

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CARRERA DE MICROBIOLOGÍA

Detección de bacterias formadoras de esporas en leche vacuna cruda, pasteurizada y procesada por Ultra Alta Temperatura (UHT).

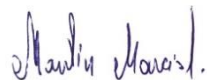
**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
MICROBIÓLOGA**

NICOLE SALOMÉ CHÁVEZ PÉREZ

Quito, 2023

CERTIFICACIÓN

Certifico que la Disertación de grado en Microbiología de la señorita Nicole Salomé Chávez Pérez ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



Martín Marcial-Coba, PhD

Director de la disertación

Quito, 31 de Julio de 2023

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado principalmente a Dios por darme fuerzas en todo el trayecto de mi carrera, por su amor infinito hacia mí y todas las cosas buenas que ha puesto en mi camino. A mi abuela Fanny, por su apoyo y su amor durante todas las etapas de mi vida, a mis padres, María Augusta y Fernando, por su sabiduría y amor, sin ellos esto no hubiera sido posible y a mi tía Gloria que desde el cielo me sigue guiando y enseñando a ser fuerte.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a mi madre, María Augusta, mi mejor amiga y mi compañera de vida, sin tu amor, tu guía y tus consejos nada de esto hubiera sido posible. A mi abuela Fanny que toda mi vida me ha dado el amor y los consejos necesarios para sobrellevar cualquier situación. A mis hermanos Esteban y Fernanda que me han dado los ánimos, la fuerza y el amor que necesité para culminar esta etapa de mi vida, confiando en mí incondicionalmente.

Al PhD. Martín Marcial, por todos los conocimientos brindados para culminar mi tesis y su apoyo durante la investigación. A todos los profesores que tuve a lo largo de mi carrera que me enseñaron a amar la ciencia y a involucrarme totalmente con mi carrera. También, a todo el personal universitario que me ayudó en el proceso práctico de mi tesis.

A mis jefes, Francisco y Teresa, por todos los conocimientos brindados, su paciencia y confianza en mí durante todo el proceso de escritura de mi trabajo de titulación, nunca dejaré de aprender de ustedes, no solo en la parte profesional sino también en la personal.

A todos los amigos que me ha dado esta hermosa carrera, principalmente a Amanda, Alexis y Nicolás que me apoyaron en todos los momentos difíciles y celebraron conmigo mis logros. A mis amigos del colegio que se han convertido en mi familia Milena, Michelle, Paredes, Acevedo y Judy, sin ustedes no sería la persona que soy hoy. Por último, a David y Fito, mis compañeros y mi apoyo incondicional en esta etapa de mi vida.

TABLA DE CONTENIDOS

1	RESUMEN.....	1
2	ABSTRACT.....	2
3	INTRODUCCIÓN	3
4	OBJETIVOS.....	6
4.1	OBJETIVO GENERAL.....	6
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
5	MATERIALES Y MÉTODOS	6
5.1	MUESTREO.....	6
5.2	ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS	7
5.3	CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS MICROBIANAS EN LAS MUESTRAS	7
5.4	AISLAMIENTO DE BACTERIAS AEROBIAS FORMADORAS DE ESPORAS.....	7
5.5	AISLAMIENTO DE BACTERIAS ANAEROBIAS FORMADORAS DE ESPORAS.....	8
5.6	AISLAMIENTO DE BACTERIAS TERMÓFILAS	8
5.7	PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS.....	8
5.8	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS	9
6	RESULTADOS.....	11
7	DISCUSIÓN.....	21
8	CONCLUSIONES	26
9	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
10	ANEXOS.....	34

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Dendrograma generado con los perfiles de bandas obtenidos de la REP-PCR de las cepas aisladas en el primer muestreo. 12
- Figura 2.** Dendrograma generado con los perfiles de bandas obtenidos de la REP-PCR de las cepas aisladas en el segundo muestreo..... 13

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Especies bacterianas aisladas en el primer muestreo.....	14
Tabla 2. Especies bacterianas aisladas en el segundo muestreo	17

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Compendio de los geles de agarosa correspondientes a los mesófilos y termófilos aislados en el primer muestreo.....	34
Anexo 2. Compendio de los geles de agarosa correspondientes a mesófilos y termófilos aislados en el segundo muestreo.....	34

1 RESUMEN

Por su elevado contenido nutricional, la leche vacuna es ampliamente consumida por el ser humano a nivel global. Por lo tanto, requiere una calidad microbiológica excepcional basada en tratamientos térmicos como pasteurización y esterilización comercial por Ultra Alta Temperatura (UHT). No obstante, algunas bacterias, por su capacidad de formación de esporas, sobreviven, ocasionalmente, a tales tratamientos térmicos. Consecuentemente, la detección, caracterización e identificación de bacterias esporuladas en este alimento representa un análisis fundamental, pero que no se realiza rutinariamente. En ese sentido, el presente estudio permitió caracterizar e identificar especies bacterianas mesofílicas, termofílicas y anaerobias presentes en muestras de leche vacuna cruda, pasteurizada y UHT que pudieron sobrevivir a los distintos tratamientos térmicos aplicados dentro de la industria. Esto fue alcanzado mediante protocolos de concentración de células microbianas en las muestras, aislamiento y caracterización fenotípica de cepas encontradas, extracción del material genético, REP-PCR para encontrar similitud entre cepas y PCR del gen 16s del ARNr para su posterior secuenciación e identificación a nivel de especie. Se observó la prevalencia de ciertos géneros bacterianos como lo son: *Pantoea*, *Lactococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Dermacoccus*, *Lacticaseibacillus*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Raoultella*, *Enterococcus*, además de mostrar la presencia de la bacteria *Clostridium argentinense*, lo que es preocupante al ser una potencial productora de toxina botulínica. Se identificaron ciertas especies aisladas de distintas marcas de leche UHT analizadas como es el caso de *Enterococcus durans* y *Enterobacter hormachei*, demostrando, que posiblemente, exista un problema generalizado con bacterias que sobrevivan a los tratamientos térmicos convencionales. De manera interesante, se obtuvieron aislamientos de bacterias Gram negativas que sobrevivieron a los distintos tratamientos térmicos, esto sugiere que las bacterias esporuladas no son las únicas que pueden sobrevivir a estos tratamientos. Los resultados alcanzados dentro de esta investigación podrían complementar la normativa vigente local para el control de calidad de los productos lácteos.

Palabras clave: Anaerobios, esporulados, leche, mesófilos, REP-PCR, termófilos, UHT

2 ABSTRACT

Due to its high nutritional content, cow's milk is widely consumed by humans globally. Therefore, it requires exceptional microbiological quality based on thermal treatments such as pasteurization and commercial Ultra High Temperature (UHT) sterilization. However, some bacteria, due to their spore-forming capacity, occasionally survive such heat treatments. Consequently, the detection, characterization and identification of sporulated bacteria in this food represents a fundamental analysis, but it is not routinely performed. In this regard, the current study allowed the characterization and identification of mesophilic, thermophilic and anaerobic bacterial species present in samples of raw, pasteurized and UHT bovine milk that were able to survive the different heat treatments applied within the industry. This was achieved through protocols of concentration of microbial cells in the samples, isolation and phenotypic characterization of strains found, extraction of genetic material, REP-PCR to find similarity between strains and PCR of the 16s rRNA gene for subsequent sequencing and identification to species level. The prevalence of certain bacterial genera was observed, such as: *Pantoea*, *Lactococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Dermaococcus*, *Lacticaseibacillus*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Raoultella*, *Enterococcus*, and it also showed the presence of the bacterium *Clostridium argentinense* which is worrying as it is a potential producer of botulinum toxin. Certain species isolated from different brands of UHT milk analyzed were identified, such as *Enterococcus durans* and *Enterobacter hormachei*, showing that there is possibly a generalized problem with bacteria that survive conventional heat treatments. Interestingly, isolates of Gram-negative bacteria were obtained that survived the different heat treatments, this suggests that sporulated bacteria are not the only ones that can survive these treatments. The results achieved within this research could complement the local regulations in force for the quality control of dairy products.

Key words: Anaerobes, sporulates, milk, mesophiles, REP-PCR, thermophiles, UHT

3 INTRODUCCIÓN

La leche vacuna es uno de los alimentos más ampliamente consumidos por el ser humano a nivel mundial y, consecuentemente, su producción tiene gran importancia económica en varios países (Oñate-Haro, 2018). Este fenómeno radica, principalmente, en su gran contenido de nutrientes como azúcares, grasas, proteínas y minerales. Esta propiedad, junto con una elevada actividad de agua ($a_w = 0.93 - 0.98$) y pH aproximado a la neutralidad favorece el desarrollo de microorganismos con metabolitos asociados al deterioro de los productos lácteos (Calvo-Gómez, 2018).

