

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Detección de bacterias psicrotróficas y enzimas deterioradoras en leche cruda y
procesada por Ultra Alta Temperatura (UHT)**

Disertación previa a la obtención del título de Microbiólogo

ESTEBAN MAYORGA ESTRELLA

Quito, 2024

CERTIFICACIÓN

Certifico que la Disertación de grado en Microbiología del señor. Esteban Mayorga Estrella ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



PhD. Martín Marcial Coba

Director de la Disertación

Quito, 12 de julio del 2024

4. DEDICATORIA

Con todo el amor dedico este trabajo a mi creador, por su inmenso amor y su inagotable misericordia. A mis seres queridos que nunca dejaron de apoyarme en este proceso.

5. AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer infinitamente a mis padres por haberme dado el mejor ejemplo de la tenacidad y del amor incondicional. Agradezco cada una de sus palabras de motivación, reprensión y reflexión. Gracias por tanta paciencia y amor.

A mis hermanos les agradezco por siempre instruirme y mostrarme su fe en mí.

Agradezco a cada uno de los profesores de esta maravillosa carrera por compartir conmigo su conocimiento y su pasión por la microbiología.

A mi tutor, Martín Marcial por su tiempo, paciencia y perseverancia para la realización de este proyecto.

A mis amigos por permitirme disfrutar de su compañía durante estos años dentro y fuera de las aulas de clase.

TABLA DE CONTENIDOS

3. CERTIFICACIÓN	III
4. DEDICATORIA	IV
5. AGRADECIMIENTOS	V
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	6
OBJETIVO GENERAL	6
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
4. MATERIALES Y MÉTODOS	6
4.1 MUESTREO Y ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA	6
4.2 CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS MICROBIANAS EN LAS MUESTRAS	7
4.3 AISLAMIENTO DE BACTERIAS PSICROTRÓFICAS	7
4.4 PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE BACTERIAS PSICROTRÓFICAS AISLADAS	7
4.5 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS PSICROTRÓFICAS AISLADAS BACTERIANOS	8
5. RESULTADOS	9
6. DISCUSIÓN	14
7. CONCLUSIONES	18
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

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.....	10
Figura 2. Dendrograma generado con los perfiles de bandas obtenidos de la REP-PCR de las cepas aisladas en el segundo muestreo.....	11

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Especies bacterianas identificadas del primer muestro.....	11
Tabla 2. Especies bacterianas identificadas del segundo muestreo.....	13

1. RESUMEN

La leche bovina es un alimento popular en todo el mundo debido a su alto contenido de proteínas, calcio y vitaminas. Sin embargo, también puede ser susceptible a la contaminación por bacterias debido a su composición rica en nutrientes, su elevada actividad de agua y su pH casi neutro. Si no se maneja adecuadamente durante la producción y el almacenamiento, la presencia de microorganismos puede afectar su calidad y seguridad, haciéndola un medio propicio para el crecimiento de bacterias. Por esto, se han desarrollado diferentes protocolos térmicos, permitiendo su consumo de forma segura. Sin embargo, existen bacterias psicrotróficas capaces de proliferar a temperaturas de refrigeración sintetizando enzimas termorresistentes que afectan la calidad y vida útil del producto. El estudio de estas bacterias no se realiza de forma habitual. Por lo que, este estudio permitió el aislamiento e identificación de estas bacterias presentes en leche cruda, pasteurizada y UHT. Esto fue posible mediante protocolos específicos para su aislamiento y el uso de técnicas moleculares para su identificación a nivel de especie. Se observó la prevalencia de distintos géneros bacterianos como *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Janthinobacterium* y *Flavobacterium*. Siendo *Pseudomonas* spp. el género bacteriano con mayor incidencia en muestras de leche cruda. El aislamiento de estos géneros a partir de leche UHT indica un fallo en la cadena de producción. La metodología descrita podría complementar la normativa local.

Palabras clave: Bacterias psicrotróficas, leche, UHT, técnicas moleculares.

2. ABSTRACT

Bovine milk is a popular food worldwide due to its high content of proteins, calcium, and vitamins. However, it can also be susceptible to bacterial contamination due to its nutrient-rich composition, high water activity, and nearly neutral pH. Improper handling during production and storage can compromise its quality and safety, creating a conducive environment for bacterial growth. As a result, various thermal protocols have been developed to ensure safe consumption. Nevertheless, psychrotrophic bacteria capable of thriving at refrigeration temperatures and synthesizing heat-resistant enzymes can adversely affect product quality and shelf life. The study of these bacteria is not commonly conducted; thus, this research facilitated the isolation and identification of such bacteria in raw, pasteurized, and UHT milk. This was made possible through specific isolation protocols and the use of molecular techniques for species-level identification. Various bacterial genera were observed, including *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Janthinobacterium*, and *Flavobacterium*, with *Pseudomonas* spp. showing the highest incidence in raw milk samples. The isolation of these genera from UHT milk indicates a breakdown in the production chain. The described methodology could complement local regulations.

Keywords: Psychrotrophic bacteria, milk, UHT, molecular techniques.

3. INTRODUCCIÓN

La leche bovina es un producto que se destaca por sus valiosas propiedades nutricionales, como la presencia de: vitaminas (A, B12 y D), minerales (calcio, fósforo, magnesio, yodo, selenio), grasas y proteínas (Maisano, 2022). Por esta razón el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) recomienda su consumo con mayor énfasis en la niñez. Gracias a la presencia de calcio, su ingesta fortalece la estructura ósea de los humanos. En países en vías de desarrollo, el consumo de leche es una herramienta para combatir la desnutrición infantil. Además, puede proporcionar hasta un tercio de las proteínas necesarias para una dieta balanceada. Por tal motivo, es un producto de consumo diario en todo el mundo. De igual manera, el sector lechero es de gran importancia a nivel económico. En este contexto, en Ecuador, se producen alrededor de 6 millones de litros de leche cruda de forma diaria. Permitiendo así que más de un millón y medio de ecuatorianos generen ingresos de forma directa e indirecta (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2020). Dentro del país, se han realizado campañas para concientizar sobre sus beneficios y aumentar su demanda; por lo que muchas veces acompañada de otros alimentos, su consumo es parte de la cultura ecuatoriana.

