

Universidad de la República Oriental de Uruguay
Facultad de Ciencias
Licenciatura en Ciencias Biológicas
Orientación Microbiología

Caracterización de microorganismos esporulados presentes en leche pasteurizada comercial y leche cruda provenientes de tambos.

SEBASTIÁN CARROSIO BENVENUTO

Tutor: MSc Jorge Bermúdez Estévez

PhD Stella M. Reginensi

Unidad de Tecnología de los Alimentos -Facultad de Agronomía.

Montevideo, Uruguay

2014



INDICE

Resumen	4
1. Revisión bibliográfica	5
1.1. Introducción.	5
1.2. La leche como sustrato y el origen de la contaminación microbiana	7
1.3. Esporulación.	9
1.4. Importancia de los esporulados aeróbicos (Bacillus) en la industria láctea	12
1.5. Importancia de los esporulados anaeróbicos (Clostridium) en la industria láctea	15
1.6. Alternativas de control de microorganismos esporulados	18
2. Objetivo general	20
2.1. Objetivos específicos	20
3. Materiales y métodos	21
3.1. Muestras de leche cruda y pasteurizada comercial	21
3.2. Recuento de bacterias termodúricas esporuladas	21
3.2.1. Recuento de esporulados aerobios.	22
3.2.2. Recuento de esporulados anaerobios	22
3.3. Caracterización fenotípica y bioquímica	23
3.3.1. Descripción macroscópica y microscópica de colonias bacterianas y pruebas bioquímicas.	23
3.4. Caracterización genotípica de los aislamientos	24
3.4.1. Extracción de ADN genómico	24
3.4.2. Análisis de la secuencia del gen 16S rDNA	25
3.4.3. Identificación por RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) de esporulados aeróbicos.	25
3.4.4. Identificación por ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) de aislamientos esporulados anaeróbicos.	26

4. Resultados y discusión	27
4.1. Recuento de bacterias esporuladas aerobias en leche.	27
4.2. Identificación de aislamientos de las muestras procesadas	28
4.2.1. Identificación de aislamientos esporulados aeróbicos por RAPD-PCR y secuenciación del gen 16S rDNA.	28
4.2.2. Identificación de aislamientos esporulados anaeróbicos por Análisis de Restricción de ADN Ribosomal Amplificado (ARDRA) y secuenciación del gen 16S rDNA.	32
5. Conclusiones.	35
6. Bibliografía.	36

RESUMEN

Los microorganismos esporulados aeróbicos y anaeróbicos constituyen un problema en los procesos industriales lácteos y en la calidad de los productos manufacturados. En este trabajo se determinaron los recuentos de microorganismos esporulados aeróbicos y anaeróbicos en muestras de leche cruda (n=17) de tambos ubicados en el departamento de Colonia y leche pasteurizada (n=22) obtenidas en superficies comerciales de Montevideo, y se identificaron las principales especies de esporas presentes en las muestras analizadas. Las muestras para análisis se trataron térmicamente (80°C por 10 min) para eliminar formas vegetativas y activar esporas. Los recuentos de esporulados aeróbicos se realizaron mediante recuento en placa de diluciones seriadas y siembra en PCA-caseína incubada a 37°C por 72 h. Los esporulados anaeróbicos se cuantificaron mediante la técnica de número más probable (NMP) utilizando 9 tubos y 3 diluciones seriadas. Los tubos se incubaron a 37°C por 7 días y los resultados se analizaron de acuerdo a los tubos que generaron gas. Los tubos positivos fueron sembrados en placas de RCA e incubados a 37°C durante 7 días en condiciones anaeróbicas. Cuatro aislamientos por muestra fueron obtenidos de la siembra en placa de esporulados aeróbicos (PCA-caseína) y anaeróbicos (RCA), que se purificaron y destinaron a la identificación. Los aislamientos fueron sometidos a pruebas microbiológicas de rutina, identificación por técnicas moleculares (OPR13, ARDRA) y secuenciación de gen 16S DNAr. Los recuentos en leche cruda fueron de 3.18 ± 0.71 ufc/mL y 3.19 ± 0.74 ufc/L, mientras que en leche pasteurizada fueron de 2.38 ± 0.51 ufc/mL y 2.56 ufc/L, para esporas aeróbicas y anaeróbicas, respectivamente. Los resultados indican una tendencia a la disminución en los recuentos de esporulados aeróbicos y anaeróbicos en leche pasteurizada. Esto puede ser consecuencia de los diferentes momentos de toma de muestras, las peculiaridades de cada establecimiento en relación a la higiene o el efecto del tratamiento térmico sobre algunos microorganismos termodúricos. Las principales especies de esporulados aeróbicos identificados fueron *B. licheniformis* (45.5%), *B. pumilus* (19.5%) y *B. subtilis* (12.2%), y especies de menor importancia como *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. sphaericus*, *B. amyloliquefaciens*, *Bacillus* spp. y *Lysinibacillus* spp. Los esporulados anaeróbicos tienen como principales especies a *C. tyrobutyricum* (43.3%), *C. sporogenes* (22.0%), *C. beijerinckii* (12.7%) y *C. butyricum* (11.9%) y otras especies en menor proporción. Los contaminantes esporulados aeróbicos son coincidentes con estudios previos realizados en la Facultad de Agronomía y confirman que *B. licheniformis* es el principal contaminante esporulado aeróbico de la leche cruda. Los esporulados anaeróbicos tienen como especie principal a *C. tyrobutyricum* coincidiendo con la mayoría de la información internacional. La leche constituye un medio adecuado para el crecimiento de esporas aerobias e anaerobias y sus consecuencias en los procesos industriales pueden ser evitadas con una mejora en las condiciones de higiene en la rutina de ordeño.

1. Revisión bibliográfica.

1.1. INTRODUCCIÓN

La industria láctea es responsable de la seguridad de sus productos y dirige su interés a la obtención de productos de excelente calidad que puedan competir en el mercado. Para lograr este objetivo debe obtener una leche cruda con bajos recuentos microbianos, libre de residuos químicos y otros contaminantes (Vissers y Driehuis, 2008). La obtención de leche cruda de alta calidad es necesaria para evitar la pérdida de productos terminados que no alcanzan el grado de calidad exigida por los consumidores finales (Barbano et al., 2006; Velthuis et al., 2009, 2010) y generan pérdidas económicas (Buzby y Hyman, 2012). Las buenas prácticas de higiene durante el proceso de obtención de la leche en el tambo inciden sobre la contaminación final de la leche cruda en el tanque de frío. La reducción de los recuentos microbianos en la leche cruda debe lograrse a través de la minimización de las fuentes de contaminación ambiental en el tambo, minimizar las formas de transmisión microbiana, prevenir el crecimiento microbiano e infecciones en las vacas en ordeño, y maximizar la inactivación microbiana y su remoción durante el ordeño (Vissers y Driehuis, 2008). En el Cuadro 1 se presentan las principales especies microbianas asociadas al deterioro de la leche y los productos lácteos.

Las bacterias formadoras de esporas (Ej. *Bacillus* y *Clostridium*) son importantes para la industria láctea en razón de la amplia distribución de estos microorganismos en los ambientes naturales. Si bien la concentración inicial de estos géneros microbianos es reducido, pueden iniciar el proceso de esporulación (Nicholson y Setlow, 1990; Sonenshein, 2000) en condiciones ambientales extremas que son desfavorables para su crecimiento y rápidamente elimina las células vegetativas (Nicholson et al., 2000). En este estado el microorganismo permanece viable hasta tanto las condiciones sean nuevamente favorables a su crecimiento. Los microorganismos esporulados intervienen en forma negativa en la producción de leche en polvo (entera y descremada) y de queso, que constituyen más del 70% de los productos lácteos exportados. Los procesos en que están involucrados este tipo de microorganismos indican claramente la importancia de su estudio para la industria láctea del país.

Cuadro 1. Principales fuentes de microorganismos presentes en la leche que se asocian al deterioro o seguridad alimentaria del producto lácteo.

Especie microbiana	Problema asociado	Fuente de contaminación (vía principal)	Posible crecimiento en tanque de frío
<i>Campylobacter jejuni</i>	Seguridad alimentaria (productos de leche cruda)	Ambiente (heces)	No
<i>Escherichia coli</i>	Deterioro y seguridad alimentaria (productos de leche cruda)	Ambiente (heces y camas)	Si
<i>Listeria monocytogenes</i>	Seguridad alimentaria (productos de leche cruda, quesos blandos y maduración superficial)	Ambiente (heces, alimento)	Si
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	Seguridad alimentaria (productos de leche cruda)	Ambiente (heces)	No
<i>Pseudomonas</i> spp.	Deterioro	Ambiente (camas, suelo). Equipo de ordeño	Si
<i>Salmonella</i> spp	Seguridad Alimentaria (productos de leche cruda)	Ambiente (heces)	Si
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Deterioro	Ambiente (heces, camas, suelo), equipo de ordeño.	Si
<i>Staphylococcus aureus</i>	Seguridad Alimentaria (productos de leche cruda)	Interior de las tetas	Si
<i>Bacillus cereus</i>	Deterioro de productos pasteurizados	Ambiente (alimento, heces, suelo), equipo de ordeño.	Si
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	Deterioro de productos lácteos tratados con UHT.	Ambiente (alimento, heces)	No
Bacterias ácido butíricas (<i>Clostridium</i>)	Deterioro de quesos semiduros, duros y suizos.	Ambiente (alimento, heces)	No

Modificado de Vissers y Driehuis (2008)

1.2. La leche como sustrato y el origen de la contaminación microbiana

La leche es estéril en el momento que es secretada hacia el alvéolo de la ubre, pero es un excelente medio de cultivo para un amplio espectro de microorganismos por su elevado contenido en agua, un pH cercano a la neutralidad y una alta concentración de nutrientes requeridos para el crecimiento microbiano. Los microorganismos que contaminan la leche ingresan principalmente durante y después de la finalización del ordeño. Los microorganismos contaminantes se localizan en el interior del pezón, en el ambiente del tambo y en las superficies del equipo de ordeño (Chambers, 2002). La transferencia de microorganismos desde el ambiente hacia la leche se realiza a través de la suciedad (suelo, alimento, heces) adherida al exterior del pezón o por la migración de microorganismos desde el exterior hacia el interior del pezón, causando mastitis (Makovec y Ruegg, 2003). Por otra parte, la contaminación puede provenir del equipamiento de ordeño, por inadecuado lavado e higiene (Chambers, 2002). Bajo condiciones normales, la contaminación aérea es insignificante. La leche contaminada por un alto número de bacterias usualmente se vuelve inapropiada para el procesamiento dado que no satisface las expectativas del consumidor en términos de salud (valor nutricional), seguridad (calidad higiénica) y satisfacción por sus atributos sensoriales (Nanu et al., 2007). Considerando que la leche es un adecuado sustrato, los microorganismos provenientes de la contaminación inicial pueden crecer entre el momento de almacenaje de la leche en el tanque frío, su transporte a la planta y su depósito en silos industriales, hasta el tratamiento térmico del proceso.

Las esporas bacterianas causan una serie de problemas en la industria alimentaria debido a su ocurrencia ubicua y a sus características de resistencia extrema al estrés térmico (Brul et al., 2011). Las especies del género *Bacillus* y *Clostridium* participan principalmente en el deterioro de la leche y productos lácteos, aunque algunas especies como *B. cereus*, *C. botulinum* y *C. perfringens* también cobran importancia por sus efectos en la seguridad alimentaria. Si bien estos géneros tienen una carga inicial relativamente baja, son organismos termodúricos capaces de sobrevivir a los diferentes tipos de tratamientos térmicos aplicados en los diferentes

procesos de transformación. Por lo anterior, los microorganismos esporulados son contaminantes comunes de las materias primas de los alimentos e ingredientes en la industria láctea (Carlin, 2011) y participan en el deterioro de polvos lácteos (particularmente especies del género *Bacillus*) y en la aparición de defectos en quesos semiduros y duros por especies del género *Clostridium*. En condiciones favorables las esporas pueden germinar, crecer y pueden causar deterioro y pérdidas de calidad. Más aún, las especies patógenas de estos géneros pueden causar enfermedades alimenticias y afectar la salud del consumidor.