Con el propósito de reducir o eliminar la microbiota presente en la leche, las industrias lácteas utilizan tratamientos térmicos que permiten prolongar la estabilidad, garantizar su inocuidad, preservar su valor nutritivo y las cualidades organolépticas del alimento. Entre estos procesos, destaca la pasteurización, que consiste en aumentar la temperatura del producto a 72 °C durante 15 segundos para eliminar formas vegetativas de bacterias potencialmente patógenas para el ser humano (Ding, et.al, 2020). Adicionalmente, uno de los tratamientos más ampliamente utilizados es el de Ultra Alta Temperatura (UHT, por sus siglas en inglés), en el que el alimento se expone a una temperatura entre 135 a 150 °C por uno a diez segundos (Yacoub, et. al, 2017).

El tratamiento UHT, se enfoca en la eliminación del 99% de las formas vegetativas y esporuladas de bacterias. Este permite la obtención de un producto comercialmente estéril e incrementa la vida útil del mismo hasta por 9 meses cuando es almacenado en las condiciones adecuadas (Kračmarová, Štiborová, Horáčková, Demnerová, 2018). Sin embargo, se ha descrito el aislamiento de bacterias esporuladas que pueden sobrevivir al proceso UHT en muestras de leche. Las esporas son estructuras que se caracterizan por su resistencia significativa a elevadas temperaturas y a otros factores ambientales hostiles para el desarrollo celular. En ese contexto, bacterias de los géneros: *Bacillus*, *Geobacillus*, *Paenibacillus*, *Clostridium*, entre otros, se favorecen de su capacidad de formar endosporas. Aunque, la aparición de estas bacterias en matrices como la leche cruda puede ser relativamente baja, su eventual supervivencia a los tratamientos térmicos podría permitir, dependiendo de las condiciones de almacenaje, su desarrollo en el producto terminado (Calvo-Gómez, 2018).

La ocurrencia de bacterias formadoras de esporas en la leche puede asociarse a varios factores. Entre ellos, se incluye al animal del que provenga la leche, su estado de salud y su alimentación. Además, las malas prácticas de higiene durante procesos como el ordeño pueden conducir a un elevado recuento de estas bacterias en la leche cruda y, consecuentemente, disminuir la efectividad del tratamiento UHT (Estrada Azueto, 2014). Asimismo, las variaciones de tiempo y temperatura en el tratamiento UHT pueden influir en la calidad microbiológica del producto final (Castañeda-Carrasquilla, 2015). Tomando en cuenta esta problemática, Mohamed y sus colaboradores (2016), llegaron a la conclusión de que se deben adaptar los protocolos de esterilización de la leche mediante variación de tiempo y condiciones como presión. Además, estas bacterias son capaces de formar biopelículas en las distintas superficies de las plantas de tratamiento. Estas pueden constituir un reservorio de microorganismos asociados a contaminación cruzada (Gopal et al., 2015). En relación con esto, en el estudio realizado por Gopal y colaboradores (2015), se realza la importancia de mantener un control adecuado de este parámetro en los tanques utilizados para el almacenamiento de leche cruda, utilizando periodos intensivos de limpieza con productos desinfectantes en los que se adicione compuestos antimicrobianos alternativos para evitar la formación de biopelículas.

Además de la potencial supervivencia de microorganismos, la producción de enzimas termoestables por parte de estos, en cualquier momento de la producción, representa un problema crítico asociado al deterioro de las propiedades organolépticas del producto final, reduciendo su vida útil (Mehta, Metzger, Hassan, Nelson y Patel, 2019). Las enzimas de mayor importancia en esta industria son proteasas y lipasas bacterianas termoestables (Carrosio-Benvenuto, 2014) En conexión con esto, las proteasas actúan directamente sobre las micelas de caseína en donde se induce una hidrólisis de su enlace peptídico que libera péptidos pequeños que pueden dañar el sabor y consistencia de la leche, por otra parte, las lipasas, actúan hidrolizando la grasa, liberando ácidos grasos que provocan un sabor rancio en el producto (Calvo-Gómez, 2018). En ese contexto, bacterias pertenecientes al género *Bacillus* se caracterizan por la producción de las enzimas mencionadas anteriormente y la formación de biopelículas, lo que las convierte en un contaminante importante en la industria alimentaria (Calvo-Gómez, 2018). Adicionalmente, por su resistencia térmica intrínseca y la capacidad de formar biopelículas, la potencial presencia de bacterias patogénicas como *B. cereus* en

leche UHT puede asociarse al desarrollo de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) en los consumidores (Mohamed, Alnakip y Aal, 2016).

En Ecuador, la industria láctea es una gran fuente de empleos e ingresos. Aunque el objetivo de las autoridades agropecuarias locales es ser exportadores de leche vacuna, actualmente el 98,7% de la producción láctea se ocupa únicamente para abastecer el consumo interno (Oñate-Haro, 2018). Por esta razón, en el país se han implementado normativas técnicas ligadas a la calidad microbiológica de la leche vacuna cruda, pasteurizada y UHT. Las normas locales, relacionadas a la calidad microbiológica de la leche tratada por UHT, establecen principalmente los requisitos mínimos y el control de la esterilidad comercial, realizando así únicamente un recuento de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Para este procedimiento, se toman un mínimo de dos muestras de leche UHT, cada una de las muestras consiste en tres envases del mismo lote, una muestra se utilizará para su análisis y la otra como referencia. El primer envase se evalúa inmediatamente, el segundo envase tiene una incubación a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 días antes de su procesamiento y al tercer envase se aplica una incubación de $55\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 días previo al procesamiento. Posteriormente, se siembra en placas Petri, 1 y 0.1 ml de la muestra por el método de vertido en placa (*Pour Plate*) y se incuban a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 72 horas ± 2 horas. A continuación, se revisan los resultados, si alguna placa tiene crecimiento de más de 10 UFC/cm^3 , se considera a la muestra como contaminada, si las placas cuentan con menos de 10 UFC/cm^3 se repite el ensayo con la muestra de referencia, si en la repetición existen menos de 10 UFC/cm^3 se considera a la muestra como comercialmente estéril (NTE INEN 2335, 2003). Sin embargo, existen limitaciones en la normativa vigente. Por ejemplo, el análisis específico de las bacterias que ocasionalmente podrían sobrevivir al tratamiento y las enzimas producto del metabolismo de las mismas, es omitido. En conexión con esto, el objetivo de este estudio fue aislar e identificar bacterias formadoras de esporas, y otras capaces de sobrevivir a tratamientos térmicos, a partir de muestras de leche vacuna obtenidas durante diferentes fases de producción, que incluyen leche cruda, pasteurizada y UHT, de una planta de procesamiento local.

Debido a su enfoque sobre la detección de bacterias termorresistentes, la metodología aquí descrita, podría complementar la normativa técnica del país. De esta manera, los hallazgos de este estudio también constituyen la base para futuras

investigaciones orientadas al diseño de estrategias de control de microorganismos contaminantes y deterioradores de leche procesada por tratamiento UHT.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la calidad microbiológica de leche vacuna cruda, pasteurizada y UHT, en función de la ausencia o presencia de bacterias formadoras de esporas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Aislar, a partir de cultivos mixtos, bacterias formadoras de esporas presentes en muestras de leche vacuna cruda, pasteurizada y UHT mediante tratamiento térmico y medios selectivos.
- b) Caracterizar bacterias formadoras de esporas a partir de muestras de leche vacuna cruda, pasteurizada y UHT.
- c) Identificar, mediante secuenciación del gen 16S ARNr, la especie de las bacterias de los aislamientos obtenidos a partir de muestra de leche vacuna cruda, pasteurizada y UHT.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MUESTREO

Se obtuvo un total de 30 muestras a partir de dos muestreos individuales, separados por un lapso de 1 mes y medio. En el primero se obtuvieron 3 muestras de leche cruda, 3 de leche pasteurizada y 8 de leche UHT o producto final. En el segundo muestreo, se obtuvieron 2 muestras de leche cruda, 2 de leche pasteurizada y 12 de leche UHT.

El transporte de las muestras de leche vacuna cruda y pasteurizada fue en cadena de frío para evitar la propagación de microorganismos presentes en la matriz hasta el momento del procesamiento en el laboratorio.

5.2 ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Mientras las muestras de leche cruda y pasteurizada se procesaron inmediatamente al llegar al laboratorio, para evitar la proliferación de potenciales microorganismos contenidos en la misma o su posible contaminación, las muestras de producto terminado (leche UHT), se incubaron por 7 días antes de su análisis a 30 °C y 55 °C para mesófilos y termófilos, respectivamente.

5.3 CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS MICROBIANAS EN LAS MUESTRAS

Con el propósito de desagregar los glóbulos de grasa, 50 ml de las muestras de leche entera y semidescremada se diluyeron en 100 ml de PBS + Tween 80 (0.1%). Por otra parte, las muestras de leche descremada fueron diluidas únicamente en PBS. Posteriormente, todas las preparaciones fueron homogenizadas por agitación manual durante 2 minutos. Inmediatamente, en tubos cónicos se tomaron dos alícuotas de 50 ml de la mezcla que fueron centrifugados a 4000 G por 60 minutos. Posteriormente, el sedimento fue suspendido con 5 ml de tampón fosfato (PBS) estéril y a partir de esta concentración de células se realizaron los protocolos detallados a continuación.