El alto valor nutricional de la leche bovina favorece al desarrollo de microorganismos, entre ellos, deterioradores y patógenos como: *Salmonella* spp., *E. coli*, *Listeria* spp., *Campylobacter* spp., entre otras (FDA, 2020). Esto genera un desafío para la salud pública y puede afectar con mayor gravedad a los grupos etarios más vulnerables como niños, adultos mayores y personas inmunocomprometidas (Mungai, Barton, y Gould, 2015). Para poder consumir de forma segura este alimento de alto valor nutricional, se han diseñado diversos protocolos térmicos. Entre ellos podemos destacar la pasteurización. Este procedimiento consiste en exponer el producto a una temperatura de 72°C por 15 segundos, con el propósito de eliminar cualquier tipo de microorganismo (Ding et al., 2023). Adicionalmente, el tratamiento por Ultra Alta Temperatura (UHT, por sus siglas en inglés), somete la leche a temperaturas de 135-150 °C por un periodo de tiempo menor a 10 segundos. El proceso, entrega un producto libre de patógenos, el cual, al ser envasado en recipientes estériles, posee una vida útil de aproximadamente 12 meses (Poulsen, 2021).

A pesar de la alta eficacia del tratamiento UHT, se han reportado casos de bacterias capaces de soportar este procedimiento (Andrewes, 2018). Dentro de los microorganismos contaminantes resistentes se encuentran las bacterias psicrófilas. Los microorganismos psicrófilos se desarrollan de forma óptima en un rango de temperatura entre 15-30°C (Yuan et al., 2019). Estas bacterias también son capaces de reproducirse a una temperatura de 5-7 °C, (Olmos, 2014). Por ende, el almacenamiento de leche en tanques a bajas temperaturas previamente a su procesamiento promueve la proliferación de estos microorganismos. Existen distintos géneros de bacterias psicrófilas, entre ellos se encuentran: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, y otros (Wang et al., 2018). Este grupo de bacterias puede ser responsable de la degradación de los distintos compuestos en la leche. Debido a que durante su metabolismo se sintetizan enzimas deterioradoras, alterando la calidad y vida útil del producto (Tirpanci et al., 2023). Estas enzimas degradan las proteínas, lípidos y fosfolípidos presentes. Además, son capaces de mantener su actividad después de ser procesadas a altas temperaturas (Yuan et al., 2018)

Dentro de las posibles fuentes de contaminación de la leche bovina cruda se pueden destacar varios factores. Entre ellos se incluye un mal manejo en las granjas, la presencia de mastitis, el estado del equipo de extracción, los recursos hídricos, el equipo de almacenamiento y las condiciones de transporte, entre otros (Calahorrano et al., 2022). Asimismo, las bacterias psicrófilas son capaces de formar biopelículas a bajas temperaturas. Esto les permite reproducirse en distintos equipos como: silos de almacenamiento, tanques de transporte, tuberías, etc. Consecuentemente, esto puede llegar a la alteración del producto gracias a la producción de enzimas deterioradoras (Yuan et al., 2020). Además, puede ocurrir una Contaminación Post-Pasteurización (PPC, por sus siglas en inglés). Algunas de las posibles causas de este tipo de contaminación son: equipos con una limpieza deficiente, aerosoles contaminados y contaminación cruzada generada por operarios.

Si bien los tratamientos térmicos son efectivos para la eliminación de microorganismos, existen enzimas capaces de tolerarlos. Esto puede ser especialmente perjudicial para aquellos productos con una vida útil de larga duración como la leche UHT (Von Neubeck et al., 2015).

El deterioro y disminución en la calidad de los productos lácteos son causados principalmente por las enzimas lipasas y proteasas. Como resultado, las lipasas hidrolizan la grasa, generando un sabor rancio. A su vez, las proteasas hidrolizan la caseína, provocando sabores desagradables y cambios en la textura del producto (Yuan et al., 2019). En particular., las bacterias psicrotróficas y sus enzimas termoestables forman parte de los mayores puntos de interés en la industria láctea (Qin et al., 2023).

En Ecuador, la producción de lácteos genera alrededor de 1,400 millones de dólares anuales (Centro de Industria Láctea del Ecuador, 2023). En consecuencia, se han establecido diversas regulaciones para garantizar que estos productos no tengan efectos negativos en la salud del consumidor ni en la economía del país. Los requisitos microbiológicos en Ecuador están detallados en la normativa NTE INEN 2335, que establece un control de esterilidad comercial, mediante el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Para esto se someten las muestras a diferentes temperaturas durante períodos de tiempo establecidos. Si se observa un crecimiento mayor 10 UFC/cm^3 establecido la muestra se considera no apta. Si el recuento de las placas es menor a este límite, se repite el mismo procedimiento con la segunda muestra. Si el resultado cumple con los requisitos la muestra se considera comercialmente estéril (NTE INEN 2335, 2003). Adicionalmente, existe una normativa para la enumeración de microorganismos psicrotrofos (NTE INEN-ISO 6730). Sin embargo, esta normativa presenta limitaciones, ya que su aplicación es opcional y no considera la producción de enzimas degradadoras. Es así que, esta investigación busca aislar e identificar bacterias psicrotróficas en leche cruda, pasteurizada y UHT, complementando las deficiencias metodológicas de la normativa actual, proporcionando información relevante para futuras investigaciones sobre bacterias psicrotróficas y enzimas deterioradoras.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Detectar la presencia de bacterias psicrotróficas y enzimas deterioradoras en leche cruda, pasteurizada y UHT.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Aislar bacterias psicrotróficas a partir de muestras de leche cruda, pasteurizada y UHT.
- b) Caracterizar fenotípicamente bacterias psicrotróficas a partir de muestras de leche cruda, pasteurizada y UHT.
- c) Identificar, por medio de secuenciación del gen 16S ARNr, la especie de las bacterias psicrotróficas aisladas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo a nivel de laboratorio en el Laboratorio de Aguas y Alimentos de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE), DISERLAB.

4.1 MUESTREO Y ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA

A partir de dos procedimientos de muestreo realizados en un periodo de tiempo de 90 días, se obtuvieron un total de 30 muestras: 5 muestras de leche cruda, 5 de leche pasteurizada y 20 de leche UHT.

Considerando el mantenimiento de la cadena de frío, se transportaron las muestras de leche cruda y pasteurizada al Laboratorio de Aguas y Alimentos de la PUCE, DISERLAB, con el fin de evitar la proliferación de microorganismos previo a su procesamiento. que pudieran modificar los análisis.

Las muestras de leche cruda, pasteurizada y UHT fueron procesadas después de ser ingresadas en el laboratorio. De esta manera, se evitó un aumento en el número de microorganismos.

4.2 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. A continuación, 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.