La contaminación y la persistencia de las esporas de *Bacillus* y géneros asociados en los productos lácteos constituyen una preocupación real para la industria láctea, a pesar de la constante implementación de prácticas higiénicas (Baril et al., 2012). La presencia de diferentes especies de *Bacillus* es uno de los factores que contribuyen a la reducción de la vida útil de la leche (Hanson et al., 2005), porque muchas de estas especies son psicrotolerantes y encuentran niveles adecuados de nutrientes en la leche, que permiten su crecimiento aún a bajas temperaturas (Bartoszewicz et al., 2008; Huck et al., 2008). Las bacterias predominantes son Gram positivas, formadoras de esporas, de los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus*, que soportan la pasteurización (HTST) comúnmente usadas en el procesamiento de leche fluida (Fromm and Boor, 2004; Ranieri et al., 2009). Mientras *Bacillus* spp. es usualmente el género predominante hasta los 7 días post-pasteurización en leche mantenida a 6 °C, *Paenibacillus* spp. domina con frecuencia posteriormente durante la vida útil, a los 17 días y más (Fromm and Boor, 2004; Ranieri et al., 2009). La reducción o eliminación de estas bacterias contaminantes puede resultar en la extensión de la vida útil de la leche, que redundaría en una mayor calidad del producto. Las actividades metabólicas de estas bacterias de deterioro pueden conducir a la pérdida de calidad del producto, incluyendo la gelificación y olores/sabores inadecuados (Ageitos et al., 2007; Dutt et al., 2009). Si bien las especies del género *Clostridium* representan un problema de importancia para la industria láctea, el deterioro ocasionado por las especies de *Bacillus* presentan un reto aún mayor debido a su resistencia extrema a los tratamientos térmicos (Brul et al., 2011). La importancia de especies del género *Bacillus* en la leche en polvo ha sido ampliamente reportada en el país (Reginensi et al., 2011) y en el extranjero (Ronimus et al., 2003, 2006; Rüeckert et al., 2004; Yuan et al., 2012)

A nivel de la producción en el tambo, la suciedad de la ubre y los pezones es una de las más importantes fuentes de contaminación de la leche (Coorevits et al., 2008; Ward et al., 2002). Estos autores encontraron que la consistencia de las heces está correlacionada con la limpieza de la ubre y los pezones del animal en ordeño. Las vacas que producen cantidades importantes de heces de consistencia diarreica están generalmente más sucias que aquellas que producen heces normales. La consistencia fecal se asocia con aspectos de la nutrición y digestión de la vaca, lo cual apoya la hipótesis de la importancia de la estrategia de alimentación en la calidad microbiana de la leche cruda, no solo por la composición del alimento sino también por su incidencia en la consistencia de las heces. La identificación de los puntos de entrada de estas bacterias puede permitir el desarrollo de estrategias efectivas para la reducción y eliminación de su presencia en los sistemas productivos lecheros (Huck et al., 2008). Asimismo, el conocimiento de los recuentos y las especies que contaminan los productos pueden proveer información importante en la mejora de la calidad (Yuan et al., 2012)

1.3. Esporulación

La esporulación es la última respuesta celular a la reducción de nutrientes (Burkholder y Grossman, 2000) y también se asocia a otras situaciones de estrés. La formación de esporas ocurre en diversos nichos naturales o ambientes asociados a las actividades agrícolas e industriales (Carlin, 2011). Los factores que contribuyen a su formación no están claramente entendidos. Las esporas se componen de un área central (protoplasto), el cual contiene el material genético, rodeada por la membrana cortical y la corteza, todo lo que está encerrado en la capa de la espora. Algunas especies, tales como *Geobacillus stearothermophilus* y *B. cereus*, pueden tener una capa externa llamada exosporium (Ellar, 1966; Seale, 2009) mientras que otras especies pueden tener apéndices (Ankolekar y Labbe, 2010). La principal diferencia en cuanto a la composición de las esporas entre especies es la estructura y el número de capas de la espora, mientras que la corteza y el área central son muy similares (Aronson y Fitzjames, 1976; Atrih y Foster, 2001; Tipper y Gauthier, 1972).

La formación de esporas es un proceso complejo, se divide en una serie de etapas que son muy similares entre bacterias aeróbicas y anaeróbicas facultativas. La presencia de minerales como Mg, Ca, y K son importantes para crear la capa protectora, así como para activar el proceso de esporulación (Vinter, 1969). El calcio forma parte de la endospora, es el mineral que se encuentra en mayor concentración y además actúa incrementando la expresión de genes relacionados al proceso de esporulación (Oomes et al., 2009). Estos minerales se encuentran disponibles en muchos sustratos, particularmente en la leche.

La resistencia de las esporas es amplia, soportan tratamientos térmicos intensos, la disrupción mecánica y un amplio espectro de productos químicos, que hacen difícil su eliminación de la industria. Esta resistencia les permite superar condiciones de baja actividad de agua entre otras cosas gracias a una membrana impermeable, el cortex de peptidoglicano, pequeñas proteínas solubles en ácido (SAPs) y ácido dipicolínico (DPA) (Cortezzo y Stelow 2005; Cortezzo al., 2004; Driks, 2002; Nicholson et al., 2000; Setlow, 2005; Setlow et al., 2006).

La mayor resistencia al calor es debida a su baja actividad de agua y a su mineralización. Los cationes divalentes como el calcio forman parte del área central de la espora junto con DSA (Stelow 2005), y la capacidad de acumular calcio se relaciona con la resistencia al calor (Ej. *Bacillus sporotermotransiens*) (Scheldeman et al., 2006).

Estudios previos demuestran la importancia de los minerales divalentes como el calcio y el magnesio en el crecimiento y la esporulación de diferentes especies de *Bacillus* (ej. *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *B. cereus*), donde se demostró que la mayor resistencia al calor de las esporas de microorganismos que esporularon ocurre en un medio provisto de iones de Ca y Mg (Cazemier et al., 2001).

Estudios anteriores concluyeron que las esporas formadas a temperaturas mayores generalmente tienden a ser más resistentes al calor respecto a aquellas esporas que se forman a la temperatura óptima de crecimiento de la especie (Beaman y Hard, 1986; Etoa y Michiels, 1988; Palop et al., 1999; Sang y Sim, 2006).

La resistencia de la espora frente al calor muestra resultados controversiales para el género *Bacillus*. Algunos autores reportan que solo las esporas de *Geobacillus* spp tienen potencial

para sobrevivir a tratamientos de 134 a 145 °C durante 1 a 10 segundos (Schwarzenbach y Hill, 1999), mientras que otras publicaciones indican que las esporas de *B. sporothermodurans*, *B. licheniformis* y *B. cereus* sobrevivieron a tratamientos térmicos de 135°C durante 10 segundos (Mostert et al., 1979). Los resultados indican que la resistencia de las esporas aisladas de productos deteriorados es mayor que la observada en cepas de laboratorio (Brul et al., 2011). Un estudio realizado por Scheldeman et al. (2005) reveló una amplia diversidad de bacterias formadoras de esporas altamente resistentes al tratamiento térmico (100 °C por 30 min), con una importante fracción perteneciente a especies todavía no descritas. La naturaleza altamente resistente de las esporas del género *Bacillus* implica que es especialmente importante prevenir la contaminación inicial de la leche cruda a nivel de la producción en el tambo (Coorevits et al., 2008).

Las esporas pueden permanecer mucho tiempo esperando las condiciones óptimas para germinar. Trabajos realizados por Ronimus et al. (2006) demostraron la recuperación de *B. sporothermodurans* y *B. licheniformis* de leche en polvo luego de 90 años de producida.

La activación de la espora para formar la célula vegetativa involucra tres estados: activación, germinación y crecimiento (Russell, 1982). La activación no es un mecanismo totalmente esclarecido, aunque se acepta que la espora es activada antes de que ocurra la germinación y en él intervienen factores como temperatura, descenso de pH y productos químicos (Ghosh et al., 2009, Iciek et al., 2006, Kim y Foeggeding, 1990, Vries, 2006).

En la industria láctea la activación térmica de microorganismos esporulados es un proceso común, dado que los tratamientos térmicos son usados en forma rutinaria para la conservación del producto. El proceso de activación es específico de la especie. A modo de ejemplo las esporas de *G. stearothermophilus* pueden activarse a temperaturas superiores a 110°C, mientras que las de *B. subtilis* pueden activarse a temperaturas de 65-70 °C (Finley y Fields, 1961; Leuschner y Lilloford, 1999).

1.4. Importancia de los esporulados aeróbicos (*Bacillus*) en la industria láctea

Las especies del género *Bacillus* son una importante fuente de contaminación en la industria láctea y su presencia es un indicador de higiene inadecuada. Las especies contaminantes del género *Bacillus* tienen la capacidad de fijarse a la superficie de las líneas de producción formando un biofilm y el deterioro del producto puede ser ocasionado por la producción de enzimas (proteolíticas, lipolíticas y amilolíticas) capaces de degradar los componentes lácteos u otros productos que utilizan lácteos en su manufactura. Por otra parte, la presencia de esporas en los polvos lácteos reduce por sí mismo el valor del producto cuando supera los límites requeridos por el comprador. Aún en productos como la leche esterilizada comercial, el deterioro causado por especies del género *Bacillus* se produce frecuentemente, aunque esto es mayormente causado por enzimas termoestables o por recontaminación del producto esterilizado durante el envasado (Chen et al., 2004, Westhoff y Dougherty, 1981).

Durante la producción de leche en polvo, las bacterias termofílicas son capaces de crecer y producir esporas dentro de las secciones de regeneración de los intercambiadores de calor y en los evaporadores (Stadhouders et al., 1982; Warnecke 2001; Scott et al., 2007). Usualmente la concentración de esporulados es baja en la leche cruda que ingresa al proceso (Flint et al., 2001). La forma en que el crecimiento es posible es a través de la adhesión y formación de biofilm en las superficies del equipamiento. El crecimiento en biofilms es una forma frecuente de contaminación de los equipamientos de la industria láctea. En la formación del biofilm se adhieren células microbianas sobre las superficies de contacto de la leche generando microcolonias y una vez fijadas inician la producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que las encierran y protegen (Costerton et al. 1994; Flint et al. 1997)

En la industria láctea, los aislamientos formadores de biofilm más comunes son *Streptococcus* termofílicos y especies del género *Bacillus* o géneros estrechamente relacionados. Los biofilms desarrollados a partir de estos organismos se denominan frecuentemente biofilms de proceso (Flint et al. 1997). Los biofilm de proceso son generalmente dominados por una sola especie

debido a las presiones de selección que ejerce el proceso de manufactura y normalmente tienen una baja densidad celular 10^6 - 10^7 células/cm² (Hood and Zottola 1997; Flint et al. 1997, 1999, 2001; Parkar et al. 2003). Los *Streptococcus* forman biofilms predominantemente en las placas de los intercambiadores (PHE) de los pasteurizadores y mayormente afectan a la industria quesera (Flint et al., 1999; Knight et al., 2004). Los *Bacillus* termofílicos, en particular *Anoxybacillus flavithermus* y *Geobacillus* spp., son los contaminantes termofílicos más comunes en la producción de leche en polvo (Ronimus et al., 2003, 2006, Rueckert et al., 2004, Scott et al., 2007).

