloración de Gram y prueba de la catalasa.

Código de aislamiento	N° de productor	Estación del año	Morfología colonia	Gram	Catalasa
8A	2	Primavera	circular, pequeña, amarilla	Cocos, Gram +	Positivo
8B	2	Primavera	circular, pequeña, amarilla	Cocos, Gram +	Positivo
8C	2	Primavera	circular, pequeña, amarilla	Cocos, Gram +	Positivo
9	2	Primavera	punta alfiler, centro oscuro	Bacilos, Gram +	Positivo
10	2	Primavera	grande, mucosa, amarilla	Cocos, Gram +	Positivo
11	2	Primavera	circular, blanca centro oscuro	Cocos, Gram +	Positivo
12	2	Primavera	punta alfiler, nácar	Cocos, Gram +	Positivo
13	2	Primavera	circular, pequeña, blanca	Bacilos, Gram +	Positivo
14	2	Primavera	pequeña, mucosa, blanca	Cocos, Gram +	Negativo
15	2	Primavera	pequeña, mucosa, amarilla	Cocos, Gram +	Positivo
16	2	Primavera	mucosa, naranja	Bacilos, Gram +	Positivo
56A	11	Primavera	punta alfiler	Bacilos, Gram +	Negativo
56B	11	Primavera	dura, estrellada	Bacilos, Gram +	Negativo
56C	11	Primavera	pequeña, punta de alfiler, crema	Bacilos, Gram +	Positivo
57	11	Primavera	medianas, borde liso, blanca	Bacilos, Gram +	Negativo
58	11	Primavera	grandes, borde liso, blanca	Bacilos, Gram +	Negativo
59	11	Primavera	pequeña, borde liso, blanca	Bacilos, Gram +	Negativo
60	11	Primavera	esférica, borde liso, blanca	Bacilos, Gram +	Negativo
61	11	Primavera	pequeña, borde liso, blanca	Bacilos, Gram +	Negativo
62	11	Primavera	pequeña, borde liso, blanca	Bacilos, Gram +	Negativo
63	11	Primavera	pequeña, borde liso, blanca	Bacilos, Gram +	Negativo
64	11	Primavera	pequeña, borde liso, blanca	Cocos, Gram +	Negativo
65	11	Primavera	esférica, pequeña, blanca	Cocos, Gram +	Negativo
66	11	Primavera	esférica, pequeña, blanca	Cocos, Gram +	Negativo

**Tabla S1.** Identificación fenotípica de los 167 aislamientos de bacteria psicrótrofas según productos, estación del año, características morfológicas macroscópicas, microscópicas, coloración de Gram y prueba de la catalasa. Continuación.

Código de aislamiento	Nº de productor	Estación del año	Morfología colonia	Gram	Catalasa
67	13	Primavera	grande, mucosa, blanca	Bacilos, Gram +	Positivo
68	13	Primavera	grande, mucosa, blanca	Bacilos, Gram +	Negativo
69	13	Primavera	esférica, grande, blanca	Bacilos, Gram +	Negativo
70	13	Primavera	esférica, grande, blanca	Bacilos, Gram +	Negativo
71	13	Primavera	esférica, amarilla	Cocos, Gram +	Positivo
72	13	Primavera	esférica, blanca	Cocos, Gram +	Negativo
73	13	Primavera	esférica, blanca	Cocos, Gram +	Negativo
74A	14	Primavera	circular, pequeña, naranja	Contaminado con levaduras	Positivo
74B	14	Primavera	pequeña	Bacilos, Gram +	Negativo
75	2	Otoño	esférica, mucosa, amarilla	Bacilos, Gram -	Positivo
76	2	Otoño	esférica, mucosa, amarilla	Cocos, Gram +	Positivo
77	2	Otoño	mucosa, amarilla	Bacilos, Gram +	Positivo
78A	2	Otoño	blanca	Cocos, Gram +	Negativo
78B	2	Otoño	amarilla	Bacilos, Gram -	Positivo
79A	2	Otoño	amarilla	Cocos, Gram +	Positivo
79B	2	Otoño	pequeña, blanca	Cocos, Gram +	Negativo
80A	2	Otoño	mucosa, transparente	Cocos, Gram +	Negativo
80B	2	Otoño	mucosa, amarilla	Cocos, Gram +	Positivo
81	11	Otoño	no creció		
82	11	Otoño	pequeña, blanca	Bacilos, Gram +	Negativo
83	11	Otoño	punta alfiler	Bacilos, Gram +	Negativo
84	11	Otoño	no creció		
85	11	Otoño	no creció		
86	11	Otoño	blanca	Bacilos, Gram +	Negativo
87A	11	Otoño	esférica, mucosa, blanca	Bacilos, Gram -	Positivo
87B	11	Otoño	pequeña, mucosa, transparente	Bacilos, Gram -	Negativo
88	13	Otoño	amarilla	Cocos, Gram +	Positivo