5.4 AISLAMIENTO DE BACTERIAS AEROBIAS FORMADORAS DE ESPORAS

Para determinar la presencia de microorganismos esporulados aerobios mesófilos, se colocó la suspensión concentrada de células, de cada una de las muestras, en baño maría a 80 °C por 15 minutos y se realizaron diluciones en base 10 hasta 10^{-2} . Posteriormente, se inocularon 100 µl de cada dilución y de la suspensión concentrada de células sobre la superficie de placas individuales de agar BHI. Estas fueron incubadas a 35 °C durante 24 - 48 horas.

Específicamente, para *Bacillus cereus*, se realizó una dilución en proporción 1:10 de la concentración de células sometida al baño maría. Se tomaron 100 µl de esta dilución y la concentración de células inicial para sembrarlos en la superficie de agar Manitol Yema

de Huevo Polimixina (MYP). Estas cajas se dejaron en incubación a 30 °C por 24 a 48 horas.

5.5 AISLAMIENTO DE BACTERIAS ANAEROBIAS FORMADORAS DE ESPORAS

Para determinar la presencia de bacterias esporuladas anaerobias, se tomó 1 ml de la suspensión tratada térmicamente (ver apartado 5.4), y se inoculó en tubos conteniendo 9 ml caldo BHI + L-cisteína al 0.05%. Estos se incubaron por 72 horas a 35 °C dentro de cámaras herméticas, conteniendo generadores de atmósfera anaeróbica Oxoid™ AnaeroGen™ (Thermo Fisher Scientific, MA, E.E.U.U). Luego de la incubación, los cultivos se centrifugaron a 6000 G por 15 minutos. El sedimento obtenido fue suspendido en 2 ml de PBS estéril. A continuación, se ejecutaron diluciones hasta 10^{-2} y se transfirió 1 ml de las mismas y de la suspensión inicial, por siembra en profundidad, a agar Reinforced Clostridial fundido. Luego de solidificarse, se colocó una fina capa adicional de medio fundido (aproximadamente 45 °C) sobre la superficie de agar, para asegurar la correcta anaerobiosis. Las placas de agar Reinforced Clostridial fueron incubadas a 35 °C de 24 a 48 horas en cámaras herméticas que contenían generadores de anaerobiosis.

5.6 AISLAMIENTO DE BACTERIAS TERMÓFILAS

Para la detección de termófilos se tomó 1 ml de la suspensión concentrada de células, sin tratamiento térmico, y se colocó en 50 ml de agar BHI fundido para someterlo a 100 °C por 30 minutos, en baño María. A continuación, se dispuso en 3 cajas Petri, que fueron tomadas como repeticiones de cada una de las muestras y se incubaron a 55 °C por 24 a 48 horas.

5.7 PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS

Para cada una de las colonias encontradas, se realizó una descripción macroscópica y microscópica. La descripción microscópica se basó en tinción Gram y la macroscópica en la morfología colonial (forma, tamaño, color, bordes y elevación) de cada una de las colonias. A continuación, cada uno de los morfotipos coloniales fueron purificados en

agar nutriente. Se verificó la pureza de cada una de las cepas a partir de una tinción Gram para así poder ser preservadas.

Las cepas purificadas fueron cultivadas en 5 ml de caldo BHI y fueron incubadas por 24 - 48 horas bajo la temperatura óptima de crecimiento de cada aislamiento obtenido. Se colocaron 5 ml de glicerol estéril al 40% en el tubo que contenía el cultivo líquido. A continuación, se procedió a homogenizar y dispensar 1.5 ml de la dilución obtenida en microtubos de 1.5 ml. Estas cepas fueron conservadas en congelación.

5.8 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS

El ADN de cada una de las cepas fue extraído mediante el uso del kit Wizard® de purificación de ADN genómico (Promega, MD, E.E.U.U), siguiendo las instrucciones del fabricante. El material genético obtenido, fue caracterizado por una Reacción en Cadena de la Polimerasa Palindrómica de Elementos Repetitivos (REP-PCR, por sus siglas en inglés), para este procedimiento se utilizó el cebador (GTG)₅ descrito en la investigación de Švec, Sedláček, Chrápavá y Vandamme (2011).

Cada reacción de REP-PCR se realizó teniendo un volumen final de 25 μ l que incluyeron 9 μ l de agua libre de DNAsas, 14 μ l de Go Taq PCR (7 μ l de agua Milli-Q y 7 μ l de Go Taq PCR), 1 μ l del cebador (GTG)₅ y, por último, 1 μ l del ADN de cada cepa. Los ciclos programados para la REP-PCR dentro del termociclador fueron los siguientes: desnaturalización inicial a 94 °C por 7 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, anillamiento a 40 °C por un minuto, extensión a 65 °C por 8 minutos, elongación a 65 °C por 16 minutos y almacenamiento a 4 °C hasta por 99 horas (Švec, et al., 2008).

Con los productos de la REP-PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% (en tampón TAE 1X) al cual se adicionó 2 μ l de Tinte de gel de ADN SYBR™ Safe Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific, MA, E.E.U.U) por cada 100 ml de gel. La electroforesis se realizó a 160 voltios de potencia por 260 minutos. Además, se colocó una escalera de peso molecular, que constó de 4 μ l de la escalera molecular y 2 μ l del buffer de carga. La escalera molecular utilizada TrackIt™ 1Kb Plus DNA Ladder de

Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific, MA, E.E.U.U), cuenta con un intervalo de tamaños que va desde los 100 hasta los 15,000 pb, teniendo una banda de referencia a los 1,500 pb. Cabe recalcar, que se realizaron controles positivos y negativos. Para el control positivo se utilizaron los amplicones de una reacción previa REP-PCR de una cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 y para el negativo agua destilada. El resultado de la electroforesis se observó utilizando un fotodocumentador, por trans iluminación UV que detecta la tinción con SYBR™ Safe Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific, MA, E.E.U.U), para esto se utilizó el programa Image Lab (Bio-Rad Laboratories, CA, E.E.U.U), tomando en cuenta los siguientes parámetros, posición del filtro: filtro 1 (estándar) y área de la imagen: 16.9 x 12.6 cm.

Los perfiles de bandas obtenidos por el procedimiento antes mencionado fueron agrupados, en función de su similitud, en dendrogramas construidos con la herramienta Agrupación de la Media Aritmética No Ponderada (UPGMA, por sus siglas en inglés) del programa PyElph descrito por Pavel y Vasile (2012). A partir de agrupamientos de perfiles de bandas con 100% de similitud, se seleccionaron aislamientos representativos para amplificar, mediante PCR, el gen 16s del ARNr y su posterior identificación.

Para esto, se utilizaron los cebadores 16S-27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 16S-1540R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACT-3'). Además, la mezcla de reacción se constituyó de los siguientes elementos: 9 µl de agua libre de nucleasas, 13 µl de Go Taq PCR (6,5 µl de agua Milli-Q y 6,5 µl de Go Taq PCR), 1 µl del cebador 27F, 1 µl del primer 1540R, 1 µl del ADN de cada cepa, siendo el volumen total de la mezcla de 25 µl. La reacción tuvo lugar con base en el siguiente programa: Desnaturalización inicial a 94 °C por 3 minutos, 32 ciclos de: desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, anillamiento a 55 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 1 minuto, además de una extensión final a 72 °C por 5 minutos y almacenamiento a 4 °C por hasta 99 horas. Los amplicones obtenidos a partir de la PCR fueron secuenciados por el método de Sanger (Macrogen, Seúl, Corea del Sur).

Las secuencias obtenidas se editaron en el programa MEGA, y posteriormente fueron comparadas en bases de datos como Gen Bank, con su herramienta BLAST, y otras curadas como EZ Biocloud.

6 RESULTADOS

Como resultados de la caracterización molecular por REP-PCR, de las cepas bacterianas aisladas en cada muestreo, se obtuvieron perfiles de bandas en el gel de agarosa, los cuales fueron analizados con el programa PyElph. En el dendrograma del primer muestreo (Figura 1), se puede observar que se obtuvieron 5 grupos que contaban con el 100% de similitud entre sí con diferentes cepas tanto de producto final como de leche cruda y pasteurizada. También, en el dendrograma correspondiente al segundo muestreo (Figura 2), se puede observar que existen dos grupos con el 100% de similitud entre cepas aisladas de producto final, pasteurizadas y crudas, además de contar con aislamientos de diferentes marcas.

La secuenciación y el subsecuente alineamiento en las bases de datos de secuencias del gen 16S ARNr, de aislamientos representativos de cada uno de los grupos de perfiles de REP-PCR, permitió la identificación de las especies detalladas en las tablas 1 y 2. En el primer muestreo, dentro del grupo de mesófilos, destacan los géneros *Pantoea*, *Lactococcus* y *Pseudomonas*, mientras que, en el grupo de termófilos, predomina el género *Bacillus*. Por otra parte, a partir del segundo muestreo, se aislaron especies de *Pseudomonas*, *Lactococcus*, *Bacillus*, *Dermacoccus*, *Lacticaseibacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Enterobacter* y *Raoultella* en el grupo de mesófilos. Asimismo, en el grupo de termófilos en este muestreo se puede destacar *Enterococcus* spp. y *Bacillus* spp.