4.3 AISLAMIENTO DE BACTERIAS PSICOTRÓFICAS

Se realizaron diluciones en agua peptonada al 0.1% hasta obtener la dilución 10^{-3} a partir de cada muestra. Posteriormente fueron sembradas en Agar Plate Count y se incubaron durante un periodo de 10 días a una temperatura de 7 °C.

4.4 PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE BACTERIAS PSICOTRÓFICAS AISLADAS

A partir de las colonias obtenidas se realizó una caracterización macroscópica y microscópica. Para la descripción microscópica se realizaron tinciones Gram. Mientras que en la descripción macroscópica se describió la morfología colonial (forma, tamaño, color, bordes y elevación) de cada colonia. Cada uno de los morfotipos coloniales obtenidos fueron purificados en agar Plate Count. Se verificó su pureza mediante pruebas de tinción Gram.

Posteriormente, 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.

4.5 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS PSICROTRÓFICAS AISLADAS BACTERIANOS

El material genético de las cepas fue extraído mediante el uso del kit Wizard de purificación de ADN genómico (Promega, MD, E.E.U.U), siguiendo los pasos descritos por el fabricante. Posteriormente, se realizó una PCR de Elementos Repetitivos Palindrómicos, más conocida como REP-PCR.

Cada reacción de REP-PCR se realizó teniendo un volumen final de 25 μ l incluyendo: 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, para finalizar, 1 μ l del ADN de cada cepa. Los ciclos establecidos para la técnica de REP-PCR dentro del equipo 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).

A partir de los productos de la REP-PCR, se efectuó una electroforesis en gel de agarosa al 2% (en tampón TAE 1X), al cual, por cada 100 ml de gel, se añadió 2 μ l de Tinte de gel de ADN SYBR™ Safe Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific, MA, E.E.U.U). La electroforesis se llevó a cabo con una potencia de 160 voltios durante 260 minutos. Sumado a esto, se añadió una escalera de peso molecular, compuesta por 4 μ l de esta y 2 μ l del buffer de carga. La escalera molecular utilizada TrackIt™ 1Kb Plus DNA Ladder de 10 Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific, MA, E.E.U.U), cuenta con un intervalo de tamaños que abarcan desde los 100 hasta los 15,000 pb, poseyendo una banda de referencia a los 1,500 pb.

Es importante reiterar 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. Mientras que, para el control negativo, se usó agua destilada. Para observar los resultados de la electroforesis se utilizó un fotodocumentador, por transiluminación 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) considerando 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 mediante el procedimiento descrito anteriormente se agruparon según 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 los agrupamientos de perfiles de bandas con una similitud de 100%, se seleccionaron aislamientos representativos para amplificar, mediante PCR, el gen 16s del ARNr para su posterior identificación.

Para llevar a cabo esto, se utilizaron los siguientes cebadores: 16S-27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3') y 16S-1540R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACT-3'). Además, la mezcla de reacción se compuso por 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 se llevó a cabo en base al 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).

Aquellas 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.

5. RESULTADOS

Dentro de los resultados obtenidos a partir de la caracterización molecular mediante REP-PCR, de las cepas aisladas, se obtuvieron perfiles de bandas en gel de agarosa. Estos perfiles fueron analizados mediante la herramienta PyElph. En el dendrograma correspondiente al primer muestreo (Figura 1), se obtuvieron 9 grupos, donde 2 de ellos presentaron un 100% de similitud, ambos cuentan con cepas aisladas provenientes de muestras de leche cruda. De igual manera, en el dendrograma correspondiente al segundo muestreo (Figura 2), se observó un grupo con 100% de similitud. En este caso las cepas correspondían a muestras de producto crudo. Se identificó un total de 18 grupos.

La secuenciación y posterior alineamiento, en las bases de datos, de secuencias correspondientes al gen 16S ARNr, de aquellos aislamientos representativos de cada grupo de perfiles de REP-PCR. Como resultado, se logró una identificación a nivel de especie, como se muestra en las Tablas 1 y 2. A partir del primer muestreo se identificaron distintas especies del género *Pseudomonas*. Por otra parte, a partir del segundo muestreo, se aislaron especies de *Pseudomonas* spp., *Pantoea* spp., *Flavobacterium* spp. y *Janthinobacterium* spp.