Los trabajos de investigación a nivel de laboratorio indican que tanto las esporas como las células vegetativas pueden adherirse al acero inoxidable del equipamiento (Parkar et al., 2001; Flint et al., 2001; Seale et al., 2008). Husmark y Ronner (1992) consideran que las esporas generalmente se adhieren a las superficies a una tasa mayor que las células vegetativas, lo cual es favorecido por la alta hidrofobicidad de las esporas. Lograda la adhesión a la superficie, las esporas germinan y las células vegetativas se reproducen para formar el biofilm. La próxima fase no está muy clara pero se considera que la esporulación se da en el propio biofilm, que posteriormente se desprende contaminando masivamente el producto. Trabajos recientes (Baril et al., 2012) indican que la dinámica de esporulación es afectada por factores ambientales como la temperatura, el pH y la actividad de agua (a_w). La presencia de esporas en la leche en polvo puede generar deterioro de los productos manufacturados cuando se reconstituye la leche en polvo como ingrediente de otros alimentos (Flint et al., 2001)

Las temperaturas óptimas de crecimiento varían dentro del género *Bacillus*. Las especies termófilas del género logran su crecimiento óptimo a temperaturas de 40 a 68 °C y las especies de importancia para la industria láctea son *A. flavithermus* y *Geobacillus stearothermophilus*. Otras especies de importancia son mesófilos y adicionalmente se comportan como termófilos facultativos. Dentro de este grupo tienen importancia: *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *B. sporothermodurans*, entre otros. La presencia de bacterias formadoras de esporas, y su habilidad de crecer bajo condiciones de refrigeración que contribuyen al deterioro de la leche pasteurizada (*Bacillus* spp y *Paenibacillus* spp.) y emergen como una barrera biológica que limitan la extensión de la vida útil de los productos lácteos fluidos (Huck et al., 2008). Los miembros del género *Bacillus* tienen requerimientos nutricionales simples, sin

necesidades específicas de aminoácidos, y pueden crecer en un medio simple como TSA (Agar Triptona de Soya) (Burgess et.al., 2010).

La presencia de *Bacillus* en la industria láctea se asocia frecuentemente a una inadecuada higiene de los procesos productivos. La resistencia a los tratamientos térmicos permite la sobrevivencia de estos organismos a procesos de pasteurización (Andersson et al., 1995), y tratamientos más agresivos como UHT (Pettersson et al., 1996, Scheldeman et al., 2005, 2006). Entre las especies que causan efectos sobre la salud del consumidor, se destaca *B. cereus*, aunque se han reportado cepas específicas de otras especies capaces de producir toxinas (*B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*) que han sido involucradas en incidentes de intoxicación alimentaria (Griffiths, 1995). *B. cereus* sobrevive a la pasteurización, produce diferentes enterotoxinas que pueden causar problemas de salud y muchas de sus cepas pueden crecer a temperaturas de 4-6 °C (Granum, 2002). *B. weihenstephanensis* es una especie psicrotolerante que integra el grupo *B. cereus* (Lechner et al., 1998), y crece a 4-7°C pero no a 43 °C, y puede ser identificada rápidamente usando PCRs de 16s rDNA y *cspA*. Los aislamientos de microorganismos psicrotrofos termodúricos generalmente pertenecen al género *Bacillus* y más raramente al género *Clostridium* (Johnston y Bruce, 1982).

Otras especies de *Bacillus* son capaces de producir toxinas lábiles a los tratamientos térmicos, entre ellas: *B. circulans*, *B. lentus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* (Beattie y Williams, 1999) y *B. pumilus* (Lindsay et al., 2000). Adicionalmente a los efectos tóxicos debidos a *B. cereus*, esta bacteria participa en los defectos denominados cuajada dulce y crema amarga (Heyndrickx y Scheldeman, 2002)

Los *Bacillus* termofílicos son difíciles de eliminar a causa de su amplio rango de crecimiento, su alta tasa de crecimiento, la resistencia de sus esporas a los tratamientos térmicos y a los químicos utilizados en la limpieza y desinfección, así como por su habilidad de formar biofilms. Los microorganismos que forman parte del biofilm son más resistentes que las células vegetativas a los agentes químicos del CIP (Clean In Place) y a los sanitizantes utilizados. Existen evidencias que el biofilm protege a las células bacterianas contra los químicos del CIP y que las células viables se mantienen adheridas a las superficies de los equipos de la planta posteriormente a la limpieza (Flint et al., 1999)

1.5. Importancia de los esporulados anaeróbicos (*Clostridium*) en la industria láctea

Las especies del género *Clostridium* son formadoras de esporas que crecen en anaerobiosis y tienen la capacidad de fermentar la lactosa a ácido butírico (Ingham et al., 1998, Klijn et al., 1995). En la industria láctea la hinchazón tardía afecta específicamente a quesos duros y semiduros que maduran por períodos extensos y tiene origen en la fermentación de lactosa por especies de *Clostridium*. La hinchazón tardía es una forma de deterioro que aún causa pérdidas económicas significativas en el mundo (Drouin y Lafrenière, 2012). El valor comercial de los quesos contaminados se pierde, y los productos con estas características se derivan a otros destinos (quesos procesados) que recuperan una parte del valor original (Le Bourhis et al., 2005). En muchos casos este fenómeno es debido a la acción de bacterias propiónicas (PAB) que fermentan la lactosa/lactato a ácido propiónico. Esto contribuye a la presencia de sabor a nuez y de “ojos” característicos del queso suizo (Sheehan et al., 2008). El defecto de producción tardía de gas en quesos suizos u otros tipos puede ocurrir en unas pocas semanas de la elaboración hasta los 4-6 meses de maduración. Hay muchos factores que intervienen en la producción irregular de gas, en los que se incluye la presencia de bacterias ácido butíricas (*Clostridium* spp), bacterias lácticas heterofermentativas (FHL), *Lactobacillus* tolerantes a la sal, y crecimiento anormal de bacterias propiónicas. Los quesos de ojos son particularmente muy sensibles debido a las altas temperaturas de maduración (~20 °C), al bajo contenido en sal y baja acidificación, todo lo que favorece la germinación. Por otra parte, las especies de *Clostridium* pueden afectar la vida útil de otros productos lácteos (Bassi et al., 2013).

Los principales microorganismos responsables de la “hinchazón tardía” son clostridios butíricos (*C. tyrobutyricum*, *C. sporogenes*, *C. beijerinckii* y *C. butyricum*) formadores de esporas que pertenecen al *phylum* Firmicutes. Estos organismos están presentes en el suelo y desde esta fuente pueden entrar al alimento animal, incluyendo el ensilado, pasando por el tracto digestivo, concentrándose en las heces y finalmente contaminan la leche utilizada para la producción de quesos.

Entre los clostridios butíricos, *Clostridium tyrobutyricum* es un agente de deterioro frecuentemente encontrado en quesos duros y semiduros (Ingham et al., 1998, Klijn et al., 1995, Le Bourhis et al., 2005). Los principales productos de fermentación de este microorganismo son ácido butírico, ácido acético, dióxido de carbono e hidrógeno, que causan el defecto mencionado en el queso. Estos productos del metabolismo resultan en la producción de ojos irregulares, exfoliaciones y rajaduras, junto con un sabor indeseable (Klijn et al., 1995, Le Bourhis et al., 2005, Vissers et al., 2006). El proceso de maduración del queso es afectado cuando las esporas germinan debido a los efectos de diferentes factores y compuestos en el queso, como el pH, temperatura, aminoácidos y sales (Bassi et al., 2009; Ingham et al., 1998). La estrategia para el control del deterioro está principalmente basada en el uso de aditivos, tales como nitrato y lisozima, durante la manufactura de quesos duros. Estos aditivos limitan la germinación y crecimiento de *Clostridium* y su acción puede ser diferente de acuerdo a las cepas que están involucradas en la hinchazón tardía.

Las esporas en la leche aumentan en forma significativa en los sistemas en que las vacas se encierran en los períodos invernales, como muchos países del norte de Europa o Estados Unidos. La contaminación de la leche proviene del suelo, las heces, las camas, el alimento, el aire y el equipo de ordeño. Durante el período de encierro, las vacas no están en contacto con el suelo como los están en el período de pastoreo, pero las tetas pueden ser contaminadas por las heces y el material de las camas. El ensilaje es considerado como la fuente más importante de contaminación (Dasgupta y Hull, 1989). Los esporulados anaeróbicos están principalmente constituidos por especies de *C. tyrobutyricum* y *C. sporogenes* que normalmente se asocian al defecto de hinchazón tardía por su habilidad de fermentar ácido láctico. Las esporas de microorganismos anaeróbicos y aeróbicos tienen importancia en el silo y varían en los diferentes períodos del año (te Giffel et al., 2002). Adicionalmente, otras especies de *Clostridium* como *C. beijerinckii* y *C. butyricum* contribuyen en forma importante a la aparición del defecto presente en los quesos (Cocolin et al., 2004, Klijn et al., 1995, Le Bourhis et al., 2005, 2007). En la figura 1 se presentan las principales vías de contaminación de la ubre durante el proceso de producción y su transmisión a la leche en el tanque de frío.

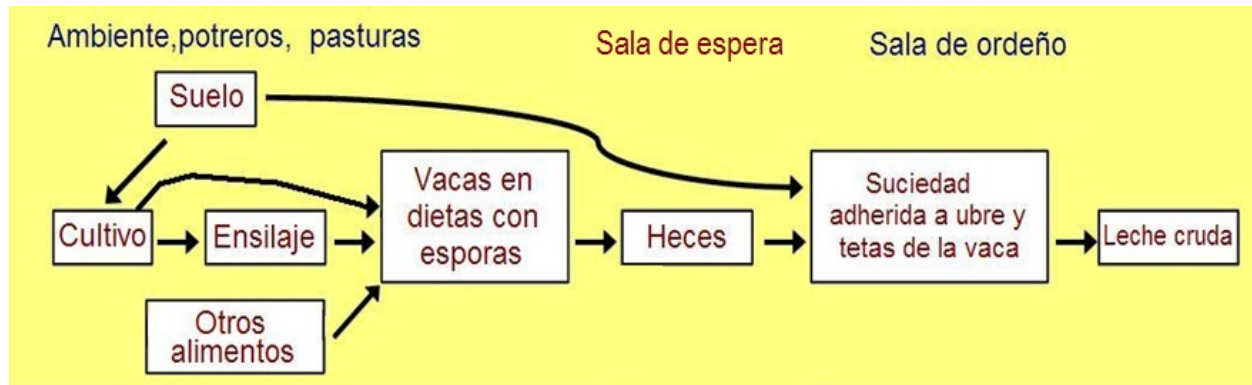


Figura 1. Dinámica de contaminación de la leche con microorganismos esporulados durante el ordeño (modificado de Vissers et al., 2006)

Estudios realizados por Le Bourhis et al. (2007) indican que la evolución de los esporulados anaeróbicos muestra diferencias numéricas y metabólicas durante el proceso de maduración de quesos Emmental. En particular estos autores demostraron que *C. sporogenes* y *C. beijerinckii* fueron menos importantes que las esporas de *C. tyrobutyricum*, dado que estas últimas se desarrollaron más rápido y mostraron mayor tasa de crecimiento en las condiciones de maduración de estos quesos. Otros autores han confirmado la predominancia de *C. tyrobutyricum* en leche y quesos con hinchazón tardía, utilizando otras técnicas de análisis automatizado (Panelli et al., 2013).

Las principales especies de *Clostridium* que se asocian a enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son *C. botulinum* y *C. perfringens*, y mucha información ha sido generada hacia definir los tratamientos térmicos requeridos para inactivar sus esporas y las condiciones ambientales que previenen su crecimiento en el alimento (Ghoddusi et al., 2013).