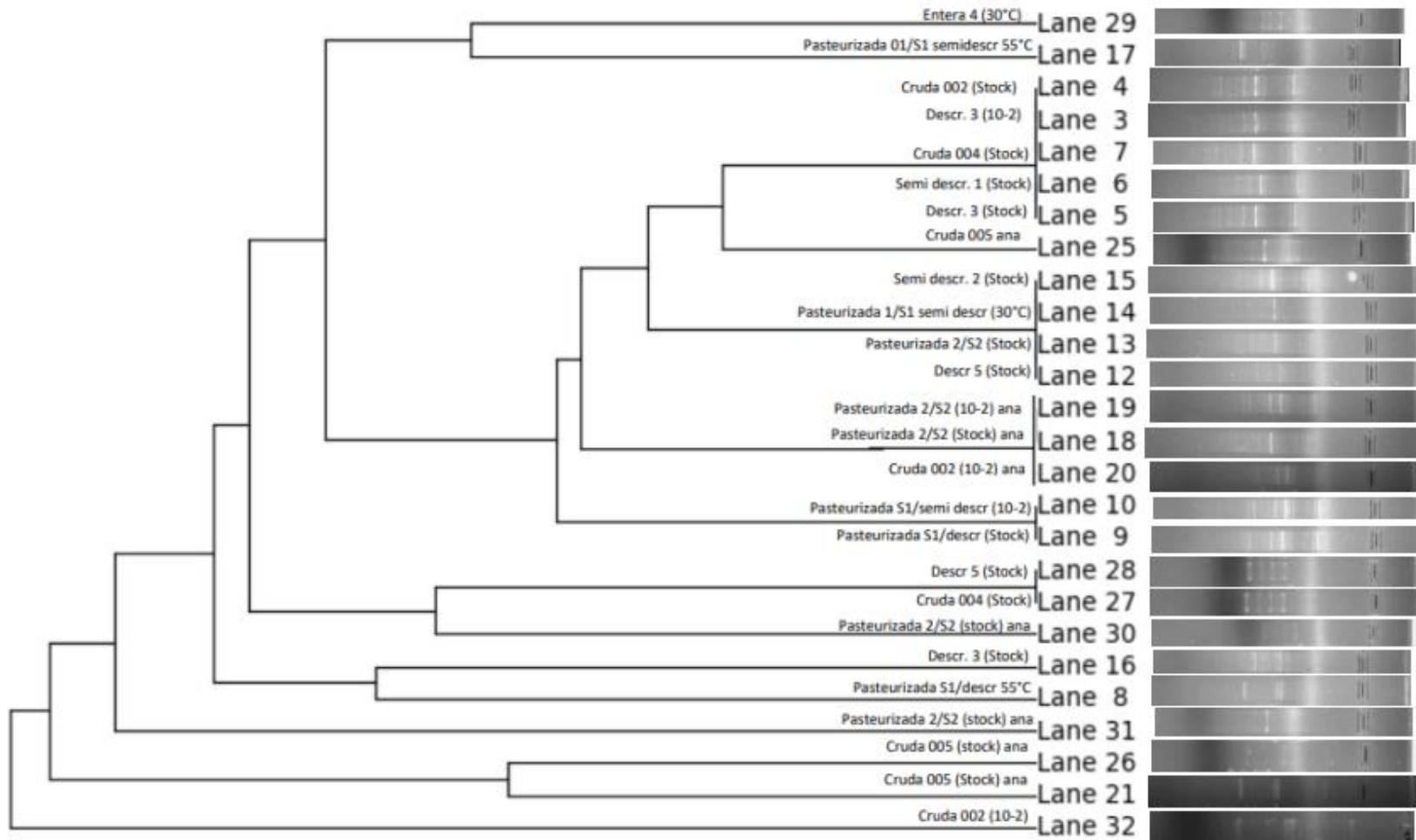


Figura 1. Dendrograma generado con los perfiles de bandas obtenidos de la REP-PCR de las cepas aisladas en el primer muestreo.

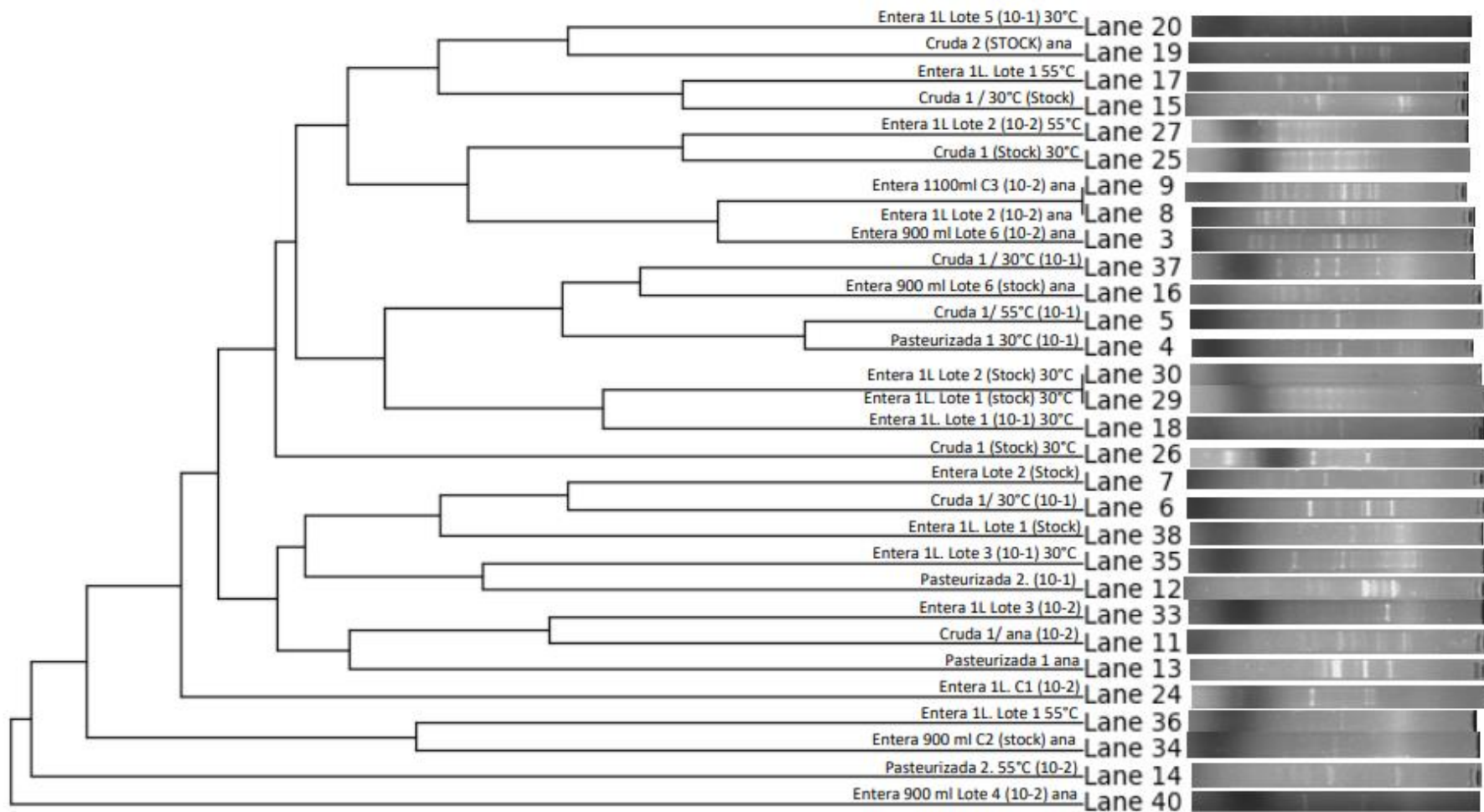


Figura 2. Dendrograma generado con los perfiles de bandas obtenidos de la REP-PCR de las cepas aisladas en el segundo muestreo.

Tabla 1. Especies bacterianas aisladas en el primer muestreo.

