

# Evolución y caracterización de esporas mesófilas y termófilas dentro de líneas de procesamiento de leche

CELANO, Laura (1,\*); TECHERA, Nora (1); INFANTE, María Inés (1), López-Pedemonte, Tomás (1).  
 (1) Unidad de Ciencia y Tecnología de Lácteos. Instituto Tecnológico Regional Suroeste. Universidad Tecnológica del Uruguay  
 (\*) Proyecto FMV 2020 financiado por ANII-UTEC

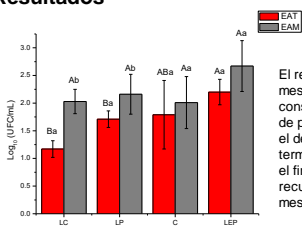
## Introducción

Los productos lácteos deshidratados son versátiles y permiten procesar grandes volúmenes de leche fluida. Las esporas son estructuras de resistencia bacteriana naturalmente presentes en leche cruda, que soportan altas temperaturas y deshidratación. Al germinar pueden liberar enzimas o toxinas produciendo interferencia en procesos y cambios en la percepción sensorial del producto, siendo causa de atención en el sector lácteo. Este trabajo busca identificar, determinar frecuencia y potencial de deterioro de microorganismos esporulados aerobios presentes en líneas de producción de leche en polvo entera (LPE).

## Materiales y métodos

Se realizaron cuatro muestreos trimestrales en 4 puntos del proceso de secado de leche: leche cruda, pasteurizada, evaporada y producto final. Las poblaciones de esporulados mesófilos y termófilos aerobios se obtuvieron a partir de incubación en PCA a 37 °C y 55 °C, respectivamente. Los aislamientos se identificaron por secuenciación (PCR 16S) y se determinó el perfil de cepas (RAPD-PCR). La presencia de actividades enzimáticas se evaluó cualitativamente en los siguientes medios diferenciales: lipolítica (PCA-tiburtina), lecitinasa (PCA-yema de huevo), proteolítica (PCA-leche) y β-galactosidasa (BHI/X-gal/ IPTG).

## Resultados



El recuento de esporas aerobias mesófilas (EAM) se mantuvo constante a lo largo de la línea de procesamiento, mientras que el de esporas aerobias termófilas (EAT) aumentó hacia el final del proceso alcanzando recuentos similares al de mesófilas (Fig.1).

Figura 1. Evolución de esporas mesófilas y termófilas durante el proceso. Las diferencias significativas (p<0.05) se expresan con letras mayúsculas para los diferentes puntos del proceso y con minúsculas dentro de cada punto.

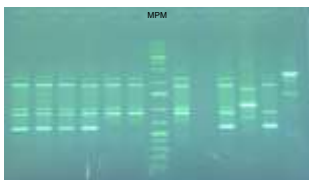
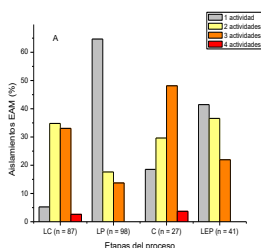
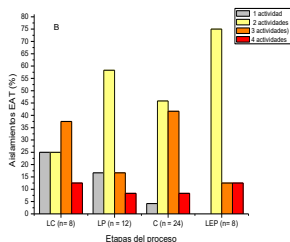


Figura 3. Ejemplo ilustrativo de perfiles de RAPD. Los perfiles se obtuvieron utilizando el primer OPR13 para la totalidad de la población de esporulados aislados.

Se obtuvieron 75 perfiles de OPR 13 (Fig.3) diferentes a partir de 190 aislamientos de muestreos de febrero y octubre/22 que se enviaron a secuenciar mediante 16S. Se identificaron 111 de 133 aislamientos mediante 16S correspondientes al resto de los muestreos, de los cuales 77 fueron identificados como *B.licheniformis*. El perfil de cepas de *B.licheniformis* mostró un amplio predominio de la cepa F2, (76% del total).



En el caso de esporas mesófilas se observó que en la etapa de evaporación del producto ocurrió una selección de cepas con capacidad de deterioro mayor, que presentan 2 y 3 actividades (Fig.2 A).



Por su parte para la población de esporas termófilas se observó un aumento a lo largo del proceso de aislamientos con 2 actividades enzimáticas, mientras que los aislamientos con 4 actividades permanecieron constantes durante el proceso (Fig.2B)

Figura 2. Presencia de actividades enzimáticas en esporulados mesófilos y termófilos. Se evaluaron las actividades proteolítica, lipolítica y β-galactosidasa en 259 aislamientos mesófilos y 58 termófilos mediante 1 utilización de medios de cultivo diferenciales.

Tabla 1. Frecuencia de especies por punto y por muestreo

FECHA	LECHE CRUDA		LECHE PASTEURIZADA		LECHE CONCENTRADA		PRODUCTO FINAL			
	TOTAL	ESPECIE	TOTAL	ESPECIE	TOTAL	ESPECIE	TOTAL	ESPECIE		
PRIMAVERA	3	<i>B. Pumilus</i>	33.3	<i>B. licheniformis</i>	42.9	<i>B. licheniformis</i>	63.6	14	<i>B. licheniformis</i>	
		<i>B. safensis</i>	33.3	<i>B. pumilus</i>	28.6	<i>B. aerius</i>	9.1		<i>B. subtilis</i>	
		ND	33.3	<i>L. fusiformis</i>	14.3	<i>B. safensis</i>	6.8		<i>Nalria circulans</i>	
				ND	14.3	<i>B. pumilus</i>	2.3		<i>B. tequilensis</i>	
OTOÑO	24	<i>B. Licheniformis</i>	41.7	<i>B. licheniformis</i>	53.6	8	<i>B. licheniformis</i>	37.5	7	<i>B. licheniformis</i>
		<i>B. Pumilus</i>	8.3	<i>B. velerzensis</i>	3.5		<i>B. amyloliquefaciens</i>	12.5	ND	42.9
		<i>B. Aerius</i>	4.2	<i>Paenibacillus lactis</i>	3.5	ND	50			
		<i>B. Amyloliquefaciens</i>	4.2	ND	35.6					
		<i>B. circulans</i>	4.2							
		<i>B. firmus</i>	4.2							
		<i>B. Subtilis</i>	4.2							
		<i>C. sporogenes</i>	4.2							
		ND	25							

Hasta el momento se identificaron el 92 % de las especies presentes en el muestreo 1 y el 72 % de las especies presentes en el muestreo 3. Se observa en todos los casos un predominio marcado de la especie *B. licheniformis*, además de un aumento de diversidad de especies en la etapa de concentrado, indicando una contaminación potencial con otras especies, cuyas enzimas podrían llegar al producto final.

## Discusión y conclusiones

Se observó un aumento en el recuento de la población de esporulados aerobios termófilos hacia el final del proceso que igualó a la población de aerobios mesófilos.

Las actividades proteolítica y lecitinasa fueron predominantes en ambas poblaciones de esporulados aerobios, mientras que la presencia de actividad β-galactosidasa fue mayor en los termófilos. Además a lo largo del proceso se observó una selección de cepas de esporulados termófilos con mayor capacidad de deterioro.

La identificación de especies realizadas hasta el momento muestra un aumento en la diversidad de especies en el punto de evaporación lo que supone un punto potencial de contaminación que podría redundar en liberación de enzimas hacia el producto final. Se observa un claro predominio de la cepa F2 de *B. licheniformis* en todas las etapas y muestreos realizados por lo que se perfila como una buena candidata para continuar los estudios relacionados a este proyecto.