1.6. Alternativas de control de microorganismos esporulados

El control de la concentración de microorganismos esporulados debe basarse en una serie de medidas que se inician en la fase de producción y cosecha de la leche en el tambo. Las normas de higiene en el tambo constituyen una condición previa para el logro de leche de calidad y con bajo recuento de microorganismos esporulados. La limpieza de la vaca en el momento del ordeño es importante en la producción higiénica de leche, asegura el bienestar de la vaca y mantiene la salud de la ubre de la vaca (Breen et al., 2009). La presencia de barro en los accesos al tambo y cambios de alimentación que generan heces sueltas, incrementan la contaminación de la ubre y conducen a la necesidad de intensificar las prácticas de limpieza (Hughes, 2001; Ward et al., 2002). La alimentación con ensilaje incrementa los recuentos de esporulados en las épocas de utilización de los mismos (Visser et al., 2007), y en algunos países productores de queso se prohíbe el uso de ensilaje en leche destinada a la producción de algunos quesos (quesos de ojos) con denominación de origen. Arias et al. (2013) indican que la leche ovina proveniente de animales que consumen ensilaje presentan promedialmente más de dos veces y media más esporulados anaeróbicos. La intensificación de la producción lechera en el país ha incrementado el uso de reservas forrajeras, particularmente ensilaje, y esto constituye un riesgo para la presencia de estos microorganismos.

A nivel de la planta industrial, la microfiltración y la bactofugación constituyen formas físicas para la remoción de microorganismos y esporas. En la microfiltración la remoción se realiza por tamaño y en el caso de la leche la mayoría de los glóbulos grasos y algunas proteínas son de tamaño similar o mayor a las bacterias. El alto grado de incrustación de grasa en las membranas de microfiltrado cuando se utiliza leche entera conduce a que este método deba realizarse con leche previamente descremada (Garde et al., 2011).

En el caso de la bactofugación el principio de separación es la fuerza centrífuga, aprovechando las diferencias en densidad de las esporas. En este método de separación la fracción que contiene las esporas es aproximadamente el 3% de la leche procesada y no asegura la ausencia de esporas de *Clostridium* en la leche destinada a la producción de queso (Garde et

al., 2011). En la producción de quesos, el control de *Clostridium* se realiza por la aplicación de nitratos o lisozima. Los nitratos han sido prohibidos en muchos países por sus consecuencias en la salud del consumidor y la lisozima es aceptada, aunque existe controversia en relación a las posibles consecuencias en consumidores alérgicos a productos obtenidos de huevo (Schneider et al., 2011). Desde tiempo atrás, se han aislado y cultivado bacterias lácticas (LAB) o cultivos acompañantes (NSLAB) con acción específica sobre especies de *Clostridium*, que inhiben el crecimiento durante el período de maduración del queso (Anastasiou et al., 2009). Con este último enfoque existen en el mercado empresas que comercializan LAB o NSLAB con actividad específica para el control del crecimiento de *Clostridium*.

2. OBJETIVO GENERAL

Cuantificar e identificar las principales especies de microorganismos termodúricos esporulados en leche cruda y leche pasteurizada comercial.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar los recuentos de esporulados aerobios y anaerobios presentes en leche cruda y leche pasteurizada comercial.
- b) Caracterizar fenotípicamente y por técnicas moleculares las especies esporuladas aerobias y anaerobias presentes en leche curda y leche pasteurizada comercial.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Muestras de leche cruda y pasteurizada comercial

Se procesaron veintidós (n=22) muestras de leche pasteurizada de diferentes marcas disponibles en superficies comerciales de Montevideo y diecisiete (n=17) muestras de leche cruda provenientes de tanques de frío con agitación de tambos de productores del Departamento de Colonia. Las muestras de leche cruda fueron recolectadas en frascos estériles, debidamente identificadas y transportadas bajo refrigeración al Laboratorio de la Unidad de Tecnología de los Alimentos-Facultad de Agronomía donde se procesaron el mismo día de arribo.

La preparación de los medios de cultivo utilizados y materiales de trabajo fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Las excepciones a este procedimiento se citan en el texto cuando corresponda. Todos los procedimientos que implican la utilización de material estéril se realizaron en campana de flujo laminar.

3.2. Recuento de bacterias termodúricas esporuladas

Todas las muestras de leche, tanto la leche pasteurizada comercial de diferentes marcas, así como las muestras de leche cruda provenientes de tambo fueron tratadas térmicamente en baño maría durante 10 minutos a 80 °C. Este procedimiento se realizó para eliminar las formas vegetativas sensibles al tratamiento térmico y a la vez provocar la activación de las endosporas bacterianas. Luego de este tratamiento, se procedió a realizar todos los ensayos posteriores.

3.2.1. *Recuento de esporulados aerobios.*

Los recuentos de bacterias esporuladas aeróbicas se realizaron a partir de diluciones seriadas 10^{-1} , 10^{-2} en 9 mL de solución salina fisiológica (0.85% de NaCl), por duplicado. Se transfirieron 100 μ L de cada una de las muestras a placas de medio PCA (Plate Count Agar, Oxoid) adicionada con caseína al 1%, mediante siembra en superficie. Los resultados obtenidos se expresaron en unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/mL), luego del periodo de incubación de 72 h a 37° C.

3.2.2. *Recuento de esporulados anaerobios.*

El recuento de bacterias esporuladas anaerobias, se realizó través de la técnica del Número Más Probable (NMP). A partir de cada muestra se realizaron diluciones seriadas (10^0 , 10^{-1} y 10^{-2}) en tubos de ensayo con solución de citrato al 2%. A partir de estas diluciones se sembró 1 mL de cada dilución (por triplicado) en tubos de ensayo que contenían 9 mL del medio Clostridial Reinforced Agar (RCA, Oxoid), se cubrieron con 2 mL de una mezcla de vaselina y parafina (6:1) creando las condiciones de anaerobiosis luego de someter a las muestras a un shock térmico de 80 °C por 10 minutos en baño María. Los tubos se incubaron a 37°C durante 7 días, considerando positivos aquellos tubos que provocaron el desplazamiento del tapón a causa de la producción de gas (Le Bourhis et al., 2005). El NMP de esporulados (esporas/mL) se obtuvo mediante la comparación del número de tubos positivos para cada dilución con tablas de probabilidad diseñadas para esta prueba.

En muestras con recuentos bajos (MNP < 300 ufc/L) la leche proveniente de tanque de frío de tambos y las comerciales, fueron centrifugadas usando tubos Falcon de 50 mL a 10000 rpm por 15 minutos. Luego de eliminar la crema de la fase superior, los “pellets” obtenidos se hidrataron con 100 μ L de agua estéril en cada tubo de Eppendorf y las muestras hidratadas individualizadas fueron transferidas a tubos estériles con 5 mL de agua peptonada.

3.3. Caracterización fenotípica y bioquímica

3.3.1. Descripción macroscópica y microscópica de colonias bacterianas y pruebas bioquímicas.

Luego del recuento de los esporulados aeróbicos en placa de PCA-caseína, se procedió a la descripción macroscópica de las colonias crecidas, parámetro que tomamos en cuenta para reagrupar aquellas colonias que morfológicamente presentaban similitud. La evaluación macroscópica tiene en cuenta el tamaño, color, elevación y tipo de borde de las colonias.

Cuatro (4) colonias por muestra (17 muestras de leche cruda y 22 muestras de leche pasteurizada) fueron aisladas nuevamente y se transfirieron a placas de PCA-caseína usando ansa estéril, y se incubaron por un período de 48 h a 37 °C. Las colonias obtenidas luego de la incubación fueron evaluadas para confirmar la descripción macroscópica realizada previamente y posteriormente se procedió a determinar la morfología bacteriana, la presencia y posición de las esporas de cada una de las cepas aisladas, mediante tinción de Gram y observación microscópica.

Las pruebas bioquímicas realizadas en los aislamientos de esporulados aeróbicos fueron: a) Oxidasa, utilizando el método convencional tomando como positivas aquellas colonias que producían una modificación del color en los discos (B BBL, France) desde rosado a fucsia cuando se extendía un palillo de madera estéril que tocó previamente la colonia evaluada, b) Catalasa, mediante el método de rutina y tomando como positivas aquellas colonias que producen burbujas por la presencia de la enzima catalasa que actúa sobre el peróxido de hidrógeno y Actividad proteolítica, evaluada mediante cultivo en PCA-caseína y considerando positivas aquellas colonias que tenían a su alrededor un halo de proteólisis, incubadas a 37° C por 48h.

Para los esporulados anaeróbicos, luego de determinar el NMP (esporas/mL) se procesaron 73 tubos que produjeron gas (positivos) pertenecientes a las 39 muestras para el proceso de caracterización de aislamientos. Estos tubos se trataron nuevamente a 80 °C por 10 minutos con el objetivo de eliminar células vegetativas, reducir otras especies termodúricas productoras de gas y provocar la activación de las esporas. Luego se procedió a transferir 1 ml de cada tubo positivo y realizar una siembra incorporada en placas con el medio de cultivo RCA. Estas placas fueron incubadas durante 7 días a 37°C en bolsas de anaerobiosis (Anaerogen Compact, Oxoid). De las placas cultivadas se obtuvieron cuatro (4) aislamientos por muestra que fueron sometidos a tinción de Gram, probados por su inhabilidad de crecer bajo condiciones aeróbicas en RCA y examinados morfológicamente para detectar la presencia de endosporas utilizando un microscopio de contraste de fase (Olympus CX41). La prueba de actividad de catalasa fue evaluada directamente en los cultivos en RCA en campana de flujo laminar que se dejaron 1 hora antes de pulverizar la placa con H₂O₂. La prueba de oxidasa se realizó en la misma forma descrita para esporulados aeróbicos.

Los aislamientos de esporulados aeróbicos y anaeróbicos fueron conservados mediante congelación a -20 °C en caldo TSB (Caldo Triptona de Soya, Oxoid) con 15 % de glicerol.

3.4. Caracterización genotípica de los aislamientos

3.4.1 *Extracción de ADN genómico*

Para el procesamiento de las cepas aisladas se procedió a descongelar las cepas aisladas en el proceso previo. Se inocularon tubos con 3 mL de TSB con cultivos puros de cada aislamiento y se incubaron a 37°C durante 24 h, bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas de acuerdo a la procedencia del aislamiento. Las células se cosecharon a 10000 rpm durante 10 minutos en una centrífuga Spectrofuge 7M (Labnet International Inc. USA). El DNA fue purificado utilizando un Kit comercial de DNA genómico (ZR Fungal/Bacterial, DNA Miniprep, Zymo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente se determinó la concentración del DNA

extraído en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific Incorporation, Wilmington, DE, USA), se alicuotó y se utilizó como molde en las reacciones de amplificación. La extracción fue validada haciendo una electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) y realizando la tinción con Good View (SBS Genetech Co., Ltd). Las bandas se visualizaron en un transiluminador UV.

3.4.2. *Análisis de la secuencia del gen 16S rDNA*

Los aislamientos seleccionados fueron identificados mediante análisis de secuencia del gen ARNr 16S. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 µl conteniendo: 1X Thermo buffer (Fermentas, USA), 2,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP (Fermentas, USA), 1U Taq polymerase (Fermentas, USA), 0,2 mM de cada cebador [fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3')] (Weisburg et al., 1991) y 20 ng de ADN molde. La amplificación se realizó en las siguientes condiciones: desnaturalización a 94° C por 7 min., seguido de 35 ciclos de 94° C por 1 min., 56° C por 1 min. y 72° C por 1 min. y una extensión final por 10 min. Todos los experimentos incluyeron un control negativo sin DNA molde. Los productos fueron purificados y secuenciados MacroGen Sequencing Service, Korea. Las secuencias de DNA se compararon con las depositadas en la base de datos NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para la identificación de los aislamientos basados en la similitud de secuencias.