Muestra	Mesofílicas	Número de acceso a NCBI	Número de acceso a EZbioCloud	Descripción fenotípica	Termofílicas	Número de acceso a NCBI	Número de acceso a EZbioCloud	Descripción fenotípica
ML-CRUDA-002	<i>Pantoea conspicua</i>	MF083088.1	MLFN010000105	Bacilos Gram negativos cortos, agrupados en cadenas	<i>Clostridium argentinense</i>	X68316		Bacilos Gram positivos con espora terminal
ML-CRUDA-004	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	KJ530640.1	BALX01000047	Cocos Gram positivos, agrupados en racimos	----	----	----	----
	<i>Pseudomonas lactis</i>	MN629110.1	JYLO01000038	Bacilos Gram negativos alargados, agrupados en parejas				
	<i>Pantoea ananatis</i>	MN006231.1	JMJJ01000010	Bacilos Gram negativos cortos, agrupados en cadenas				
ML-CRUDA-005	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	MT825610.1	MNPV01000020	Bacilos Gram negativos alargados, agrupados en cadenas				
	<i>Pantoea deleyi</i>	----	EF688011	Bacilos Gram negativos cortos,				

				agrupados en cadenas				
Pasteurizada 002	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	KJ530640.1	BALX01000047	Cocos Gram positivos, agrupados en racimos	<i>Clostridium argentinense</i>	X68316		Bacilos Gram positivos con espora terminal
	<i>Pantoea conspicua</i>	MF083088.1	MLFN01000105	Bacilos Gram negativos cortos, agrupados en parejas				
	<i>Pantoea agglomerans</i>	KU922326.1	----	Bacilos Gram negativos cortos, agrupados en parejas o cadenas				
Pasteurizada 001 Descr	<i>Pantoea conspicua</i>	MF083088.1	MLFN01000105	Bacilos Gram negativos cortos, agrupados en parejas	<i>Bacillus licheniformis</i>	KP216573.1	AE017333	Bacilos Gram positivos esporulados, ligeramente alargados
Pasteurizada 001 SMD	<i>Pantoea conspicua</i>	MF083088.1	MLFN01000105	Bacilos Gram negativos cortos, agrupados en parejas	<i>Bacillus licheniformis</i>	KP216573.1	AE017333	Bacilos Gram positivos esporulados, ligeramente alargados
Producto terminado SMD 1	<i>Pantoea ananatis</i>	MN006231.1	JMJJ01000010	Bacilos Gram negativos cortos, agrupados en parejas				

Producto terminado SMD tetrapack 2	<i>Pantoea conspicua</i>	MF083088.1	MLFN01000105	Bacilos Gram negativos cortos, agrupados en parejas	----	----	----	----
Producto terminado Descr 3	<i>Pseudomonas lactis</i>	MN629110.1	JYLO01000038	Bacilos Gram negativos, agrupados en parejas				
	<i>Pantoea conspicua</i>	MF083088.1	MLFN01000105	Bacilos Gram negativos cortos, agrupados en parejas				
	<i>Pantoea ananatis</i>	MN006231.1	JMJJ01000010	Bacilos Gram negativos cortos, agrupados en parejas				
Identificación a nivel de especie de cepas, aisladas en el primer muestreo, con similitud > 98% del gen 16S ARNr frente a los números de acceso de EzBiocloud y Gene Bank arriba indicados.								

Tabla 2. Especies bacterianas aisladas en el segundo muestreo.

Muestra	Mesofílicas	Número de acceso a NCBI	Número de acceso a EZbioCloud	Descripción fenotípica	Termofílicas	Número de acceso a NCBI	Número de acceso a EZbioCloud	Descripción fenotípica
CRUDA 1	<i>Pseudomonas lactis</i>	MG269648.1	----	Bacilos Gram negativos, agrupados en parejas	<i>Enterococcus durans</i>	OP714496.1	----	Cocos Gram positivos, agrupados en parejas o cadenas cortas
	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	KJ530640.1	BALX01000047	Cocos Gram positivos, agrupados en racimos				
	<i>Bacillus licheniformis</i>	KP216573.1	AE017333	Bacilos Gram positivos esporulados, ligeramente alargados				
	<i>Dermaococcus nishinomiyaensis</i>	KM378574.1	X87757	Cocos Gram positivos agrupados en parejas o tétradas				
CRUDA 2	----	----	----	----	<i>Enterococcus durans</i>	OP714496.1	BCQB01000108	Cocos Gram positivos, agrupados en parejas o cadenas cortas
Pasteurizada 1	<i>Bacillus licheniformis</i>	KP216573.1	AE017333	Bacilos Gram positivos				

				esporulados, ligeramente alargados	----	----	----	----
	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	OP962433.1	D16550	Bacilos Gram positivos agrupados en cadenas cortas o parejas				
Pasteurizada 2	<i>Enterococcus durans</i>	OP714496.1	BCQB01000 108	Cocos Gram positivos, agrupados en parejas o cadenas cortas				
Entera (1L) Marca C1	<i>Enterococcus durans</i>	OP714496.1	BCQB01000 108	Cocos Gram positivos, agrupados en parejas o cadenas cortas				
Entera (900 ml) Marca C2	<i>Staphylococcus pasteuri</i>	MT072161.1	AF041361	Cocos Gram positivos agrupados en racimos				
Entera (1L) Lote: 1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MT585400.1	UHDF01000 003	Cocos Gram positivos agrupados en racimos	<i>Enterococcus durans</i>	OP714496. 1	BCQB01000 108	Cocos Gram positivos, agrupados en parejas o cadenas cortas
	<i>Enterobacter hormaechei</i>	OP413041.1	CP017186	Bacilos Gram negativos, agrupados en parejas				

	<i>Pseudomonas lactis</i>	MN629110.1	JYLO010000 38	Bacilos Gram negativos, agrupados en parejas				
Entera (1L) Lote: 2	<i>Pseudomonas lactis</i>	MN629110.1	JYLO010000 38	Bacilos Gram negativos, agrupados en parejas	<i>Bacillus licheniformis</i>	KP216573. 1	AE017333	Bacilos Gram positivos esporulados, ligeramente alargados
Entera (1100ml) Marca C3	<i>Enterobacter hormaechei</i>	OP413041.1	CP017186	Bacilos Gram negativos, agrupados en parejas				
Entera (1L) Lote: 3	<i>Enterococcus durans</i>	OP714496.1	BCQB01000 108	Cocos Gram positivos, agrupados en parejas o cadenas cortas				
Entera (900 ml) Lote: 4	<i>Bacillus licheniformis</i>	KP216573.1	AE017333	Bacilos Gram positivos esporulados, ligeramente alargados	----	----	----	----
Entera (1L) Lote: 5	<i>Enterococcus durans</i>	OP714496.1	BCQB01000 108	Cocos Gram positivos, agrupados en parejas o cadenas cortas				
	<i>Raoultella terrigena</i>	LR595855.1	Y17658	Bacilos Gram negativos,				

Entera (900ml) Lote: 6				agrupados en parejas				
	<i>Enterobacter hormaechei</i>	OP413041.1	CP017186	Bacilos Gram negativos, agrupados en parejas				
Identificación a nivel de especie de cepas, aisladas en el segundo muestreo, con similitud > 98% del gen 16S ARNr frente a los números de acceso de EzBiocloud y Gene Bank arriba indicados.								

7 DISCUSIÓN

Aunque la leche UHT ofrece una calidad microbiológica excepcional por el fundamento técnico de su procesamiento, algunas fallas en el proceso, la calidad microbiológica de la leche cruda utilizada en las industrias, entre otros, podrían incidir en un recuento alto de bacterias en el producto terminado (Kmiha et al., 2017). En conexión con esto, el presente estudio logró determinar bacterias contaminantes dentro de la cadena de producción de la leche.

Entre las bacterias más representativas aisladas de las muestras de leche analizadas se encuentra *Bacillus licheniformis*. Esta bacteria se logró aislar a partir de muestras de leche vacuna cruda, pasteurizada y también de producto UHT. Además, tuvo la capacidad de crecer tanto a 35 °C como a 55 °C. Esto puede ser explicado teniendo en cuenta investigaciones como la realizada por Calvo-Gómez (2018), en donde se menciona la capacidad de esta bacteria para desarrollarse tanto en condiciones mesofílicas como termofílicas, también se menciona que el género *Bacillus* tiene la capacidad de formar esporas y, por ende, tiene la posibilidad de sobrevivir a tratamientos térmicos con mayor facilidad. Además, en ciertos estudios se menciona la posible presencia de esta bacteria en el suelo, pero también como microbiota normal en ubres e intestino de las vacas (Reyes, Cagnasso, Córser, D'Pool, Urdaneta y Valero, 2001). Se puede explicar la presencia de esta bacteria en las matrices de leche cruda, pasteurizada y UHT, basándose en los hallazgos de estudios como el realizado por Weber, Liedtke, Plattes y Lipski (2019), en donde se menciona la capacidad de *B. licheniformis* para producir proteasas resistentes al calor y su capacidad de adherirse al acero inoxidable y, por ende, su gran capacidad de formar biopelículas, por lo que se puede inferir que dentro de la industria existe la probabilidad de que estas bacterias hayan formado una biopelícula que pueda generar un ciclo de contaminación en el producto.