**Tabla S1.** Identificación fenotípica de los 167 aislamientos de bacteria psicrótrofas según productos, estación del año, características morfológicas macroscópicas, microscópicas, coloración de Gram y prueba de la catalasa. Continuación.

Código de aislamiento	Nº de productor	Estación del año	Morfología colonia	Gram	Catalasa
89	13	Otoño	mucosa, verde	Bacilos, Gram +	Positivo
90	13	Otoño	amarilla	Bacilos, Gram +	Positivo
91	13	Otoño	no creció		
92A	13	Otoño	punta alfiler	Bacilos, Gram +	Positivo
92B	13	Otoño	blanca	Bacilos, Gram +	Positivo
93	13	Otoño	esférica, pequeña, naranja	Bacilos, Gram +	Positivo
94	13	Otoño	esférica, pequeña, blanca	Cocos, Gram +	Positivo
95	13	Otoño	mucosa	Bacilos, Gram -	Negativo
96	13	Otoño	amarilla	Bacilos, Gram +	Positivo
97	14	Otoño	salmón	Cocos, Gram +	Positivo
98	14	Otoño	salmón	Contaminado con levaduras	Positivo
99	14	Otoño	pequeña, puntas alfiler	Contaminado con levaduras	Positivo
100	14	Otoño	no creció		
101	14	Otoño	no creció		
102	14	Otoño	no creció		
103	14	Otoño	no creció		
104A	14	Otoño	mucosa, amarilla	Bacilos, Gram -	Positivo
104B	14	Otoño	mucosa, amarilla	Cocos, Gram +	Positivo
105	14	Otoño	amarilla	Bacilos, Gram +	Positivo
106A1	14	Otoño	esférica, blanca	Cocos, Gram +	Positivo
106A2	14	Otoño	amarilla	Bacilos, Gram +	Positivo
106B	14	Otoño	amarilla	Cocos, Gram +	Negativo
107	14	Otoño	esférica, blanca	Cocos, Gram +	Positivo
108	14	Otoño	esférica, blanca	Cocos, Gram +	Positivo
109	14	Otoño	esférica, blanca	Cocos, Gram +	Positivo
110A	14	Otoño	esférica, pequeña, blanca	Cocos, Gram +	Positivo
110B	14	Otoño	pequeña, mucosa, amarilla	Bacilos, Gram -	Positivo

**Tabla S1.** Identificación fenotípica de los 167 aislamientos de bacteria psicrótrofas según productos, estación del año, características morfológicas macroscópicas, microscópicas, coloración de Gram y prueba de la catalasa. Continuación.

Código de aislamiento	Nº de productor	Estación del año	Morfología colonia	Gram	Catalasa
111A	14	Otoño	esférica, blanca	Cocos, Gram +	Positivo
111B	14	Otoño	esférica, mucosa, naranja	Cocos, Gram +	Positivo
112	14	Otoño	esférica, mucosas, naranja	Cocos, Gram +	Positivo
113A	14	Otoño	esférica, grande, blanca	Cocos, Gram +	Positivo
113B	14	Otoño	esférica, mucosa, naranja	Bacilos, Gram +	Positivo
114	14	Otoño	esférica, blanca, grande,	Cocos, Gram+	Positivo
115	14	Otoño	esférica, mucosa, naranja	Bacilos, Gram +	Positivo
116	2	Invierno	mucosa, amarilla	Bacilos, Gram -	Positivo
117	2	Invierno	mucosa, amarilla	Bacilos, Gram -	Positivo
118	13	Verano	borde irregular, crema	Bacilos, Gram -	Positivo
119	2	Primavera	circular, centro blanco	Bacilos, Gram -	Positivo
120	14	Invierno	irregular, amarilla	Bacilos, Gram -	Positivo
121	2	Verano	amarilla	Cocos, Gram +	Positivo
122	2	Verano	esférica, mucosa, amarilla	Bacilos, Gram +	Positivo
123	2	Verano	amarilla	Cocos, Gram +	Positivo
124	11	Verano	pequeña, blanca	Cocos, Gram +	Positivo
125	11	Verano	pequeña, blanca	Cocos, Gram +	Positivo
126	11	Verano	pequeña, blanca	Cocos, Gram +	Positivo
127	11	Verano	pequeña, blanca	Cocos, Gram +	Positivo
128	11	Verano	pequeña, blanca	Cocos, Gram +	Positivo
129	11	Verano	pequeña, blanca	Cocos, Gram +	Positivo
130	11	Verano	pequeña, blanca	Cocos, Gram +	Positivo
131	11	Verano	pequeña, blanca	Cocos, Gram +	Positivo
132	13	Verano	amarilla	Cocos, Gram +	Positivo
133	13	Verano	amarilla	Cocos, Gram +	Positivo
134	13	Verano	amarilla	Cocos, Gram +	Positivo
135	13	Verano	amarilla	Cocos, Gram +	Positivo