3.4.3. *Identificación por RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) de esporulados aeróbicos.*

La identificación de esporulados aeróbicos fue realizada por RAPD utilizando OPR13 como cebador. El análisis se realizó en 25 µl de reacción conteniendo: 1X Thermo buffer (Fermentas, USA), 2.5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP (Fermentas, USA), 1U de Taq polimerasa (Fermentas, USA), 1 µM de primer OPR13 (5'-GGACGACAAG-3') (Ronimus et al., 1997) y 5 µL de DNA molde. Las mezclas de reacción se procesaron en un termociclador Corbett CG1-96 thermal cycler (Corbett Research Ltd., Cambridge, UK) según el siguiente programa:

desnaturalización a 94°C por 3 min y 45 seg.; luego fueron sometidos a 35 ciclos cada uno de: 94°C por 15 s, 36°C por 15 s y 72°C por 2 min.; y un paso de extensión final de 72°C por 4 min. (Ronimus et al., 1997). Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa al 1.5% utilizando buffer Tris-Borato- EDTA (TBE) y conteniendo 0.5 µg/ml de Good View (SBS Genetech Co., Ltd). El marcador de peso molecular utilizado fue GeneRuler 100pb Plus DNA Ladder (Fermentas Life Sciences), se sembraron 10 µL del producto de amplificación por pocillo. La electroforesis se realizó a 106 V por 1 h. Las bandas se visualizaron en un transiluminador UV.

3.4.4. Identificación por ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) de aislamientos esporulados anaeróbicos.

Los amplicones de 16S RNAr fueron digeridos por reacción con 2U de la enzima de restricción *HhaI* (Biolabs, New England) e incubados a 37° C por 12h de acuerdo a la técnica utilizada por Janoskova et al. (2004). Los perfiles de restricción fueron analizados en geles de agarosa al 2%, utilizando buffer Tris-Borato- EDTA (TBE) y Good View (SBS Genetech Co., Ltd) (Garde et al. (2010). Las bandas se visualizaron en un transiluminador UV. El marcador de peso molecular utilizado fue GeneRuler 100pb Plus DNA Ladder (Fermentas International Inc., USA), se sembraron 20 µL del producto de digestión por pocillo de las muestras analizadas y cepas de referencia (ATCC). La electroforesis se realizó a 70 V. Las bandas se visualizaron en un transiluminador UV.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Recuento de bacterias esporuladas aerobias en leche

En el Cuadro 2 se presenta el resultado de los recuentos en placa de esporulados aeróbicos ($\log_{10}$ ufc/mL) y número más probable (NMP) de esporulados anaeróbicos ($\log_{10}$ NMP/L). La información obtenida indica una tendencia a un promedio superior para esporulados aeróbicos y anaeróbicos presentes en la leche cruda, respecto a los obtenidos en leche pasteurizada. En igual forma que los resultados de otros autores, una proporción importante de microorganismos esporulados (aeróbicos y anaeróbicos) son capaces de soportar los tratamientos térmicos aplicados en la industria y permanecer en la leche fluida comercial (Cosentino et al. 1997; Klijn et al. 1997; Montanari et al. 2004; Scheldeman et al. 2005).

Cuadro 2. Recuentos en placa de esporulados aeróbicos ($\log_{10}$ ufc/mL) y anaeróbicos ($\log_{10}$ NMP/L) en leche cruda en el tambo y leche pasteurizada (promedio $\pm$ e.e.).

Muestra	n	Esporulados aeróbicos (Log10 UFC/mL)	Esporulados anaeróbicos (Log10 NMP/L)
Leche cruda	17	3.18 $\pm$ 0.71	3.19 $\pm$ 0.74
Leche pasteurizada	22	2.38 $\pm$ 0.51	2.56 $\pm$ 0.42

A diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo, otros autores han encontrado ligeros incrementos de esporulados aeróbicos posteriormente a la pasteurización (Ghellai y Moussaboudjemaa, 2013, Sharma y Anand, 2002). Los incrementos observados luego de la pasteurización se atribuyen a la activación de las esporas causadas por el tratamiento térmico (Griffith et al., 1986, Scheldeman et al., 2002). Tratamientos más intensos como ultra alta temperatura (UHT) redujeron el recuento de esporulados aeróbicos respecto a los de la leche en polvo utilizada para reconstruir la leche fluida (Ghellai y Moussaboudjemaa, 2013). La reducción en los recuentos de esporulados (aeróbicos y anaeróbicos) encontrada en este trabajo puede ser debida a que las muestras de leche cruda pertenecen a diferentes períodos,

variando la concentración de microorganismos en cada época del año, o a una reducción originada por el tratamiento térmico de microorganismos termodúricos no esporulados que normalmente integran los recuentos de ambos grupos. Por otra parte, debe considerarse que las concentraciones de esporulados aeróbicos y anaeróbicos presentan una amplia variabilidad entre predios, que están directamente asociados a diferencias en la higiene y ambiente de los tambos (Gibson et al., 2008).

4.2. Identificación de aislamientos de las muestras procesadas

Los aislamientos obtenidos de las placas de recuento (incubación aeróbica) y los tubos de número más probable (incubación en anaerobiosis) fueron analizadas por microscopía y pruebas bioquímicas de rutina. Los aislamientos de esporulados aeróbicos se caracterizaron por ser Gram +, oxidasa negativos y catalasa positivos, mientras que los esporulados anaeróbicos fueron Gram +, oxidasa negativos y catalasa negativos. En los aislamientos de esporulados aeróbicos se evaluó la actividad proteolítica de las cepas aisladas encontrando que el 68% de las mismas presentaron actividad media a alta que se asocia al deterioro que puede causar a la leche y a los productos lácteos.

4.2.1. Identificación de aislamientos esporulados aeróbicos por RAPD-PCR y secuenciación del gen 16S rDNA.

Los aislamientos fueron identificados mediante RAPD-PCR usando OPR13 como cebador que permite identificar las principales especies del género *Bacillus* y los géneros relacionados con este. Los perfiles obtenidos fueron caracterizados y confirmados por medio de secuenciación del gen 16S rDNA.

En las Figuras 2 y 3 se presentan los perfiles de RAPD-PCR para las principales especies aisladas de leche cruda y pasteurizada comercial, respectivamente. Las cepas aisladas fueron comparadas con patrones de esporulados aeróbicos de leche y productos lácteos disponibles

en el Laboratorio de Tecnología de los Alimentos. Adicionalmente, algunos perfiles fueron confirmados por medio de secuenciación del gen 16S rDNA.

En el Cuadro 3 se presentan la proporción de especies identificadas durante el trabajo. En los aislamientos esporulados aeróbicos se identificaron 123 aislamientos, predominando las especies de *B. licheniformis* (45.5%), *B. pumilus* (19.5%) y *B. subtilis* (12.2%), y especies de menor importancia como *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. sphaericus*, *B. amyloliquefaciens*, *Bacillus spp.* y *Lysinibacillus spp.* Las especies identificadas en los muestreos coinciden en forma básica con los contaminantes de la leche en polvo reportados en Uruguay (Reginensi et al., 2011).

La técnica utilizando el cebador OPR13 ha sido validada en otros trabajos para la identificación de las cepas principales de *Bacillus* que contaminan productos lácteos (Reginensi et al., 2011, Rominus et al., 1997, Rüeckert et al., 2004).

Diferentes autores han identificado especies del género *Bacillus* en leche y productos lácteos, entre los cuales Lüking et al (2013) encontraron resultados similares en las especies principales señalando que *B. licheniformis* y *B. subtilis* constituyen dos de las tres especies principales encontradas en la industria láctea. Indican también la importancia de estas especies en la actividad proteolítica y lipolítica que ejercen sobre los productos manufacturados e intervienen en su deterioro. Asimismo, *Geobacillus stearothermophilus* es considerada la tercera especie en importancia que, sin embargo no fue aislada en este trabajo y no fue reportada en trabajos previos (Reginensi et al., 2011). Por su parte, Ivy et al. (2012) también reportan una población similar del género *Bacillus*, integrada por *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. mycoides*, *B. megaterium*, *B. cereus* y *B. weihenstephanensis*. Sin embargo estos autores identificaron especies del género *Paenibacillus* (*P. odorifer*, *P. graminis* y *P. amylolyticus*) que no fueron encontrados en este trabajo. La presencia de este *Paenibacillus* en leche fluida se incrementa bajo condiciones de almacenamiento, bajo refrigeración prolongada de la leche cruda y en

leche pasteurizada (Ranieri et al., 2009). Las evidencias presentadas por este grupo de investigación

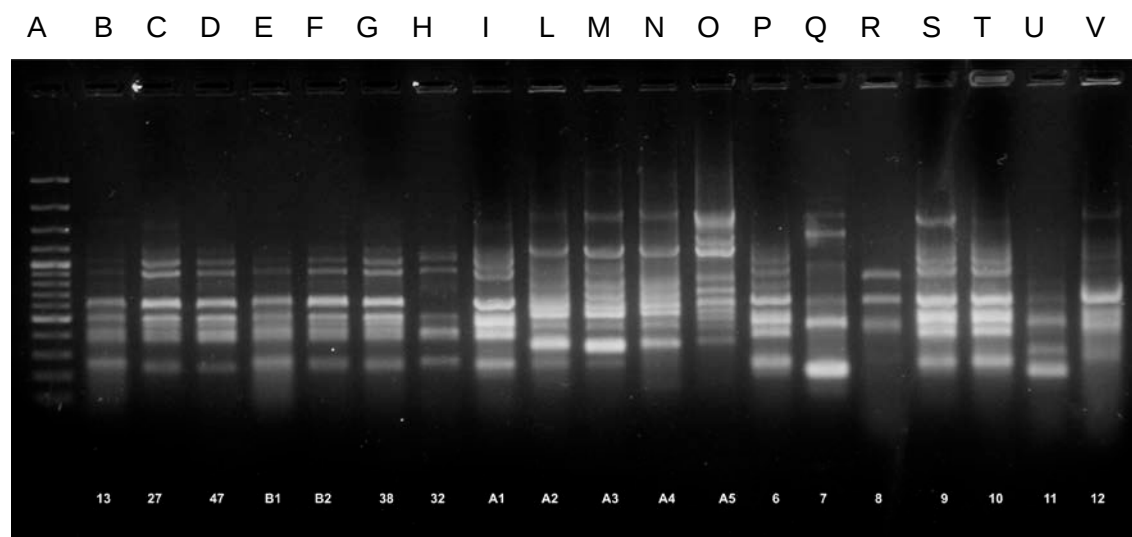


Figura 2. RAPD-PCR con el primer OPR13 de aislamientos de esporulados aerobios obtenidos desde leche cruda. Carriles (A) marcador de peso molecular; (B, C, D, E, F, G, H, I, P, S, T, V) *Bacillus licheniformis*; (L, M, N, O) *B. pumilus*; (Q, R, U) *B. circulans*.