Otra bacteria encontrada que fue representativa dentro de las muestras de leche cruda y pasteurizada fue *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Esta bacteria se ha descrito en ciertos estudios, donde se ha logrado determinar su resistencia frente a varios factores físicos no favorables, pudiendo crecer a 40 °C, soportando pH altamente alcalino y salinidad de hasta el 3% (Pérez Meza, 2019). También, esta bacteria se ha detectado con anterioridad en muestras de leche procesada por UHT (Bernier, Cárdena y Piñeros, 2012). Además, se

encontró la bacteria *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans* en una muestra de leche pasteurizada, lo que ha sido mencionado con anterioridad en algunos estudios como el realizado por Kazou, Gavriil, Kalagkatsi, Paschos y Tsakalidou (2022). Adicionalmente, en algunos estudios se explica la capacidad termorresistente adquirida de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) por una exposición sucesiva a altas temperaturas de choque térmico, determinando así, que las bacterias probablemente sobrevivan por estar sometidas constantemente a periodos prolongados de exposición al calor o tratamientos térmicos (León, Totosaus, Guerrero y Pérez, 2006). En conexión con esto, las bacterias aisladas en el presente estudio podrían estar adaptadas a los periodos prolongados de exposición al calor que existen durante los tratamientos térmicos implementados en las industrias.

Aislamientos pertenecientes al género *Enterococcus* fueron detectados en condiciones termofílicas en muestras de leche cruda y de producto final, además de ser aislado, mostrando un crecimiento mesofílico, a partir de muestras de leche pasteurizada y de producto final. La presencia de este género bacteriano en las muestras de leche analizadas, se podría fundamentar por la resistencia que tiene esta bacteria a condiciones de salinidad de hasta 6.5%, su crecimiento en temperaturas de 45 °C y superiores, además de soportar pH de hasta 9.6 (Díaz Pérez, Rodríguez Martínez y Zhurbenko, 2010). También, en algunos estudios se indica que *E. durans* ha sido aislado de intestinos de mamíferos (Núñez Martínez, 2020), lo que puede indicar su presencia en muestras de leche por contaminación cruzada. También, en estudios como el realizado por Pereda, Ferragut, Quevedo, Guamis y Trujillo (2007), se menciona la capacidad de estas bacterias para resistir la pasteurización convencional, e incluso, se describe la supervivencia a tratamientos con presiones elevadas de 200 MPa y en muestras de leche que han sido sometidas a un tratamiento térmico previo como el UHT, reforzando los hallazgos obtenidos en el presente estudio al notar la resistencia a los tratamientos térmicos como la pasteurización y UHT.

Adicionalmente, una bacteria que llama la atención dentro de los aislamientos obtenidos es *Dermacoccus nishinomiyaensis*. Esta bacteria es un coco Gram positivo el cual ha sido reportado como formador de biopelículas en máquinas de ordeño (Weber, Liedtke, Plattes y Lipski, 2019), lo que podría explicar su presencia dentro de las muestras de leche cruda procesadas en el presente estudio.

En el estudio se consiguió aislar, a partir de las muestras de leche UHT de dos marcas distintas, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus pasteurii*. Dentro de la industria láctea se ha reportado la presencia de *Staphylococcus* spp, proviniendo de diferentes fuentes como la leche cruda, los equipos de almacenamiento y ordeño de leche, además de estar presente como microbiota normal de los manipuladores de alimentos y en el medio ambiente en general (Cruzado, Silva, Rodrigues, Saldaña, Contreras y Sturion, 2018). Además, las especies de este género producen proteínas de adhesión que se localizan en la pared celular bacteriana, lo que facilita la formación de biopelículas y la colonización en superficies, afectando así la calidad microbiológica de los productos derivados al generarse una contaminación cruzada (Albuja, Escobar y Andueza, 2021). De esta manera, se podría explicar la presencia de las bacterias antes descritas en las muestras analizadas en el estudio, teniendo en cuenta que se podría tratar de una contaminación cruzada y posibles fallos en el control de puntos críticos dentro de la industria.

Clostridium argentinense fue encontrado dentro de muestras de leche cruda y pasteurizada. Las posibles razones para su presencia en esta matriz están bien delimitadas. Las bacterias de este género se caracterizan por formar esporas terminales altamente resistentes al calor y se encuentran distribuidas ampliamente en la naturaleza (Arias Martínez, 2013). Además, algunas especies de *Clostridium* dentro del grupo *argentinense*, forman parte de la microbiota intestinal y fecal del ganado vacuno. Por lo que una de las razones para su presencia dentro de este tipo de muestras, es contaminación con materia fecal del ganado en el proceso de ordeño y, también, estas bacterias pueden contaminar el silaje utilizado para la alimentación de estos animales (Thomas, Dalla Fontana, Ramos, Demaria, Costamagna, Faggiano y Bonzi, 2012). La presencia de este grupo bacteriano dentro de la matriz analizada es preocupante, dado que, dentro del grupo *argentinense* se encuentra la bacteria *C. botulinum*, la cual puede causar botulismo por ingestión de la misma, convirtiéndose en un peligro para el consumidor (Suen, Hatheway, Steigerwalt y Brenner, 1988).

Comúnmente, las bacterias que se caracterizan por ser más resistentes a condiciones adversas y altas temperaturas son las Gram positivas, por diversos factores relacionados como la producción de esporas resistentes al calor (Calvo-Gómez, 2018). Sin embargo, ciertas bacterias Gram negativas han desarrollado la capacidad de sobrevivir a

condiciones adversas adaptando distintos mecanismos de defensa. En conexión con esto, en el estudio realizado por León, Totosaus, Guerrero y Pérez (2006), se describen ciertos cocos y cocobacilos Gram negativos que resistieron a un baño térmico de 72 °C durante 30 minutos, los cuales fueron aislados de superficies de productos cárnicos, llegando a la conclusión de que las bacterias sobrevivían por exposición prolongada a choques térmicos de calor.

Además de la capacidad adaptativa de las bacterias arriba descritas, se ha observado la posibilidad de formación de biopelículas que representan un gran problema en la industria de alimentos, perjudicando en varios ámbitos de las mismas y generando un ciclo de contaminación constante (Fernández, Prieto, Fernández, López y Álvarez, 2020). Algunas de las consecuencias más comunes generados por estos consorcios bacterianos, en la cadena de producción de leche UHT, son la escasa transferencia de calor y la inefectividad de medios químicos como desinfectantes, por lo que la sanitización comúnmente utilizada puede no ser adecuada (Navia, Villada y Mosquera, 2010). Esto, podría explicar la presencia de bacterias Gram negativas encontradas dentro de este estudio. Estas bacterias pueden ser indicadoras de contaminación en puntos críticos dentro del proceso de producción de la leche, ya que las estructuras como biopelículas permiten la resistencia a factores físicos y químicos de control microbiológico. Adicionalmente, en los aislamientos obtenidos se logró detectar *Pseudomonas lactis* y *P. azotoformans*. Su presencia dentro de la matriz podría deberse a que cepas de *Pseudomonas* spp. han sido reportadas como importantes formadoras de biopelículas por su capacidad de adherirse al acero inoxidable, además de asociarse con otros géneros bacterianos para estructurar esta comunidad (Navia, Villada y Mosquera, 2010). También, este género ha sido clasificado como uno de los más prevalentes en la microbiota de la leche de vacas sanas, lo que puede indicar contaminación en el proceso de ordeño, empezando los procesos con una materia prima deficiente (Addis, Tanca, Uzzau, Oikonomou, Bicalho y Moroni, 2016).

Dentro de las bacterias Gram negativas obtenidas en el estudio, también se destacó el género *Pantoea* spp, el cual fue encontrado dentro de muestras de leche cruda, pasteurizada y UHT. Este género bacteriano posee especies que pueden ser aisladas de muestras tanto humanas como animales, siendo el caso de *P. agglomerans* y *P. conspicua*, además, incluye especies que pueden ser aisladas de semillas, plantas, suelo y agua como

P. ananatis y *P. deleyi* (Lopardo, Predari y Vay, 2014). De manera similar, en ciertas investigaciones, como la realizada por Weber et al. (2019), se detectó *P. agglomerans* formando biopelículas dentro de dos granjas, tanto en las máquinas de ordeño como en los tanques para el almacenamiento de la materia prima. Además, en el estudio realizado por Soto, Albán y Gómez (2022) se determinó como contaminante importante a *Pantoea* spp de leche en polvo para infantes dentro de Quito, Ecuador. También, se menciona que esta bacteria puede ser contaminante por malas prácticas de manufactura (Carrión, 2020), por lo que se puede inferir que, en el caso del presente estudio, es posible que sea un contaminante dentro de la cadena de producción, más no de un proceso defectuoso de los tratamientos térmicos utilizados, encontrando a las especies *P. deleyi*, *P. conspicua* y *P. ananatis*.