**Tabla S1.** Identificación fenotípica de los 167 aislamientos de bacteria psicrótrofas según productos, estación del año, características morfológicas macroscópicas, microscópicas, coloración de Gram y prueba de la catalasa. Continuación.

Código de aislamiento	Nº de productor	Estación del año	Morfología colonia	Gram	Catalasa
136	13	Verano	amarilla, circular	Bacilos, Gram +	Positivo
137	13	Verano	pequeña, amarilla	Bacilos, Gram +	Positivo
138	14	Verano	esférica, amarilla	Cocos, Gram +	Positivo
139	14	Verano	amarilla	Bacilos, Gram +	Positivo
140	14	Verano	no creció		
141	14	Verano	amarilla	Cocos, Gram +	Positivo
142	14	Verano	amarilla	Cocos, Gram +	Positivo
143	14	Verano	amarilla	Cocos, Gram +	Positivo
144	14	Verano	amarilla	Cocos, Gram +	Positivo
145	14	Verano	pequeña, blanca	Cocos, Gram +	Negativo
146	14	Verano	amarilla	Cocos, Gram +	Positivo
147	11	Invierno	pequeña, blanca	Bacilos, Gram -	Positivo
148	11	Invierno	pequeña, blanca	Bacilos, Gram -	Positivo
149	11	Invierno	pequeña, blanca	Bacilos, Gram -	Positivo
150	11	Invierno	pequeña, blanca	Bacilos, Gram -	Positivo
151	11	Invierno	pequeña, blanca	Bacilos, Gram -	Positivo
152	11	Invierno	pequeña, blanca	Bacilos, Gram +	Negativo
153	11	Invierno	pequeña, blanca	Bacilos, Gram +	Negativo
154	11	Invierno	pequeña, blanca	Bacilos, Gram +	Negativo
155	11	Invierno	pequeña, blanca	Bacilos, Gram +	Negativo
156	11	Invierno	pequeña, blanca	Bacilos, Gram -	Positivo
157	11	Invierno	pequeña, blanca	Bacilos, Gram +	Negativo
158	11	Invierno	esférica, pequeña, blanca	Cocos, Gram +	Positivo
159	11	Invierno	esférica, pequeña, blanca	Cocos, Gram +	Positivo
160A	11	Invierno	punta alfiler, blanca	Bacilos, Gram -	Positivo
160B	11	Invierno	punta alfiler, blanca	Bacilos, Gram +	Positivo
161	11	Invierno	pequeña, blanca	Bacilos, Gram +	Negativo

**Tabla S1.** Identificación fenotípica de los 167 aislamientos de bacteria psicrótrofas según productos, estación del año, características morfológicas macroscópicas, microscópicas, coloración de Gram y prueba de la catalasa. Continuación.