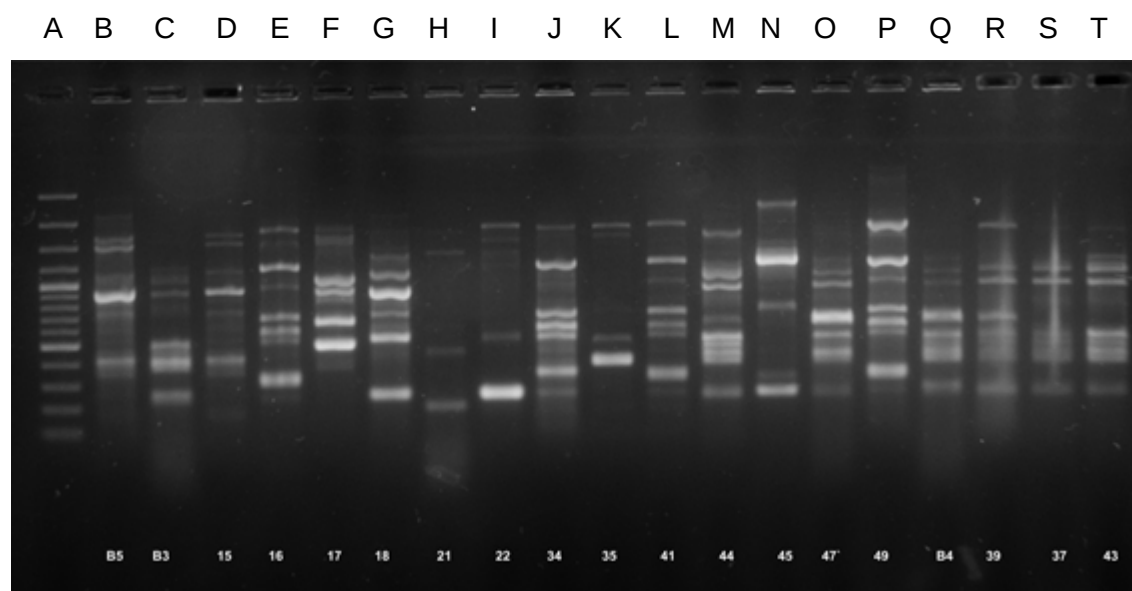


Figura 3. RAPD-PCR con el primer OPR13 de aislamientos de esporulados aerobios obtenidos desde leche pasteurizada. Carriles (A) marcador de peso molecular; (C, G, M, O, Q, R, S, T)

Bacillus licheniformis; (D) *B. sphaericus*; (E, J, L, P) *B. pumilus*; (B) *Bacillus* spp.; (G, H,I, K) *B. megaterium*; (N) *Lysinibacillus* sp.; (F) *B. subtilis*

apoya la selectividad de especies que crecen bajo temperaturas de refrigeración como son las identificadas dentro del género *Paenibacillus* (Ivy et al., 2012) y *Bacillus weihenstephanensis* y *B. cereus* (Pacova et al., 2003). Estas especies son relevantes porque por su crecimiento bajo condiciones de refrigeración afectan la vida útil del producto.

Cuadro 3. Proporción de aislamientos de las principales especies de esporulados aeróbicos en leche cruda y pasteurizada

Especie	n	Proporción (%)
<i>B. licheniformis</i>	56	45.5
<i>B. pumilus</i>	24	19.5
<i>B. circulans</i>	8	6.5
<i>B. spp</i>	5	4.1
<i>B. megaterium</i>	3	2.4
<i>Lysinibacillus spp</i>	3	2.4
<i>B. sphaericus</i>	3	2.4
<i>B. subtilis</i>	15	12.2
<i>B. amyloliquefaciens</i>	6	4.9

Otro grupo de trabajos han reportado la presencia de *B. sporothermodurans*, que fue descrita por primera vez en la década de 1990, en leche fluida sometida a tratamiento térmico muy intenso con tecnología UHT (Pettersson et al., 1996). Al igual que la mayoría de las especies esporuladas aeróbicas, las fuentes de contaminación por *B. sporothermodurans* se asocian al ambiente del tambo (Vaerewijck et al. 2001; Scheldeman et al. 2002) y la especie tiene la

capacidad de soportar tratamientos térmicos muy intensos característicos de este tipo de productos. En la misma forma que otros microorganismos de este grupo, la producción de enzimas causa desestabilización de las micelas de caseína, cambio de color de la leche y sabores inadecuados (Klijn et al., 1997).

Otros autores han descrito variaciones en las especies presentes en leche tratada térmicamente, entre las cuales se encuentran *G. stearothermophilus* (Rombaut et al. 2002), *Brevibacillus brevis* (de Silva et al. 1998; Rombaut et al. 2002), *B. licheniformis*, *B. sphaericus* (Cosentino et al. 1997) y *P. lactis* (Scheldeman et al., 2004). La fuente principal de estos contaminantes en la leche se encuentra en el ambiente del tambo que contiene una considerable diversidad de especies esporuladas aeróbicas (Huck et al, 2008). Las esporas que sobreviven al tratamiento térmico rápidamente proliferan en el producto y los problemas que originan pueden: 1) causar problemas al consumidor por intoxicaciones severas como las que provoca *B. cereus* (Heyndrickx y Scheldeman 2002) y 2) ocasionar deterioro de la leche o los productos de su manufactura durante la producción, almacenaje y distribución del producto (Huis in't Veld, 1996).

4.2.2. Identificación de aislamientos esporulados anaeróbicos por Análisis de Restricción de ADN Ribosomal Amplificado (ARDRA) y secuenciación del gen 16S rDNA.

En el trabajo se procesaron 116 aislamientos de esporulados anaeróbicos procedentes de los tubos que produjeron suficiente gas para desplazar el tapón parafina en los recuentos por NMP. Para el aislamiento 100 µL de medio de cada tubo fueron sembrados en RCM agar y se incubaron en condiciones anaeróbicas. De estas placas de RCM agar se obtuvieron los aislamientos en forma aleatoria.

En la Figura 4 se presentan los perfiles característicos de ARDRA para los aislamientos de anaeróbicas esporuladas. El gel de agarosa que se presenta agrupa los perfiles característicos de las principales especies de *Clostridium* presentes en leche y productos lácteos.

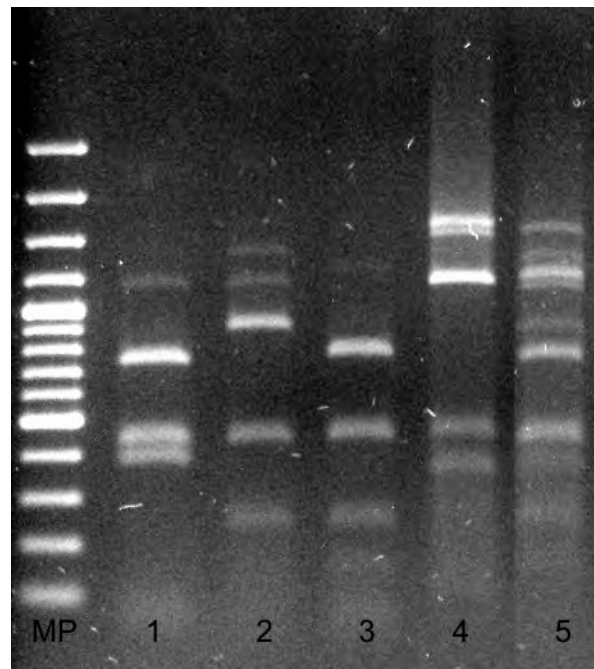


Figura 4. Perfiles de ARDRA de las principales especies esporuladas aeróbicas aisladas de leche cruda y pasteurizada. Los diferentes carriles presentan los perfiles característicos de **MP**: marcador de peso, **1**: *Clostridium butyricum*, **2**: *Clostridium tyrobutyricum*, **3**: *Clostridium sporogenes*, **4**: *Clostridium beijerinckii*, **5**: *Clostridium sporogenes*.

En el Cuadro 4 se presenta la proporción de aislamientos obtenidos para las especies principales. Las especies esporuladas anaeróbicas principales en la leche cruda y pasterizada analizada son *C. tyrobutyricum* y *C. sporogenes* con una menor incidencia de *C. beijerinckii* y *C. butyricum*. Probablemente los principales efectos de los esporulados anaeróbicos se presenten en la producción de quesos donde su presencia causa el defecto conocido como hinchazón tardía. La información obtenida es coincidente con otros trabajos que indican que *C. tyrobutyricum* es la principal bacteria responsable del deterioro de hinchazón tardía debido a la fermentación butírica en quesos duros y semiduros (Ingham et al., 1998, Klijn et al., 1995), aunque su presencia y frecuencia es altamente dependiente del predio de producción. Julien et

al. (2008) estudiaron las condiciones de contaminación a nivel del tambo y establecieron que *C. tyrobutyricum* es el principal contaminante de la leche y habitualmente es acompañado por *C. butyricum*, *C. sporogenes* y *C. beijerinckii*, lo cual es avalado por resultados de otros estudios (Le Bourhis et al., 2005, 2007). Las esporas encuentran en el queso las condiciones anaeróbicas necesarias para su crecimiento y fermentación butírica (Ingham et al., 1998). Al igual que los esporulados aeróbicos las fuentes de contaminación se encuentran en el ambiente del tambo, y entre éstas el silo y las heces constituyen las principales vías de contaminación (Lango y Heinonentanski, 1995). Los trabajos de Vissers et al. (2007) y Julien et al. (2008) indican que la principal fuente de contaminación de la leche es el silo cuya concentración de esporas butíricas puede ser 100 veces superior a otras fuentes.

Cuadro 4. Proporción de aislamientos de las principales especies de esporulados anaeróbicos en leche cruda y pasteurizada.

Especie	n	Proporción (%)
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	51	43.2
<i>Clostridium sporogenes</i>	25	22.0
<i>Clostridium beijerinckii</i>	15	12.7
<i>Clostridium butyricum</i>	14	11.9
<i>Clostridium</i> spp.	12	10.2

5. Conclusiones.

El trabajo realizado permitió confirmar la presencia de esporulados aeróbicos y anaeróbicos en leche cruda y leche pasteurizada comercial. Existe una tendencia a que los recuentos de esporulados aeróbicos y anaeróbicos sean menores en la leche que recibió tratamiento térmico de pasteurización. Esta tendencia puede deberse a que las muestras de leche cruda pertenecen a diferentes períodos del año, las diferencias propias de los predios en que se muestreo la leche cruda, o que el tratamiento térmico pudo reducir parcialmente los termodúricos presentes en la muestra.

Las principales especies de microorganismos aerobios identificados fueron *B. licheniformis* (45.5%), *B. pumilus* (19.5%) y *B. subtilis* (12.2%), y especies de menor importancia como *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. sphaericus*, *B. amyloliquefaciens*, *Bacillus* spp. y *Lysinibacillus* spp.

Las principales especies de microorganismos anaeróbicos se componen de *C. tyrobutyricum* (43.3%), *C. sporogenes* (22.0%), *C. beijerinckii* (12.7%) y *C. butyricum* (11.9%) y otros especies en menor proporción.

La presencia de especies esporuladas aeróbicas y anaeróbicas en la leche cruda resisten los tratamientos térmicos utilizados en la industria, afectando los procesos y la conservación de los productos manufacturados. La higiene a nivel del tambo aparece como uno de los elementos centrales para la reducción de los recuentos y los controles microbiológicos en la industria son esenciales para definir el destino de la leche cruda.

6. BIBLIOGRAFIA

Ageitos, J. M., Vallejo, J. A., Sestelo, A. B. F., Poza, M. Villa, T. G. (2007). Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Bacillus licheniformis* strain USC13. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2205–2213.

Anastasiou, R., Aktypis, A., Georgalaki, M., Papadelli, ., De Vuyst, L., Tsakalidou, E. (2009). Inhibition of *Clostridium Tyrobutyricum* by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 under conditions mimicking Kasseri cheese production and ripening. *Applied International Dairy Journal*, 19, 330–335

Andersson, A., Ronner, U., Granum, P.E. (1995). What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *International Journal of Food Microbiology*, 28, 145–155

Ankolekar, C., Labbe, R.G. (2010). Physical characteristics of spores of food-associated isolates of the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 982–984.

Arias, C., Olliete, B., Seseña, S., Jimenez, L., Pérez-Guzmán, M.D., Ariasa, R. (2013). Importance of on-farm management practices on lactate-fermenting *Clostridium* spp. spore contamination of Manchega ewe milk: Determination of risk factors and characterization of *Clostridium* population. *Small Ruminant Research*, 111, 120–128.

Aronson, A.I., Fitzjames, P. (1976). Structure and morphogenesis of the bacterial spore coat. *Bacteriological Reviews*, 40, 360–402.

Atrih, A., Foster, S.J. (2001). Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 364–372.

Barbano, D. M., Ma, Y., Santos, M. V. (2006). Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. *Journal of Dairy Science*, 89(E Suppl.), E15–E19.