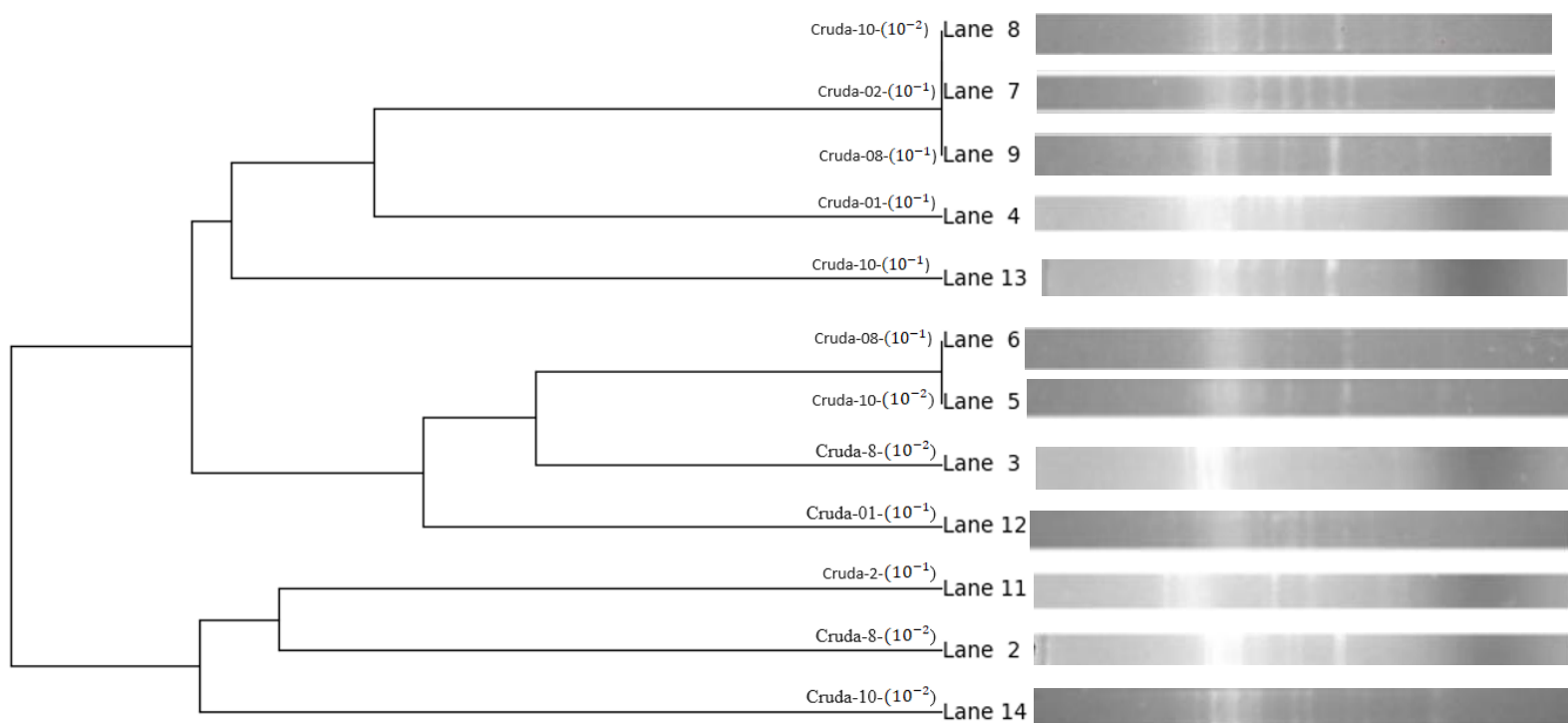


Figura 1. Dendrograma generado con los perfiles de bandas obtenidos de la REP-PCR de las cepas aisladas en el primer muestreo.

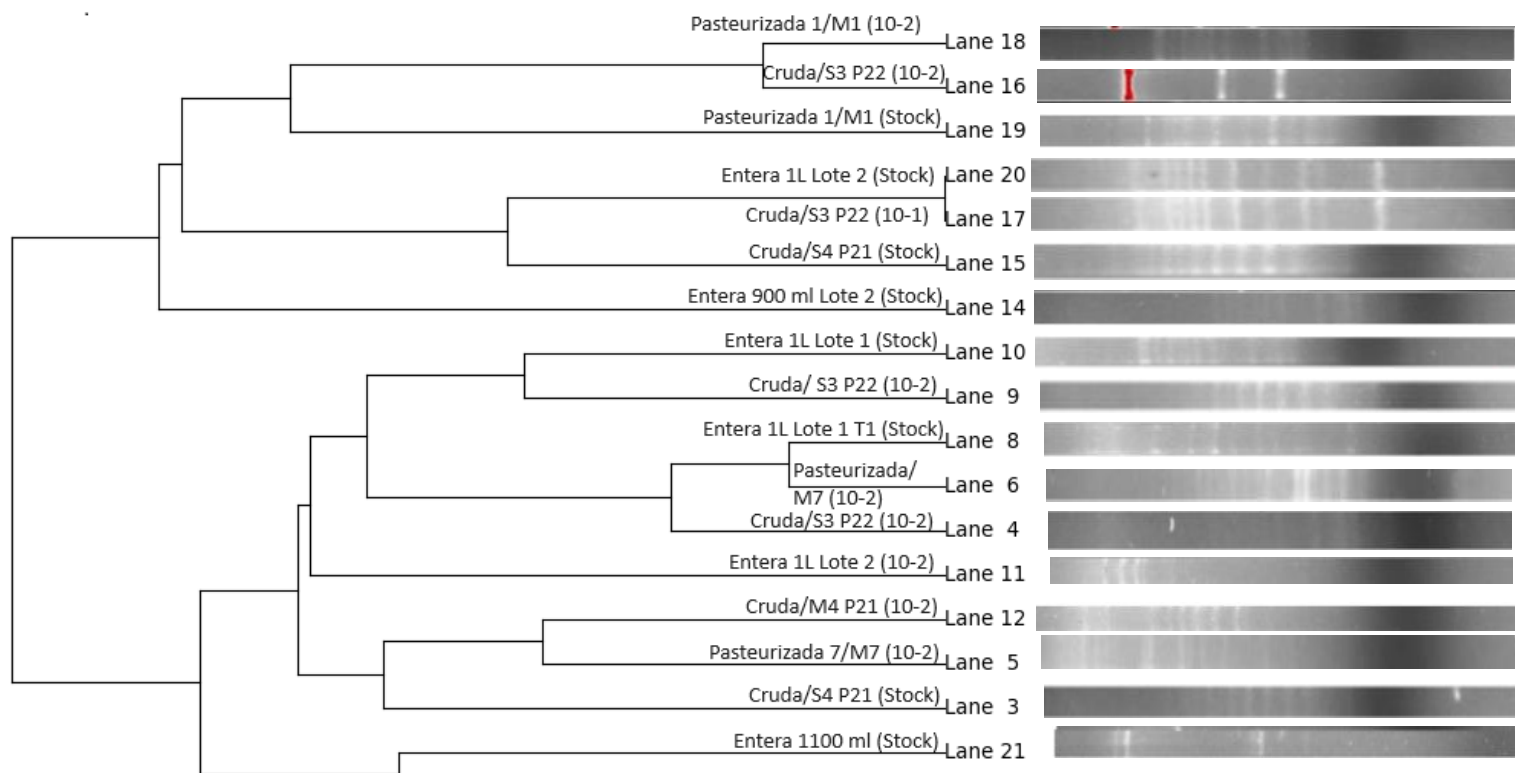


Figura 2. Dendrograma generado con los perfiles de bandas obtenidos de la REP-PCR de las cepas aisladas en el segundo muestreo.

Tabla 2. Especies bacterianas identificadas del primer muestreo

Muestra	Bacteria	Número de acceso a NCBI	Número de acceso a EZbioCloud	Descripción fenotípica
Cruda-10- (10 ⁻²)	<i>Pseudomonas fragi</i>	PP725233.1	LT629783	Bacilos Gram negativos, agrupados en parejas

Cruda-10 - (10 ⁻¹)	<i>Pseudomonas fragi</i>	KT767874.1	-----	Bacilos Gram negativos, agrupados en parejas
Cruda-01- (10 ⁻¹)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	MT496945.1	-----	Bacilos Gram negativos, agrupados en parejas
Cruda-02- (10 ⁻¹)	<i>Pseudomonas fragi</i>	KY940312.1	LT629783	Bacilos Gram negativos cortos, agrupados en parejas
Cruda-01- (10 ⁻¹)	<i>Pseudomonas lurida</i>	MG269648.1	-----	Bacilos Gram negativos, agrupados en parejas
Cruda-02- (10 ⁻¹)	<i>Pseudomonas fragi</i>	MN062088.1	-----	Bacilos Gram negativos cortos, agrupados en parejas
Cruda-2- (10 ⁻¹)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	HF913576.1	-----	Bacilos Gram negativos, agrupados en parejas
Cruda-08- (10 ⁻¹)	<i>Pseudomonas fragi</i>	MN062088.1	-----	Bacilos Gram negativos cortos, agrupados en parejas
Cruda-01- (10 ⁻¹)	<i>Pseudomonas brenneri</i>	CP052858.1	AF268968	Bacilos Gram negativos, agrupados en parejas
Cruda-10- (10 ⁻²)	<i>Pseudomonas fragi</i>	MH463554.1	-----	Bacilos Gram negativos cortos, agrupados en parejas