Código de aislamiento	N° de productor	Estación del año	Morfología colonia	Gram	Catalasa
162	2	Invierno	amarilla	Cocos, Gram +	Positivo
163	2	Invierno	amarilla	Cocos, Gram +	Positivo
164	2	Invierno	amarilla	Cocos, Gram +	Positivo
165	2	Invierno	amarilla	Bacilos, Gram +	Positivo
166	2	Invierno	amarilla cremosa	Cocos, Gram +	Positivo
167A	2	Invierno	esférica, blanca	Bacilos, Gram +	Positivo
167B	2	Invierno	grande, irregular	Bacilos, Gram +	Positivo
168	2	Invierno	pequeña, blanca	Bacilos, Gram +	Negativo
169	2	Invierno	grande, amarilla	Bacilos, Gram +	Positivo
170A	2	Invierno	borde irregular, crema	Bacilo, Gram +	Positivo
170B	2	Invierno	esférica, pequeña, naranja	Cocos, Gram +	Positivo
171	2	Invierno	esférica, grande, blanca	Cocos, Gram +	Negativo
172	2	Invierno	esférica, grande, blanca	Cocos, Gram +	Negativo
173	13	Invierno	amarilla	Cocos, Gram +	Positivo
174	13	Invierno	amarilla	Cocos, Gram +	Positivo
175	13	Invierno	amarilla	Cocos, Gram +	Positivo
176	13	Invierno	amarilla	Cocos, Gram +	Positivo
177	13	Invierno	pequeña, blanca	Bacilos, Gram -	Positivo
178A	13	Invierno	crema	Cocos, Gram +	Positivo
178B	13	Invierno	amarilla	Bacilos, Gram +	Positivo
179	13	Invierno	esférica, grade, crema	Cocos, Gram +	Positivo
180A	13	Invierno	puntiforme, pequeña, blanca	Cocos, Gram +	Positivo
180B	13	Invierno	pequeña, amarilla	Bacilos, Gram +	Positivo
181	13	Invierno	esférica, pequeña, amarilla	Cocoa, Gram +	Positivo
182	13	Invierno	puntiforme, pequeña, blanca	Bacilos, Gram +	Negativo
183	1	Invierno	amarilla cremosa	Bacilos, Gram +	Positivo
184	14	Invierno	esférica, grande, blanca	Cocos, Gram +	Positivo

**Tabla S1.** Identificación fenotípica de los 167 aislamientos de bacteria psicrótrofas según productos, estación del año, características morfológicas macroscópicas, microscópicas, coloración de Gram y prueba de la catalasa. Continuación.

Código de aislamiento	N° de productor	Estación del año	Morfología colonia	Gram	Catalasa
185	14	Invierno	esférica, grande, blanca	Cocos, Gram +	Positivo
186	14	Invierno	esférica, grande, blanca	Cocos, Gram +	Positivo
187	14	Invierno	pequeña, rosada	Cocos, Gram +	Positivo
188	14	Invierno	amarilla	Cocos, Gram +	Positivo
189	14	Invierno	irregular, mucosa, amarilla	Bacilos, Gram -	Positivo
190	14	Invierno	amarilla	Cocos, Gram +	Positivo
191	14	Invierno	blanca	Bacilos, Gram +	Positivo
191	14	Invierno	blanca	Bacilos, Gram +	Positivo

**Tabla S2.** Concentración y pureza de las muestras de ADNs.

Cepa	[ ] ng/ $\mu$ l	260/280	260/230
8A	66,7	2,58	1,5
56C	17,9	2	0,91
67	202,3	1,97	1,79
74B	37,8	2,13	1,24
79B	211,9	2,75	1,96
87B	54,3	1,5	0,6
92A	36,2	2,2	1,6
95	199,2	1,82	1,41
96	143,2	2,43	2,13
97	152,1	2,74	1,99
107	108,7	1,86	1,14
111B	163,6	2,59	1,4
113B	17,2	2,21	0,95
115	81,5	1,5	0,86
116	212,6	1,8	1,5
117	322,9	2,13	1,88
118	15,5	2,72	2,68
119	100,1	2,17	1,96
120	48,4	2,19	1,71
122	24,6	2,11	1,2
136	135,4	1,99	1,09
138	44,3	2,26	1,58
153	30,1	2,91	1,45
160A	78,4	2,3	2,04
167B	42	2,38	1,46
170A	26,5	2,33	1,91
171	133,5	2,54	2,07
178A	27,3	2,22	1,32
181	13,9	3,03	1,74
183	29,4	2,67	1,92
184	93,8	2,34	1,82
187	92,1	2,46	1,8
189	117,5	2,09	1,79

\*[ ]ng/ $\mu$ l: Concentración de ADN por nanogramos/microlitros. 260/280: Relación de absorbancia indicador de contaminación por proteínas. 260/230: Relación de absorbancia indicador de contaminación por componentes orgánicos.