Baril, E., Coroller, L., Couvert, O., Jabri, Me El, Leguerinel, I., Postollec, F., Boulais, C., Carlin, F., Mafart, P. (2012). Sporulation boundaries and spore formation kinetics of *Bacillus* spp. as a function of temperature, pH and a_w . *Food Microbiology*, 32, 79–86.

Bartoszewicz, M., Hansen, B. M., Swiecicka, I. (2008). The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. *Food Microbiology*, 25, 588–596.

Bassi, D., Cappa, F., Cocconcelli, P. S. (2009). A combination of a SEM technique and X-ray microanalysis for studying the spore germination process of *Clostridium tyrobutyricum*. *Research in Microbiology*, 160, 322–329.

- Bassi, D., Fontana, C., Zucchelli, S., Gazzola, S., Coconcelli, P. S. (2013). TaqMan real time-quantitative PCR targeting the phosphotransacetylase gene for *Clostridium tyrobutyricum* quantification in animal feed, faeces, milk and cheese. *International Dairy Journal*, 33, 75-82.
- Beaman, T.C., Gerhardt, P. (1986). Heat-resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydration, mineralization, and thermal adaptation. *Applied and Environment Microbiology*, 52, 1242–1246.
- Beattie, S.H., Williams, A.G. (1999). Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. with an improved cytotoxicity assay. *Letters in Applied Microbiology*, 28, 221–225.
- Breen, J. E., Green, M. J., Bradley, J. (2009). Quarter and cow risk factors associated with the occurrence of clinical mastitis in dairy cows in the United Kingdom. *Journal of Dairy Science*, 92:2551–2561.
- Brul, S., van Beilen, J., Caspers, M., O'Brien, A., de Koster, C., Oomes, S., Smelt, J., Kort, R., Beek, A. Ter (2011). Challenges and advances in systems biology analysis of *Bacillus* spore physiology; molecular differences between an extreme heat resistant spore forming *Bacillus subtilis* food isolate and a laboratory strain. *Food Microbiology*, 28, 221-227.
- Burgess, S.A; Lindsay, D. y Flint, S.H. (2010). Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *Applied and Environmental Microbiology*. 144. 215-225.
- Burkholder, W.F., Grossman, A.D. (2000). Regulation of the initiation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. In: Y.V. Brun y L.J. Shimkets (Eds.). Prokaryotic Development. ASM Press, Washington, DC. pp. 151-166.
- Buzby, J. C., Hyman J. (2012). Total and per capita value of food loss in the United States. *Food Policy*, 37, 561–570.
- Carlin, F. (2011).Origin of bacterial spores contaminating foods. *Food Microbiology*, 28, 177-182.
- Cazemier, A.E., Wagenaars, S.F.M., ter Steeg, P.F. (2001). Effect of sporulation and recovery medium on the heat resistance and amount of injury of spores from spoilage bacilli. *Journal of Applied Microbiology* 90, 761–770.
- Chambers, J.V. (2002). The microbiology of raw milk. In: R.K. Robinson (Ed.). Dairy Microbiology Handbook. John Wiley & Sons, New York. 3^a Ed. 39–90
- Chen, L., Coolbear, T., Daniel, R.M.(2004). Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus* sp. isolated from milk powder production lines. *International Dairy Journal*, 14, 495–504.
- Cocolin, L., Innocente, N., Biasutti, M., Comi, G. (2004). The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 83-91.

- Coorevits, A., De Jonghe, V., Vandroemme, J., Reekmans, R., Heyrman, J., Messens, W., De Vos, P., Heyndrickx, M. (2008). Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. *Systematic and Applied Microbiology*, 31, 126–140
- Cortezzo, D.E., Koziol-Dube, K., Setlow, B., Setlow, P. (2004). Treatment with oxidizing agents damages the inner membrane of spores of *Bacillus subtilis* and sensitizes spores to subsequent stress. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 838–852.
- Cortezzo, D.E., Setlow, P. (2005). Analysis of factors that influence the sensitivity of spores of *Bacillus subtilis* to DNA damaging chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 606–617.
- Cosentino, S., Mulargia, A. F., Pisano, B., Tuveri, P., Palmas, F. (1997). Incidence and biochemical characteristics of *Bacillus* flora in Sardinian dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 38, 235–238.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., James, G. (1994) Biofilms, the customized microniche. *Journal of Bacteriology*, 176, 2137–2142.
- Dasgupta, A. P., Hull, R. R. (1989). Late blowing of Swiss cheese: incidence of *Clostridium tyrobutyricum* in manufacturin milk. *Australian Journal of Dairy Technology*, 44, 82-87.
- de Silva, S., Petterson, B., De Muro, M. A., Priest, F. G. (1998). A DNA probe for the detection and identification of *Bacillus sporothermodurans* using the 16S-23S rDNA spacer region and phylogenetic analysis of some field isolates of *Bacillus* which form highly heat resistant spores. *Systematic Applied Microbiology*, 21, 398–407.
- Driks, A. (2002). Maximum shields: the assembly and function of the bacterial spore coat. *Trends in Microbiology*, 10, 251–254.
- Ellar, D.J. (1966). Fine structure of sporulation in *Bacillus cereus* grown in a chemically defined medium. *Journal of Bacteriology*, 92, 1748–1759.
- Drouin, P. y Lafrenière, C. (2012). Clostridial Spores in Animal Feeds and Milk. Ch. 18. <http://dx.doi.org/10.5772/50775>.
- Dutt, K., Gupta, P., Saran, S., Misra, S., Saxena, R. K. (2009). Production of milk-clotting protease from *Bacillus subtilis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 158, 761–772.
- Etoa, F.X., Michiels, L. (1988). Heat induced resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Letters in Applied Microbiology*, 6, 43–45.
- Finley, N., Fields, L. (1961). Heat activation and heat-induced dormancy of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Applied Microbiology*, 10, 231–236.
- Flint, S.H., Bremer, P.J., Brooks, J.D. (1997). Biofilms in dairy manufacturing plant —description, current concerns and methods of control. *Biofouling*, 11, 81–97.

- Flint, S.H., van den Elzen, H., Brooks, J.D., Bremer, P.J. (1999) Removal and inactivation of thermo-resistant streptococci colonizing stainless steel. *International Dairy Journal*, 9, 429–436.
- Flint, S.H., Palmer, J., Bloemen, K., Brooks, J., Crawford, R. (2001). The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 151–157.
- Fromm, H. I., Boor, K. J. (2004). Characterization of pasteurized fluid milk shelf-life attributes. *Journal of Food Science*, 69, M207–M214.
- Garde, S., Arias, R., Gaya, P., Nuñez, M. (2010). Occurrence of *Clostridium* spp. in ovine milk and Manchego cheese with late blowing defect: identification and characterization of isolates. *Applied International Dairy Journal*, 21, 272–278.
- Garde, S., Ávila, M., Arias, R., Gaya, P., Nuñez, M. (2011). Outgrowth inhibition of *Clostridium beijerinckii* spores by a bacteriocin-producing lactic culture in ovine milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 150, 59–65.
- Ghellai, L., Moussaboudjemaa, B. (2013). Aerobic spore-forming bacteria in the ultra-high temperature milk produced in the north west of Algeria. *Journal of Agricultural Science and Technology A*, 3, 697–702.
- Ghoddusi, H. B., Sherburn, R. E., y Aboaba, O. O. (2013). Growth Limiting pH, Water Activity, and Temperature for Neurotoxicogenic Strains of *Clostridium butyricum*. Hindawi Publishing Corporation, ISRN Microbiology. 1-6. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/731430>
- Ghosh, S., Pengfei, Z., Yong-Qing, L., Setlow, P. (2009). Superdormant spores of *Bacillus* species have elevated wet-heat resistance and temperature requirements for heat activation. *Journal of Bacteriology*, 191, 5584–5591.
- Gibson, H., Sinclair, L.A., Brizuela, C.M., Worton, H.L., Protheroe, R.G. (2008). Effectiveness of selected premilking teat-cleaning regimes in reducing teat microbial load on commercial dairy farms. *Letters in Applied Microbiology*, 46, 295–300.
- Granum, P.E. (2002). *Bacillus cereus* and food poisoning. In: Berkeley, R.C., Heyndrickx, M., Logan, N.A., De Vos, P. (Eds.), *Applications and Systematics of Bacillus and Relatives*. Blackwell Science, Oxford, UK, pp. 37–46.
- Griffith, M.W., Phillips, J.D., Muir, D.D. (1986). The effect of sub-pasteurization heat treatment on the shelf life of milk. *Dairy Industries International*, 51, 31–35.
- Griffiths, M.W. (1995). Foodborne illness caused by *Bacillus* spp. other than *B. cereus* and their importance to the dairy industry. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 302, 3–6.
- Hanson, M. L., Wendorff, W. L., Houck, K. B. (2005). Effect of heat treatment of milk on activation of *Bacillus* spores. *Journal of Food Protection*, 68, 1484–1486.

- Heyndrickx, M., Scheldeman, P. (2002). Bacilli associated with spoilage in dairy and other food products. In: Berkeley, R., Heyndrickx, M., Logan, N., De Vos, P. (Eds.), *Applications and Systematics of Bacillus and Relatives*. Blackwell Science, Oxford, pp. 64–82.
- Hood, S.K., Zottola, E.A. (1997). Adherence to stainless steel by food borne micro-organisms during growth in model food systems. *International Journal of Food Microbiology*, 37, 145–153.
- Huck, J. R., Sonnen, M., Boor, J. (2008). Tracking heat-resistant, cold-thriving fluid milk spoil-age bacteria from farm to packaged product. *Journal of Dairy Science*, 91:1218–1228
- Hughes, J. W. (2001). A system for assessing cow cleanliness. *In Practice*, 23:517–524.
- Huis in't Veld, J. H. J. (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 1–18.
- Husmark, U., Rönner, U. (1992) The influence of hydrophobic electrostatic and morphological properties on the adhesion of *Bacillus* spores. *Biofouling*, 5, 335–344.
- Iciek, J., Papiewska, A., Molska, M. (2006). Inactivation of *Bacillus stearothermophilus* spores during, thermal processing. *Journal of Food Engineering*, 77, 406–410.
- Ingham, S. C., J. R. Hassler, Y. W. Tsai, B. H. Ingham. 1998. Differentiation of lactate-fermenting, gas-producing *Clostridium* spp. isolated from milk. *International Journal of Food Microbiology*, 43,173–183.
- Ivy, R. A., Ranieri, M. L., Martin, N. H., den Bakker, H. C., Xavier, B. M., Wiedmann, M., Boor, K. J. (2012). Identification and characterization of psychrotolerant sporeformers associated with fluid milk production and processing. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 1853-1864.
- Janoskova, A., Ardö, Y., Nielsen, E. W., Kmet, V., Vogensen, F. K. (2004). Identification of dairy related *Clostridium* species by amplified 16S ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). Poster 165 at the IDF symposium on cheese. Praga, Czech Republic. 21-25 Marzo.
- Johnston, D.W., Bruce, J. (1982). Incidence of thermophilic psychrotrophs in milk produced in the west of Scotland. *Journal of Applied Bacteriology*, 52, 333-337.
- Julien, M. –C., Dion, P., Lafreniere, C., Antoun, H., Drouin, P. (2008). Sources of clostridia in raw milk on farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 6348–6357.
- Kim, J., Foegeding, P.M. (1990). Effects of heat treatment, CaCl₂ treatment and ethanol treatment on activation of *Bacillus* spores. *Journal in Applied Bacteriology*, 69, 414–420.
- Klijn, N., bovie, C., Dommès, J., Hoolwerf, J. D., Van Der Waals, C., Weerkamp, A. H., Nieuwenhof, F. F. J. (1994). Identification of *Clostridium tyrobutyricum* and related species using sugar fermentation, organic acid formation and DNA probes based of specific 16s ARN sequences. *Applied Microbiology*. 17, 249-256.