Cruda-08- (10 ⁻²)	<i>Pseudomonas fragi</i>	MG972900.1	-----	Bacilos Gram negativos cortos, agrupados en parejas
Cruda-02- (10 ⁻¹)	<i>Pseudomonas lactis</i>	KP756926.1	JYLO01000038	Bacilos Gram negativos, agrupados en parejas
Cruda-08- (10 ⁻¹)	<i>Pseudomonas fragi</i>	KT767874.1	LT629783	Bacilos Gram negativos cortos, agrupados en parejas
Identificación a nivel de especie de cepas aisladas en el primer muestreo con una similitud del gen 16S ARNr superior al 98% en comparación con los números de acceso de EzBiocloud y Gene Bank mencionados anteriormente.				

Tabla 2. Especies bacterianas identificadas del segundo muestreo

Muestra	Bacteria	Número de acceso a NCBI	Número de acceso a EZbioCloud	Descripción fenotípica
Cruda/S4-P21	<i>Janthinobacterium lividum</i>	NR_164625.1	Y08846	Bacilos Gram negativos cortos, agrupados en parejas
Cruda/S3-P22-10 ⁻²	<i>Flavobacterium plurextorum</i>	MN758819.1	MN758819.1	Bacilos Gram negativos
Entera-1L-Lote 2- (10 ⁻²)	<i>Pantoea conspicua</i>	MF083088.1	MLFN01000105	Bacilos Gram negativos
Entera-1100ml-Stock	<i>Pseudomonas lactis</i>	MN629076.1	JYLO01000038	Bacilos Gram negativos, agrupados en parejas
Entera-1L-T1-Stock	<i>Pseudomonas fragi</i>	MG972899.1	LT629783	Bacilos Gram negativos cortos, agrupados en parejas
Identificación a nivel de especie de cepas aisladas en el segundo muestreo con una similitud del gen 16S ARNr superior al 98% en comparación con los números de acceso de EzBiocloud y Gene Bank mencionados anteriormente.				

6. DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio era aislar e identificar las diferentes especies de bacterias psicrotóficas presentes en muestras de leche durante las distintas fases de procesamiento. Como resultado, se demostró la presencia de bacterias psicrotóficas en muestras de leche cruda, pasteurizada y UHT. Dentro de las especies más representativas identificadas a partir de los distintos aislamientos se encuentran *P. fragi*, *P. fluorescens*, *P. brenneri*, *P. lactis*. Estas especies han sido descritas previamente como responsables de la alteración de productos lácteos (Kováčová, et al., 2024). Esto puede deberse a que *Pseudomonas* spp. ha sido descrito como la bacteria psicrotófica encontrada con mayor frecuencia en leche y productos lácteos (Saha et al., 2024).

El aislamiento recurrente de *Pseudomonas* spp. en muestras de leche cruda puede deberse a diversos factores que favorecen a su desarrollo. En la investigación realizada por Khasapane et al., (2023), se determinó que, a pesar de no presentarse síntomas, la mastitis subclínica causada por *Pseudomonas* spp. llega a alterar la calidad microbiológica de la muestra. Otro de los factores a mencionar es su capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales, pudiendo ser encontrado en diferentes matrices como suelo, agua, alimentos y tejidos animales. De igual manera, posee sistemas de captación de hierro basados en sideróforos, permitiéndoles restringir la disponibilidad de hierro para otros microorganismos (Rossi et al., 2016). Este género bacteriano forma parte de la microbiota propia de la leche cruda, pudiendo llegar a conformar hasta un 90% de la misma (Decimo et al., 2014). Además, en distintas investigaciones, se menciona cómo *Pseudomonas* spp. obtiene una ventaja selectiva al ser almacenada por períodos prolongados a bajas temperaturas. Esto sucede tanto a una temperatura óptima como subóptima de refrigeración. En consecuencia, pueden alcanzar un crecimiento mayor en comparación a los géneros: *Aeromonas*, *Listeria*, *Staphylococcus* y *Enterococcus* (De Jonghe et al., 2011).

El aislamiento de *Pseudomonas* spp., a partir de muestras de leche cruda, puede ocurrir debido a diversas fuentes de contaminación relacionadas con el empleo de diferentes equipos utilizados para la extracción de leche. Existen casos de aislamientos del género *Pseudomonas* spp. a partir de equipos de ordeño (Rosado et al., 2021). Esto puede sugerir la existencia de una

falla en los procedimientos higiénicos. En adición, el propio diseño del equipo de extracción puede favorecer la contaminación si presenta grietas, uniones, partes inoperativas y accesorios. Asimismo, el equipo de transporte y las superficies de almacenamiento pueden actuar como fuentes significativas de contaminación por *Pseudomonas* spp. (Saha et al., 2024).

Martin et al., (2016) señala que *Pseudomonas* spp. es causante del 70% de casos de deterioro de leche por Contaminación Post-Pasteurización (PPC por sus siglas en inglés). Además, otros autores señalan que una carga microbiana elevada en la leche cruda puede conllevar a la presencia de bacterias en el producto terminado (Martin et al., 2018). De la misma forma, se ha detectado la presencia de *Pseudomonas* spp., en las boquillas de llenado, en el agua de desecho de las máquinas de llenado, en el aire que rodea el equipo de llenado, en tuberías por donde pasa el producto terminado, y en leche pasteurizada envasada (Cherif-Antar et al., 2016; Martin et al., 2018). Sumado a esto, el proceso de llenado no suele realizarse de forma aséptica (Rauh & Xiao, 2022). Esto coincide con los resultados obtenidos al lograr aislar especies de *Pseudomonas* spp., a partir de leche pasteurizada envasada.