Otra bacteria representativa que se encontró dentro de muestras de leche UHT fue *Raoultella terrigena*, habitante normal del suelo, agua y tejidos vegetales (Cubero, Brenes, Vidaurre y Uribe, 2021). Asimismo, esta especie se ha logrado recuperar de muestras recolectadas dentro de una granja en partes específicas de las máquinas de ordeño como son los retenedores del equipo como es mostrado en el estudio realizado por Weber et al. (2019). En conexión con esto, en el mismo estudio, se ha evidenciado que cepas de esta especie son capaces de formar biopelículas y además producir enzimas proteolíticas que podrían afectar al producto final de las industrias lecheras. Esta información guarda relación con la presencia de esta bacteria dentro de las muestras procesadas en el presente estudio. Además de resaltar la importancia de mantener el cuidado en puntos críticos de control para así evitar la contaminación cruzada o supervivencia de microorganismos dentro de la industria, teniendo como preámbulo que los puntos críticos de control son fases de los procesos en donde es imprescindible aplicar un control para poder eliminar o, en su defecto prevenir, un incidente peligroso que está relacionado con la inocuidad del alimento a tratar (Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria, 2016).

Dentro de la presente investigación, se analizaron distintas marcas de leche con producto UHT. A partir de muestras de la marca “C1” se pudo detectar *Enterococcus durans*, lo que coincide con otros hallazgos dentro de las otras marcas analizadas, igualmente de producto UHT, lo que puede indicar que existe un problema generalizado con bacterias que pueden resistir a los tratamientos térmicos. Además, en la marca “C3”

se encontró *Enterobacter hormaechei*, lo que coincide igualmente con hallazgos en productos UHT de otra marca evaluada. La presencia de esta bacteria en leche UHT es preocupante al ser un patógeno oportunista y al ser una bacteria con resistencia innata a ciertos antimicrobianos por la producción de β -lactamasas, además es una de las bacterias mayormente causantes de infecciones en humanos dentro del complejo *Enterobacter cloacae* (Silva y Martínez, 2018). Dentro de los resultados del presente estudio se puede notar que existe mayor cantidad de aislamientos dentro de las muestras de leche vacuna tratada por UHT que en las leches pasteurizadas y crudas, esto se debe a la menor cantidad de muestras procesadas de este tipo.

8 CONCLUSIONES

La metodología utilizada permitió el aislamiento de bacterias mesofílicas, termofílicas, aerobias y anaerobias a partir de leche vacuna cruda, pasteurizada y UHT. En ese contexto, la fase de concentración de las muestras fue una herramienta crucial para poder estudiar la microbiota presente dentro de las muestras de leche estudiadas, permitiendo obtener una mayor información a comparación de las metodologías utilizadas tradicionalmente para el control de calidad de los productos. Además, la REP-PCR permitió encontrar grupos homogéneos dentro de los aislamientos obtenidos en el muestreo, mostrando similitud entre cepas facilitando su posterior secuenciación.

Los hallazgos obtenidos en el presente estudio sugieren que existe un problema general de bacterias que pueden resistir a los tratamientos térmicos. Este es el caso de *Enterococcus durans* y *Enterobacter hormachei* que se encontraron en productos finales (UHT) de distintas marcas, además de encontrarse también en leche cruda y pasteurizada. También se logró identificar a distintas especies del género *Pantoea*, en muestras de diferentes fases de la cadena de producción de la leche. Esto sugiere una potencial deficiencia en los tratamientos térmicos utilizados convencionalmente o relacionarse a una posible contaminación cruzada dentro del proceso de producción de la leche.

A diferencia de los resultados esperados, se pudieron obtener varios aislamientos correspondientes a bacterias Gram negativas que sobreviven a los tratamientos térmicos, indicando que no necesariamente las únicas bacterias que sobreviven a dichos tratamientos son las bacterias formadoras de esporas.

Se puede complementar la normativa local utilizada realizando un análisis adicional con la metodología presentada en esta investigación, puesto que se puede considerar a profundidad las bacterias presentes en las muestras de los lotes analizados y no únicamente el número de UFC contenido en las mismas, aumentando así la calidad microbiológica de los productos finales lácteos y, por ende, su vida útil.

Se encontraron varios géneros bacterianos como *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Pantoea*, *Raoultella*, *Dermacoccus* y *Bacillus* que en distintas investigaciones se han descrito como formadores importantes de biopelículas en las industrias, por lo que se evidencia la importancia de verificar mediante futuras investigaciones la capacidad formadora de biopelículas de las cepas aisladas en este estudio.

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addis, M., Tanca, A., Uzzau, S., Oikonomou, G., Bicalho, R. y Moroni, P. (2016). The bovine milk microbiota: insights and perspectives from-omics studies. *Molecular biosystems*, 12(8), 2359-2372.
- Alban, G., Arguello, A. y Molina, N. (2020). Metodologías de investigación educativa (descriptivas, experimentales, participativas, y de investigación-acción). *Recimundo*, 4(3), 163-173. [https://doi.org/10.26820/recimundo/4.\(3\).julio.2020.163-173](https://doi.org/10.26820/recimundo/4.(3).julio.2020.163-173)
- Albuja, A., Escobar, S. y Andueza Leal, F. (2021). Calidad bacteriológica de la leche cruda bovina almacenada en el centro de acopio Mocha. Tungurahua. Ecuador. *Siembra*, 8(2)
- Arias Martínez, C. (2013). *Recuento y caracterización de Clostridium spp. en la ración unifeed y en la leche en relación con las condiciones higiénico-sanitarias y de manejo de las ganaderías de oveja manchega*. Disertación de doctorado no publicada, Universidad de Castilla-La Mancha, Toledo, España.
- Bernier, I., Cárdena, E., & Piñeros, O. A. (2012). *Bacillus sporothermodurans* anaeróbicos facultativos aislados de leches UHT elaboradas en Colombia. *Alimentos Hoy*, 21(27), 126-138.
- Calvo-Gómez, M. E. (2018). *Identificación de microorganismos termodúricos provenientes de leche cruda productores de enzimas de deterioro, y evaluación de su actividad en biofilms*. Disertación de grado no publicada, Universidad de la República Uruguay, Montevideo, Uruguay.
- Carrión, K. (2020). *Análisis de la calidad microbiológica de fórmulas infantiles en polvo comercializadas en la ciudad de Quito*. Disertación de grado no publicada, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Carrosio-Benvenuto, S. (2014). *Caracterización de microorganismos esporulados presentes en leche pasteurizada comercial y leche cruda provenientes de tambos*. Disertación de grado no publicada, Universidad de la República Oriental de Uruguay, Montevideo, Uruguay.

- Castañeda-Carrasquilla, S. L. (2015). Caracterización de la microbiota de leche ultra alta temperatura (UAT, UHT) analizada en Bogotá. *Investigaciones en seguridad social salud*, 17(2), 37-43.
- Cruzado, M., Silva, N., Rodrigues, M., Saldaña, E., Contreras, C. y Sturion, G. (2018). Biopelículas de *Staphylococcus* spp. sobre acero inoxidable utilizando leche y brain heart infusion broth como medios de cultivo. *Scientia Agropecuaria*, 9(4), 485-491.
- Cubero, D., Brenes, L., Vidaurre, D., & Uribe, L. (2021). *Raoultella terrigena* y *Pectobacterium carotovorum* en hortalizas en dos provincias de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 32(1), 178-195.
- Díaz Pérez, M., Rodríguez Martínez, C., & Zhurbenko, R. (2010). Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 48(2), 147-161.
- Estrada-Anzueto, M. (2014). *Tracking heat-resistant, sporeforming bacteria in the milk chain: a farm to table approach*. Disertación de maestría publicada, University of Nebraska-Lincoln, Nebraska, Estados Unidos.
- Fernández-Gómez, P., Prieto, M., Fernández-Escámez, P., López, M. y Alvarez-Ordóñez, A. (2020). Biopelículas y persistencia microbiana en la industria alimentaria. *Arbor*, 196 (795): a538. <https://doi.org/10.3989/arbor.2020.795n1002>
- Gopal, N., Hill, C., Ross, P., Beresford, T., Fenelon, M. y Cotter, P. (2015). The prevalence and control of *Bacillus* and related spore-forming bacteria in the dairy industry. *Frontiers in microbiology*, 6, 1418. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01418>
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. (1983). *Leche y productos lácteos: muestreo (NTE INEN 4)*. Recuperado de <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/4-1.pdf>
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. (2003). *Leche larga vida. Método para el control de la esterilidad comercial (NTE INEN 2 335)*. Recuperado de <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/2335.pdf>