Klijn, N., Nieuwenhof, F. F., Hoolwerf, J. D., van der Waals, C. B., Weerkamp, A. H. (1995). Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the causative agent of late blowing in cheese by species-specific PCR amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 61,2919–2924.

Klijn, N., Herman, L., Langeveld, L., Vaerewijck, M., Wagendorp, A., Huemer, I. Weerkamp, A. (1997). Genotypical and phenotypical characterization of *Bacillus sporothermodurans* strains, surviving UHT sterilization. *International Dairy Journal*, 7, 421–428.

Knight, G.C., Nicol, R.S., McMeekin, T.A. (2004). Temperature step changes: a novel approach to control biofilms of *Streptococcus thermophilus* in a pilot plant scale cheese-milk pasteurisation plant. *International Journal of Food Microbiology*, 93, 305–318.

Lango, Z., Heinonentanski, H. (1995). Occurrence of *Clostridium tyrobutyricum* in cattle slurry and fresh forage grasses. *Bioresource Technology*, 53,189–191.

Le Bourhis, A.G., Saunier, K., Doré, J., Carlier, J. P., Chamba, J. F., Popoff, M. R., Tholozan, J. L. (2005). Development and validation of PCR primers to assess the diversity of *Clostridium* spp. in cheese by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 29-38.

Le Bourhis, A. G., Doré, J., Carlier, J. -P., Chamba, J.-F., Popoff, M.-R., Tholozan, J.-L. (2007). Contribution of *C. beijerinckii* and *C. sporogenes* in association with *C. tyrobutyricum* to the butyric fermentation in Emmental type cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 113,154–163.

Lechner, S., Mayr, R., Francis, K.P., Pruss, B.M., Kaplan, T., Wiessner-Gunkel, E., Stewart, G.S.A.B. y Scherer, S. (1998): *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 1373–1382.

Leuschner, R.G.K., Lillford, P.J. (1999). Effects of temperature and heat activation on germination of individual spores of *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 228–232.

Lindsay, D., Brozel, V.S., Mostert, J.F., von Holy, A. (2000). Physiology of dairy-associated *Bacillus* spp. over a wide pH range. *International Journal of Food Microbiology*, 54, 49–62.

Lücking, G., Stoeckel, M., Atamer, Z., Hinrichs, J., Ehling-Schulz, M. (2013). Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 166, 270-279.

Makovec, J.A., Ruegg, P.L. (2003). Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *Journal of Dairy Science*, 86, 3466–3472.

Montanari, G., Borsari, A., Chiavari, C., Ferri, G., Zambonelli, C., Grazia, L. (2004). Morphological and phenotypical characterisation of *Bacillus sporothermodurans*. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 802–809.

Mostert, J.F., Luck, H., Husmann, R.A. (1979). Isolation identification and practical properties of *Bacillus* sp. from ultra high temperature and sterilized milk. *South African Journal of Dairy Technology*, 11, 125–132.

- Nanu, E., Latha, C., Sunil, B., Prejit, Thomas M., Venon, K.V. (2007). Quality assurance and public health safety of raw milk at the production point. *American Journal of Food Technology*, 2, 145–152.
- Nicholson, W.L. y Setlow, P. (1990) Sporulation, germination and outgrowth. In: *Molecular Biological Methods for Bacillus* ed. Harwood, C.R. and Cutting, S.M. pp. 391–450. Chichester, UK: John Wiley & Sons.
- Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J., Setlow, P. (2000) Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 64, 548–572.
- Oomes, S.J.C.M., Jonker, M.J., Wittink, F.R.A., Hehenkamp, J.O., Breit, T.M., Brul, S. (2009). The effect of calcium on the transcriptome of sporulating *B. subtilis* cells. *International Journal of Food Microbiology*, 133, 234–242.
- Pacova, Z., Svec, P., Stenfors, L. P., Vyletelova, M., Sedlacek, I. (2003). Isolation of the psychrotolerant species *Bacillus weihenstephanensis* from raw cow's milk. *Czech Journal of Animal Science*, 48, 93–96.
- Palop, A., Manas, P., Condon, S. (1999). Sporulation temperature and heat resistance of *Bacillus* spores: a review. *Journal of Food Safety*, 19, 57–72.
- Panelli, S., Brambati, E., Bonacina, C., Feligini, M. (2013). Detection of *Clostridium tyrobutyricum* in milk to prevent late blowing in cheese by automated ribosomal intergenic spacer analysis. *Journal of Food Science*, 78, M1569-M1574.
- Parkar, S.G., Flint, S.H., Palmer, J.S., Brooks, J.D.(2001). Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 901–908
- Parkar, S.G., Flint, S.H. y Brooks, J.D. (2003) Physiology of biofilms of thermophilic bacilli – potential consequences for cleaning. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30, 553–560.
- Pettersson, B., Lembke, F., Hammer, P., Stackebrand, E., Fergus, G. (1996). *Bacillus sporothermodurans* a new species producing highly heat resistant endospores. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, 759–764.
- Ranieri ML, Huck JR, Sonnen M, Barbano DM, Boor KJ. (2009). High temperature, short time pasteurization temperatures inversely affect bacterial numbers during refrigerated storage of pasteurized fluid milk. *Journal of Dairy Science*, 92, 4823–4832.
- Reginensi, S. M., González, M. J., Olivera, J. A., Sosa, M., Juliano, P., Bermúdez, J. (2011). RAPD-based screening for spore-forming bacterial populations in Uruguayan commercial powdered milk. *International Journal of Food Microbiology*, 148, 36-41.
- Rombaut R., Dewettinck, K., de Mangelare, G., Huyghebaert, A. (2002). Inactivation of heat resistant spores in bovine milk and lactulose formation. *Milchwissenschaft* , 57, 432–436.

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

Ronimus, R. S., Rueckert , A., Morgan, H. W. (2006). Survival of thermophilic spore-forming bacteria in a 90(+) year old milk powder from Ernest Shackelton's Cape Royds Hut in Antarctica. *Journal of Dairy Research*, 73, 235-243.

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

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

Russell, A.D. (1982). The bacterial spore. In: Russell, A.D. (Ed.). *The Destruction of Bacterial Spores*. Academic Press Inc., London, pp. 1–29.

Sang, W., Sim, S.J. (2006). Increased heat resistance of *Geobacillus stearothermophilus* spores heat-shocked during sporulation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 633– 636.

Scheldeman, P., Herman, L., Goris, J., De Voe, P., Hendrickx, M. (2002). Polymerase chain reaction identification of *Bacillus sporothermodurans* from dairy source. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 983–991.

Scheldeman, P., Goossens, K., Rodríguez-Díaz, M., Pil, A., Goris, J., Herman, L., De Vos, P., Logan, N. A., Heyndrickx, M. (2004). *Paenibacillus lactis* sp. nov., isolated from raw and heat-treated milk. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 885–891.

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

Scheldeman, P., Herman, L., Foster, S., Heyndrickx, M. (2006). *Bacillus sporothermodurans* and other highly heat-resistant spore formers in milk. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 542–555.

Schneider , N., Werkmeister, K., Becker, C. M., y Pischetsrieder , M. (2011). Prevalence and stability of lysozyme in cheese. *Food Chemistry*, 128, 145–151.

Schwarzenbach, R.R., Hill, B.M. (1999). Do bacterial spores in milk powders survive UHT processing. *Milk Powders for the Future 4*, Palmerston North, 30 June–2 July 1999. Dairy Institute, New Zealand, pp. 53–58.

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

Seale, R.B., Flint, S.H., McQuillan, A.J. y Bremer, P.J. (2008) Recovery of spores from thermophilic dairy bacilli and effects of their surface characteristics on attachment to different surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 731–737.

Seale, R.B. (2009). The surface characteristics of spores from thermophilic bacilli isolated from a milk powder production line and their influence on adhesion to surfaces. PhD Thesis, The University of Otago, Dunedin.

Setlow, B., Atluri, S., Kitchel, R., Doziol-Dube, K., Setlow, P. (2006). Role of dipicolinic acid in resistance and stability of spores of *Bacillus subtilis* with or without DNA-protected/ β -type small acid-soluble proteins. *Journal of Bacteriology*, 188, 3740–3747.

Setlow, P. (2005). Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 514–525.

Sharma, M., Anand, S.K. (2002). Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food Microbiology*, 19, 627–636.

Sheehan, J.J., Wilkinson, M.G., McSweeney, P.L.H. (2008). Influence of processing and ripening parameters on starter, non-starter and propionic acid bacteria and on the ripening characteristics of semi-hard cheeses. *International Dairy Journal*, 18, 905–917.

Sonenshein, A.L., (2000) Endospore-forming bacteria: an overview. In: Prokaryotic Development ed. Brun, Y.V. y Shimkets, L.J. pp. 133–150. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Stadhouders, J., Hup, G., Hassing, F. (1982). The conceptions index and indicator organisms discussed on the basis of the bacteriology of spray-dried milk powder. *Netherland Milk Dairy Journal*, 36, 231–260.

Te Giffel, M. C., Wagendorp, A., Herrewegh, A. y Driehuis, F. (2002). Bacterial spores in silage and raw milk. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, 625–630

Tipper, D.J., Gauthier, J.J. (1972). Structure of the bacterial endospore. In: Halvorson, H.O., Hanson, R., Cambell, L.L. (Eds.), Spores V. American Society for Microbiology, Washington DC., pp. 3–12.

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

Velthuis, A. G. J., Meuwissen, M., Huirne, R. B. M. (2009). Distribution of direct recall costs along the milk chain. *Agribusiness*, 25:466–479.

Velthuis, A. G. J., Reij, M. W., Baritakis, K., Dang, M., y van Wagenberg, C. P. A. (2010). Recall costs balanced against spoilage control in Dutch custard. *Journal of Dairy Science*, 93, 2779–2791.

Vinter, V. (1969). Physiology and biochemistry of sporulation. In: Gould, G.W., Hurst, A. (Eds.), The Bacterial Spore. Academic Press, London, pp. 73–124.

- Vissers, M.M.M., Driehuis, F. (2008). On-Farm Hygienic Milk Production. In: A.Y. Tamime (Eds). *Milk Processing and Quality Management*. Chapter 1. Wiley-Blackwell, Oxford, UK. p. 1-22.
- Vissers, M.M., Driehuis, F., Giffel, M.C.T., Jong, P.D., y Lankveld, J.M.G. (2007). Concentration of butyric acid bacteria spores in silage and relationships with aerobic deterioration. *Journal of Dairy Science*, 90, 928-936.
- Vissers, M.M., Driehuis, F., Giffel, M.C.T. , Jong, P.D., Lankveld, J.M.G. (2006). Improving farm management by modelling the contamination of farm tank milk with butyric acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 89, 850-858.
- Vries, Y.P.D. (2006). *Bacillus cereus* spore formation, structure, and germination. PhD Thesis, Wageningen University, The Netherlands.
- Ward, W.R., Hughes, J.W., Faull, W.B., Cripps, P.J., Sutherland, J.P. , Sutherst, J.E. (2002). Observational study of temperature, moisture, pH and bacteria in straw bedding, and faecal consistency, cleanliness, and mastitis in cows in four dairy herds. *Veterinary Records*, 151, 199–206.
- Warnecke, F. (2001). The Ecology of Thermophilic Bacilli of Milk Powder Processing Plants. Thesis, University of Waikato, Hamilton, M.Phil.
- 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, 697-703.
- Westhoff, D.C. y Dougherty , S. L. (1981). Characterization of *Bacillus* species isolated from spoiled ultrahigh temperature processed milk. *Journal of Dairy Science*, 64, 572–580.
- Yuan, D.-D., Liu, G.-C., Ren, D.-Y., Zhang, D., Zhao, L., Kan, C.-P. , Yang, Y.-Z., Maa, Y W., Li, Zhang, L.-B. (2012). A survey on occurrence of thermophilic bacilli in commercial milk powders in China. *Food Control*, 25, 752-757.