Las bacterias psicrótroficas del género *Pseudomonas* spp. también se aislaron a partir de muestras de leche UHT. Esto podría deberse a la habilidad de este género bacteriano para producir exopolisacáridos, que promueven la formación de biopelículas (Panebianco et al., 2022). Estas disminuyen o inutilizan los efectos de agentes biocidas utilizados durante los procesos de saneamiento. Sumado a esto, *Pseudomonas* spp. puede producir biopelículas en conjunto con múltiples microorganismos (Zarei et al., 2022). Las plantas de procesamiento de lácteos pueden ser consideradas como ambientes ideales para la formación de biopelículas microbianas, puesto que poseen nutrientes y humedad. En estudios anteriores, se observó la presencia de biopelículas en tanques de almacenamiento sugiriendo la posibilidad de contaminación previa al procesamiento del producto (Weber et al., 2019). Por lo tanto, estas biopelículas pueden ser fuentes continuas de contaminación, lo que puede afectar la vida útil y la inocuidad del producto. Existen estudios que describen el hallazgo de biopelículas formadas por *Pseudomonas fluorescens* tanto en distintas etapas del procesamiento de lácteos, como en distintas superficies de equipos (Tirpanci et al., 2023). Por lo tanto, como se registra en el estudio de Panebianco (2022) la presencia de bacterias psicrótroficas en leche UHT puede suceder gracias al desprendimiento de biopelículas. Adicionalmente, Yasufuku et al. (2013)

mencionan que la leche procesada por UHT puede llegar a contaminarse por efecto de la entrada de aire contaminado en tanques de almacenamiento.

Entre las especies aisladas más representativas se encuentra *Pseudomonas fluorescens*. Esta bacteria fue aislada a partir de muestras de leche cruda. Esto puede ser explicado al tomar en consideración investigaciones donde se la describe como una de las bacterias psicrófilas que forma parte de la flora bacteriana de leche cruda (YASUFUKU et al., 2013). Además, en otras investigaciones se menciona su capacidad para producir biopelículas en placas de poliestireno y superficies metálicas a bajas temperaturas (Rossi et al., 2016; Zarei et al., 2020). Martin et al., (2018) describe a *P. fluorescens* como la especie más común encontrada en leche pasteurizada, junto con *P. lundensis*, *P. fragi* y *P. putida*. Como resultado, se producen contaminaciones Post-Pasteurización repetitivas llegando a afectar la vida útil del producto.

Como se mencionó anteriormente varias investigaciones señalan a *P. fluorescens* como la especie aislada con mayor frecuencia a partir de muestras de leche cruda (Bellassi et al., 2021; Martin et al., 2018; Nascimento et al., 2022; Tayyarcán & Boyacı, 2023; YASUFUKU et al., 2013). Sin embargo, los resultados de esta investigación mostraron a *Pseudomonas fragi* como la bacteria psicrófila predominante. Esto coincide con otras investigaciones donde mencionan a *P. fragi* como la especie prevalente (Marchand et al., 2009). Adicionalmente, ha sido descrita como una bacteria deterioradora dominante en muestras de leche, pescado, carne fresca y productos tratados por Ultra Alta Temperatura (Bahmid et al., 2024). Stanborough et al., (2018b) . Marchand et al., (2017) resalta la producción de enzimas termoestables por parte de *P. fragi* y *P. lundensis*. En consecuencia, la presencia en grandes cantidades de cepas de *P. fragi* antes del procesamiento UHT hará que la vida útil de los productos lácteos sea vea comprometida.

Por otra parte, *Pseudomonas lurida* fue identificada en una sola ocasión. Esta bacteria fue aislada a partir de una muestra de leche cruda. Esto coincide con la literatura, donde se menciona la presencia de *P. lurida* en muestras de leche cruda bovina y leche de cabra (Du et al., 2022a; Júnior et al., 2018). No obstante, Zhang et al., (2023) describe a *P. lurida* como una bacteria fitopatógena capaz de crecer a bajas temperaturas y sintetizar enzimas deterioradoras de productos lácteos.

Pseudomonas lactis fue encontrada dentro de muestras de leche cruda y UHT. A pesar de que no es considerada como una especie que se encuentre de forma recurrente en muestras de leche, existen investigaciones donde se describe su aislamiento a partir de muestras de leche cruda en China (Du et al., 2022b). A su vez, Sterniša et al., (2019) menciona la capacidad de *P. lactis* para producir enzimas proteolíticas y lipolíticas a una temperatura de 5°C. Cabe resaltar que dentro de las enzimas producidas por esta especie se encuentra la proteasa termoestable Aprx (Hille et al., 2023). Esta enzima es capaz de mantener su actividad inclusive tras ser sometida a distintos procedimientos térmicos, como resultado, *P. lactis* posee un potencial de deterioro significativo.

Adicionalmente, *Pseudomonas brenneri* fue aislada a partir de muestras de leche cruda. A pesar de que las investigaciones acerca de su impacto en productos lácteos son relativamente escasas a comparación de otras especies, existen autores que describen su presencia en muestras de leche cruda y su capacidad para sintetizar enzimas deterioradoras (Machado et al., 2017). Asimismo, se ha descrito su capacidad para formar biopelículas a bajas temperaturas en períodos menores a 48 horas (Rossi et al., 2018), pudiendo así explicar la presencia de esta bacteria en muestras de leche no pasteurizada. Por último, los resultados obtenidos coinciden con los de Gamal et al., (2022), quienes aislaron *P. brenneri* con una menor frecuencia a comparación de otras especies del mismo género.

Dentro de las bacterias aisladas a partir de muestras de leche cruda en el segundo muestreo tenemos a *Janthinobacterium lividum*. Esta bacteria se caracteriza por ser capaz de sobrevivir en ambientes bastante variados. (Weiblen, s. f.), menciona como *J. lividium* puede encontrarse en tanques de lastre de barcos carguero, nieve de montañas o inclusive en los glaciares de la antártica. La bibliografía acerca de esta bacteria en productos lácteos es bastante limitada, sin embargo, se ha descrito su presencia en muestras de leche cruda (Eneroth et al., 2000).

Finalmente, otra bacteria que llama la atención es *Pantoea conspicua*, la cual fue aislada de leche UHT. La investigación realizada por Beatrice et al., (2018) describe la presencia de esta bacteria en quesos, mencionando esto como un hallazgo sin precedentes. Su presencia en leche UHT puede ser explicada mediante un posible caso de contaminación cruzada por parte

de los operarios. Debido a que esta bacteria es aislada normalmente a partir de muestras clínicas y ambientes como suelos, agua o plantas (Walterson & Stavrinides, 2015).