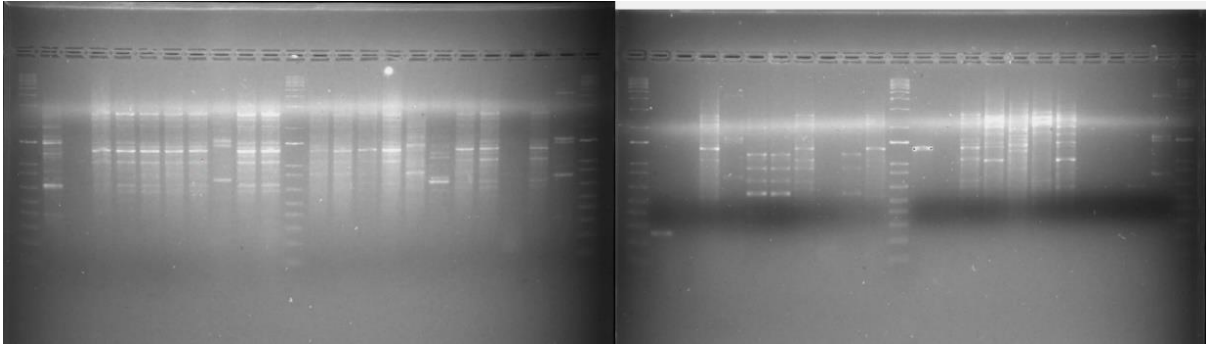
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. (2008). *Leche cruda. Requisitos (NTE INEN 9)*. Recuperado de <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/9.pdf>
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. (2009). *Leche larga vida. Requisitos (NTE INEN 701)*. Recuperado de <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/701-2.pdf>
- Kazou, M., Gavriil, A., Kalagkatsi, O., Paschos, T. y Tsakalidou, E. (2022). The impact of different inoculation schemes on the microbiota, physicochemical and sensory characteristics of Greek Kopanisti cheese throughout production and ripening. *Microorganisms*, *11*(1), 66.
- Kmiha, S., Aouadhi, C., Klibi, A., Jouini, A., Béjaoui, A., Mejri, S. y Maaroufi, A. (2017). Seasonal and regional occurrence of heat-resistant spore-forming bacteria in the course of ultra-high temperature milk production in Tunisia. *Journal of dairy science*, *100*(8), 6090-6099. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11616>
- León, T., Totosaus, A., Guerrero, I. y Pérez-Chabela, M. L. (2006). Thermoresistant Lactic Acid Bacteria Effect on Cooked Sausages. *CYTA-Journal of Food*, *5*(2), 135-141.
- Lopardo, H., Predari, S. y Vay, C. (2014). Manual de microbiología clínica de la asociación argentina de microbiología. *Revista Argentina de Microbiología*, *80* (1), 141-142.
- Mehta, D., Metzger, L., Hassan, A., Nelson, B. y Patel, H. (2019). The ability of spore formers to degrade milk proteins, fat, phospholipids, common stabilizers, and exopolysaccharides. *Journal of dairy science*, *102*(12), 10799-10813. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16623>
- Mohamed, A., Alnakip, M. y Aal, S. (2016). Occurrence of *Bacillus cereus* in raw milk and some dairy products in Egypt. *Japanese Journal of veterinary research*, *64*(2), S95-S103.
- Navia, D. P., Villada, H. S., & Mosquera, S. A. (2010). Las biopelículas en la industria de alimentos. *Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial*, *8*(2), 118-128.

- Núñez Martínez, R. (2020) *Importancia actual del Género Enterococcus spp. en los alimentos y metodologías para su caracterización molecular*. Disertación de masterado no publicada, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España.
- Oñate-Haro, J. M. (2018). *Cadena agroalimentaria de la leche vacuna en Ecuador y sus potencialidades exportadoras. Periodo 2008-2015*. Disertación de grado no publicada, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria. (2016). *Manual de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control-HACCP*. Recuperado de <https://www.oirsa.org/contenido/biblioteca/Manual%20de%20an%C3%A1lisis%20de%20peligros%20y%20puntos%20cr%C3%ADticos%20de%20control%20-%20HACCP.pdf>
- Pavel, A. y Vasile, C. (2012). PyElph-a software tool for gel images analysis and phylogenetics. *BMC bioinformatics*, 13(1), 1-6.
- Pérez Meza, Y. (2019). *Evaluación de la actividad probiótica y antimicrobiana de Lactococcus lactis subsp. lactis aislado de un producto lácteo artesanal*. Disertación de grado no publicada, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.
- Promega. (2020). *Wizard Genomic DNA Purification Kit Technical Manual*. Recuperado de <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol/>
- Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J. M., Guamis, B. y Trujillo, A. J. (2007). Effects of ultra-high pressure homogenization on microbial and physicochemical shelf life of milk. *Journal of dairy science*, 90(3), 1081-1093.
- Reyes, J., Cagnasso, M., Córser, P., D'Pool, G., Urdaneta, A. y Valero, K. (2001). Resistencia a los antimicrobianos de especies de *Bacillus* aislados de leche cruda. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 11(6), 479-485.
- Ribeiro, J., Tamanini, R., de Oliveira, A., Ribeiro, J. y Beloti, V. (2018). Spoilage potential of spore-forming bacteria from refrigerated raw milk. *Semina: Ciências Agrárias*, 39(5), 2049-2057. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n5p2049>

- Silva, F. y Martínez, P. (2018). Complejo *Enterobacter cloacae*. *Revista chilena de infectología*, 35(3), 297-298.
- Soto, R., Albán, K. y Gómez, L. (2022). Análisis microbiológico de preparados en polvo para lactantes comercializados en Quito, Ecuador. *ACI Avances en Ciencias e Ingenierías*, 14(1).
- Suen, J., Hatheway, C., Steigerwalt, A. y Brenner, D. (1988). *Clostridium argentinense* sp. nov.: a genetically homogeneous group composed of all strains of *Clostridium botulinum* toxin type G and some nontoxigenic strains previously identified as *Clostridium subterminale* or *Clostridium hastiforme*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38(4), 375-381.
- Švec, P., Nováková, D., Žáčková, L., Kukletová, M., & Sedláček, I. (2008). Evaluation of (GTG)5-PCR for rapid identification of *Streptococcus mutans*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 94(4), 573–579. doi:10.1007/s10482-008-9275-6
- Švec, P., Sedláček, I., Chrápavá, M. y Vandamme, P. (2011). (GTG) 5-PCR fingerprinting of lactobacilli isolated from cervix of healthy women. *Folia microbiologica*, 56(1), 80-83.
- Thermo Fisher Scientific. (2016). *SYBR™ Safe DNA Gel Stain Invitrogen™*. Obtenido de Thermo Fisher Scientific: https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/sybr_safe_dna_gel_stain_man.pdf?_ga=2.235775937.1924819560.1689424206-1071440573.1675102129
- Thermo Fisher Scientific. (2018). *TrackIt™ 1Kb Plus DNA Ladder Invitrogen™*. Obtenido de Thermo Fisher Scientific: https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0000843_trackit-1kb-plusDNAladder_PI.pdf?_ga=2.236734401.1924819560.1689424206-1071440573.1675102129
- Thermo Fisher Scientific. (2022). *AnaeroGen™*. Obtenido de Thermo Fisher Scientific: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMBD%2FInstructions%2FMBD_BT_IFU-0680%20AN0010C%20ANAEROGEN%20COMPACT.pdf

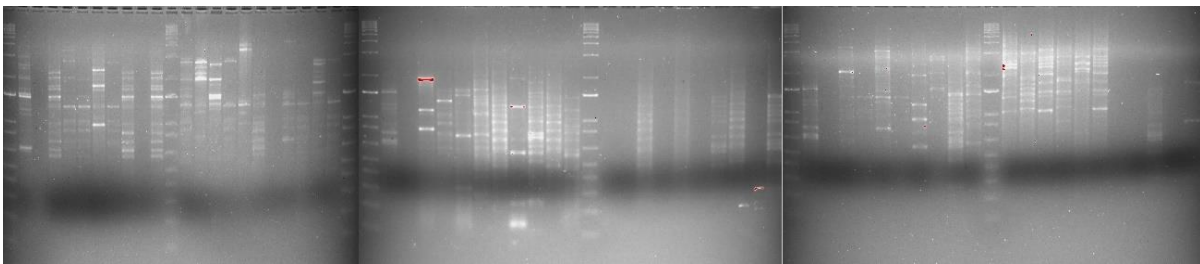
- Thomas, J., Dalla Fontana, I., Ramos, E., Demaria, M., Costamagna, D., Faggiano, M. y Bonzi, E. (2012). Factores de riesgo de contaminación de la leche con bacterias esporuladas (*Clostridium*) en establecimientos lecheros de la provincia de santa fe. *Fave. Sección ciencias agrarias*, *11*(1), 19-28.
- Weber, M., Liedtke, J., Plattes, S. y Lipski, A. (2019). Bacterial community composition of biofilms in milking machines of two dairy farms assessed by a combination of culture-dependent and-independent methods. *PLoS One*, *14*(9), e0222238.

10 ANEXOS



Anexo 1. Compendio de los geles de agarosa correspondientes a los mesófilos y termófilos aislados en el primer muestreo.

Los carriles 1, 10, 21, 22, 31 y 39 son escaleras moleculares, mientras que los carriles 2 y 23 son carriles correspondientes a controles positivos.



Anexo 2. Compendio de los geles de agarosa correspondientes a mesófilos y termófilos aislados en el segundo muestreo.

Los carriles correspondientes a estas muestras son: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 26, 27, 29, 32, 34, 35, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 57. Las escaleras moleculares corresponden a los carriles: 1, 10, 21, 22, 33, 39 y 49. Controles positivos son los correspondientes a los carriles: 2, 23 y 40.