7. CONCLUSIONES

1. La metodología empleada permitió el aislamiento e identificación de bacterias psicrotróficas a partir de leche bovina cruda, pasteurizada y UHT. Igualmente, el uso de técnicas moleculares hizo posible la identificación a nivel de especie de cada aislamiento.
2. El aislamiento de *Pseudomonas* spp. a partir de muestras de leche cruda indica la existencia de una contaminación previa al tratamiento térmico de la muestra. Esta contaminación puede ser causada por diversos factores como casos de mastitis, falencias en procesos de desinfección o temperaturas de almacenamiento subóptimas.
3. El aislamiento de bacterias psicrotróficas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium* y *Pantoea* a partir de leche UHT indica un fallo en la cadena de producción.
4. La normativa nacional puede mejorarse al implementar pruebas adicionales con la metodología descrita. Logrando un análisis más robusto que llegué a obtener datos cualitativos y cuantitativos, mejorando así la calidad microbiológica del producto.
5. Las especies de *Pseudomonas* spp. aisladas han sido descritas como contaminantes recurrentes con una alta capacidad de adaptación y distintas fuentes de contaminación. Por ello, se recomienda profundizar mediante futuras investigaciones el posible origen de la contaminación. Además, de analizar la capacidad de formación de biopelículas y la síntesis de enzimas deterioradoras en condiciones industriales para diseñar protocolos de prevención y desinfección.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akkerman, M., Johansen, L. B., Rauh, V., Sørensen, J., Larsen, L. B., & Poulsen, N. A. (2021). Relationship between casein micelle size, protein composition and stability of UHT milk. *International Dairy Journal*, 112, 104856.
- Andrewes, P. (2018). Indirect detection of lipase in UHT milk by measuring methyl ester formation. *International Dairy Journal*, 79, 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.11.012>.
- Bahmid, N. A., van Iersel, N., & Dekker, M. (2024). Antibacterial Effects of Headspace Benzyl Isothiocyanates on *Pseudomonas fragi* in A Packaging System. *AIP Conference Proceedings*, 2957(1). <https://doi.org/10.1063/5.0184119>
- Beatrice, T., Francesca, P., Barbara, T., Filippo, F., & Roberta, N. (2018). Qualitative and quantitative evaluation of biogenic amines in vitro production by bacteria isolated from ewes' milk cheeses. *European Food Research and Technology*, 244(4), 721–728. <https://doi.org/10.1007/S00217-017-2992-1/METRICS>
- Bellassi, P., Rocchetti, G., Morelli, L., Senizza, B., Lucini, L., & Cappa, F. (2021). A milk foodomics investigation into the effect of *pseudomonas fluorescens* growth under cold chain conditions. *Foods*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/foods10061173>
- 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. Tesis de grado no publicada, Universidad de la República de Uruguay, Montevideo.
- Capodifoglio, E., Vidal, A. M. C., Lima, J. A. S., Bortoletto, F., D'Abreu, L. F., Gonçalves, A. C. S., ... y Netto, A. S. (2016). Lipolytic and proteolytic activity of *Pseudomonas* spp. isolated during milking and storage of refrigerated raw milk. *Journal of dairy science*, 99(7), 5214-5223. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10453>.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2022). Cow's Milk and Milk Alternatives. Obtenido de CDC: <https://www.cdc.gov/nutrition/infantandtoddlernutrition/foods-and-drinks/cows-milk-and-milk-alternatives.html>.
- Centro de Industria Láctea del Ecuador. (2023). En Ecuador, cerca del 46% de la producción de leche diaria se usa en la industria formal. Obtenido de Centro de Industria Láctea del

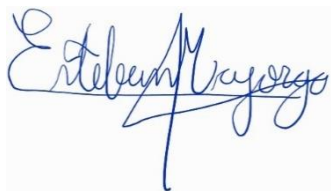
Ecuador: <https://www.cil-ecuador.org/post/en-ecuador-cerca-del-46-de-la-producci%C3%B3n-de-leche-diaria-se-usa-en-la-industria-formal>.

- Cherif-Antar, A., Moussa–Boudjemâa, B., Didouh, N., Medjahdi, K., Mayo, B., & Flórez, A. B. (2016). Diversity and biofilm-forming capability of bacteria recovered from stainless steel pipes of a milk-processing dairy plant. *Dairy Science and Technology*, 96(1), 27-38. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0235-4>
- Ding, H., Han, Z., Wang, B., Wang, Y., Ran, Y., Zhang, L., Li, Y., Lu, C., Lu, X., & Ma, L. (2023). Effect of Direct Steam Injection and Instantaneous Ultra-High-Temperature (DSI-IUHT) Sterilization on the Physicochemical Quality and Volatile Flavor Components of Milk. *Molecules*, 28(8). <https://doi.org/10.3390/molecules28083543>
- Du, B., Meng, L., Liu, H., Zheng, N., Zhang, Y., Zhao, S., Li, M., & Wang, J. (2022). Diversity and proteolytic activity of *Pseudomonas* species isolated from raw cow milk samples across China. *Science of the Total Environment*, 838. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156382>
- Eneroth, Å., Ahrné, S., & Molin, G. (2000). Contamination routes of Gram-negative spoilage bacteria in the production of pasteurised milk, evaluated by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *International Dairy Journal*, 10(5–6), 325–331. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(00\)00055-8](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00055-8)
- Gamal, H., El-Diasty, M., Dapgh, A., El-Sherbini, M., El-Baz, A., & Abdelkhalek, A. (2022). Virulence Genes of Multi-drug Resistance *Pseudomonas* species Isolated from Milk and Some Dairy Products. *Journal of Advanced Veterinary Research*, 12(4), 415-421.
- Hille, F., Gieschler, S., Brinks, E., & Franz, C. M. A. P. (2023). Characterisation of the Novel Filamentous Phage PMBT54 Infecting the Milk Spoilage Bacteria *Pseudomonas carnis* and *Pseudomonas lactis*. *Viruses*, 15(9). <https://doi.org/10.3390/v15091781>
- Khasapane, N. G., Khumalo, Z. T. H., Kwenda, S., Nkhebenyane, S. J., & Thekiso, O. (2023). Characterisation of Milk Microbiota from Subclinical Mastitis and Apparently Healthy Dairy Cattle in Free State Province, South Africa. *Veterinary Sciences*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/vetsci10100616>
- Machado, S. G., Baglinière, F., Marchand, S., Coillie, E. Van, Vanetti, M. C. D., Block, J. De, & Heyndrickx, M. (2017). The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR), 228133. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00302/BIBTEX>

- Marchand, S., Duquenne, B., Heyndrickx, M., Coudijzer, K., & Block, J. De. (2017). Destabilization and off-flavors generated by pseudomonas proteases during or after uht-processing of milk. *International Journal of Food Contamination*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s40550-016-0047-1>
- Marchand, S., Heylen, K., Messens, W., Coudijzer, K., De Vos, P., Dewettinck, K., Herman, L., De Block, J., & Heyndrickx, M. (2009). Seasonal influence on heat-resistant proteolytic capacity of *Pseudomonas lundensis* and *Pseudomonas fragi*, predominant milk spoilers isolated from Belgian raw milk samples. *Environmental Microbiology*, 11(2), 467-482. <https://doi.org/10.1111/J.1462-2920.2008.01785.X>
- Martin, N. H., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2018). Symposium review: Effect of post-pasteurization contamination on fluid milk quality. *Journal of Dairy Science*, 101(1), 861-870. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13339>
- Martin, N. H., Trmcic, A., Hsieh, T. H., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2016). The evolving role of coliforms as indicators of unhygienic processing conditions in dairy foods. *En Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Número SEP). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01549>
- Matéos, A., Guyard-Nicodème, M., Baglinière, F., Jardin, J., Gaucheron, F., Dary, A., Humbert, G., & Gaillard, J. L. (2015). Proteolysis of milk proteins by AprX, an extracellular protease identified in *Pseudomonas* LBSA1 isolated from bulk raw milk, and implications for the stability of UHT milk. *International Dairy Journal*, 49, 78-88. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2015.04.008>
- Mungai, E., Barton Behravesh, C., & Gould, L. (2015). Increased Outbreaks Associated with Nonpasteurized Milk, United States, 2007–2012. *Obtenido de Centers for Disease Control and Prevention*: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/1/14-0447_article
- Nascimento, E. C. do, Sabino, M. C., Corguinha, L. da R., Targino, B. N., Lange, C. C., Pinto, C. L. de O., Pinto, P. de F., Vidigal, P. M. P., Sant'Ana, A. S., & Hungaro, H. M. (2022). Lytic bacteriophages UFJF_PfDIW6 and UFJF_PfSW6 prevent *Pseudomonas fluorescens* growth in vitro and the proteolytic-caused spoilage of raw milk during chilled storage. *Food Microbiology*, 101. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103892>
- Panebianco, F., Rubiola, S., Chiesa, F., Civera, T., & Di Ciccio, P. A. (2022). Effect of gaseous ozone treatment on biofilm of dairy-isolated *Pseudomonas* spp. strains. *Italian Journal of Food Safety*, 11(2). <https://doi.org/10.4081/ijfs.2022.10350>

- Qin, X., Cheng, J., Qi, X., Guan, N., Chen, Q., Pei, X., Jiang, Y., Yang, X., & Man, C. (2023). Effect of Thermostable Enzymes Produced by Psychrotrophic Bacteria in Raw Milk on the Quality of Ultra-High Temperature Sterilized Milk. *Foods*, 12(20). <https://doi.org/10.3390/foods12203752>
- Rauh, V., & Xiao, Y. (2022). The shelf life of heat-treated dairy products. *International Dairy Journal*, 125, 105235. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2021.105235>
- Rossi, C., Chaves-López, C., Serio, A., Goffredo, E., Goga, B. C., & Paparella, A. (2016). Influence of incubation conditions on biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* isolated from dairy products and dairy manufacturing plants. *Italian Journal of Food Safety*, 5(3). <https://doi.org/10.4081/ijfs.2016.5793>
- Rossi, C., Serio, A., Chaves-López, C., Anniballi, F., Auricchio, B., Goffredo, E., Cenci-Goga, B. T., Lista, F., Fillo, S., & Paparella, A. (2018). Biofilm formation, pigment production and motility in *Pseudomonas* spp. isolated from the dairy industry. *Food Control*, 86, 241-248. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2017.11.018>
- Stanborough, T., Fegan, N., Powell, S. M., Singh, T., Tamplin, M., & Chandry, P. S. (2018a). Genomic and metabolic characterization of spoilage-associated *Pseudomonas* species. *International Journal of Food Microbiology*, 268, 61-72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.01.005>
- Sterniša, M., Čargo, M., & Možina, S. S. (2019). Spoilage bacteria *Pseudomonas* - Production of hydrolytic enzymes and ability to grow at 5 °C. *Acta Periodica Technologica*, 50, 278-285. <https://doi.org/10.2298/APT1950278S>
- Tayyarcan, E. K., & Boyaci, I. H. (2023). Isolation, characterization, and application of bacteriophage cocktails for the biocontrol of *Pseudomonas fluorescens* group strains in whole and skimmed milk. *Brazilian Journal of Microbiology*, 54(4), 3061-3071. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-01164-2>
- Walterson, A. M., & Stavrinides, J. (2015). *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(6), 968–984. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUV027>
- Weiblen, C. (n.d.). Genetic Variation in *Janthinobacterium lividum*; An Examination of the Violacein Operon. http://scholar.colorado.edu/honr_theses
- YASUFUKU, K., NAKAMURA, H., OGASAWARA, J., YOKOTA, K., ABE, N., & HASE, A. (2013). Determination of the Cause in a Case of Bacterial Contamination of ESL-Pasteurized Milk, Produced at Milk Production Plant Obtained Approval of Comprehensive Sanitation Management and Production Process, and to Identify Issues of Hygiene Management by HACCP System. *Japanese Journal of Food Microbiology*, 30(2), 116-124. <https://doi.org/10.5803/jsfm.30.116>

- Yuan, L., Sadiq, F. A., Burmølle, M., Wang, N., & He, G. (2019). Insights into psychrotrophic bacteria in raw milk: A review. *Journal of Food Protection*, 82(7). <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-032>
- Zarei, M., Rahimi, S., Saris, P. E. J., & Yousefvand, A. (2022). *Pseudomonas fluorescens* group bacterial strains interact differently with pathogens during dual-species biofilm formation on stainless steel surfaces in milk. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1053239>
- Zarei, M., Yousefvand, A., Maktabi, S., Pourmahdi Borujeni, M., & Mohammadpour, H. (2020). Identification, phylogenetic characterisation and proteolytic activity quantification of high biofilm-forming *Pseudomonas fluorescens* group bacterial strains isolated from cold raw milk. *International Dairy Journal*, 109, 104787. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2020.104787>



Firma del estudiante

Esteban Mayorga Estrella

Quito, 12/07/2024



Firma del director de disertación

Dr. Martín Sebastián Marcial Coba

Quito, 12/07/2024

Firma de la coordinadora de carrera

Dra. Diana Astorga

Quito, 12/07/2024