

**Incidencia de *Pseudomonas spp.* y grupo *Bacillus cereus*, en leche
cruda y leche procesada por ultra alta temperatura**

Por

Maickol Rafael Sanchez Leger

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

En

CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO

RECINTO DE MAYAGÜEZ

2019

Aprobado por:

Lynette E. Orellana Feliciano, Ph.D.
Presidente, Comité Graduado

Fecha

María Plaza, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Leyda Ponce De León, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Armando Rúa de la Asunción
Representante Escuela Graduada, Ph.D.
Comité Graduado

Fecha

Fernando Pérez, Ph.D.
Coordinador, Programa de Ciencia y
Tecnología de Alimentos

Fecha

ABSTRACT

Psychrotrophic bacteria levels are one of the most important aspects when processing UHT milk, since these levels will have a negative impact on the shelf-life of the product. To study the incidence of psychrotrophic bacteria *Pseudomonas spp.* and the *Bacillus cereus* group, a total of 16 samples were taken: 8 samples of raw milk and 8 samples of milk processed by ultra high temperature (UHT). The bacterias were sampled in specific media for *B. cereus* group and *Pseudomonas spp.* In addition, sampling for psychrotrophic bacteria and total psychrotrophic bacteria were done. Alcohol test at 70%, 75%, 80% and 85% were performed in raw milk. No linear correlation was found between the psychrotrophic bacteria and the alcohol test. In 23% of the samples of raw milk, psychrotrophic bacteria levels were higher as 8×10^6 CFU/ml. On the other hand, in samples of UHT milk the 63% was positive for the *B. cereus* group. All microorganisms identification were confirmed by real-time PCR, by identifying the *pc-plc* gene for *B. cereus* group and the *CarA* gene for *Pseudomonas spp.*

RESUMEN

Los niveles de bacterias psicrotróficas son uno de los aspectos más importantes a la hora de procesar leche por ultra alta temperatura, debido a que estos niveles van a tener un impacto negativo en el largo de vida útil del producto. Para estudiar la incidencia de bacterias psicrotróficas *Pseudomonas spp.* y del grupo *Bacillus cereus*, se tomaron un total de 16 muestras: 8 muestras de leche cruda y 8 muestras de leche procesada por ultra alta temperatura. Se realizó conteo de bacterias en medios específicos para el grupo *B. cereus* y *Pseudomonas spp.* También, se realizaron muestreos y conteos de otras bacterias psicrotróficas y bacterias psicrotróficas totales. Se realizaron pruebas de alcohol al 70%, 75%, 80% y al 85% en leche cruda. No se encontró correlación lineal entre las bacterias psicrotróficas y la prueba de alcohol. En el 23% de las muestras de leche cruda, los niveles de bacterias psicrotróficas se encontraban por encima de 8×10^6 CFU/ml. Por otro lado, en las muestras de leche ultra alta temperatura, el 63% resultó positiva para el grupo *B. cereus*. Los resultados fueron confirmados mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, al identificar el gen *pc-plc* para el grupo *B. cereus* y el gen *CarA* para *Pseudomonas spp.*

**Derechos de Autor Reservado©
Maickol Rafael Sanchez Leger
2019**

DEDICATORIA

Para todos aquellos que se levantan temprano a luchar día a día por sus sueños, a los que a pesar de las caídas se levantan, y a ti que sin importar lo cansado que te encuentres, siempre tienes una sonrisa y alegría para ofrecerle a los demás. A ustedes mis respetos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios: Gracias Dios por estar conmigo cada día, por escuchar mis oraciones. No me cabe ninguna duda de que siempre escuchaste mis oraciones y nunca me abandonaste.

A Francisco Antonio Muñoz: Papi eres mi héroe favorito. Siempre has estado conmigo en las buenas y en las malas, incluso cuando nadie más confiaba en mí. Te esforzaste mucho por enviarme a la universidad y eso para mí significa mucho, por esto y otras cosas, mi tesis te la dedico a ti, TE AMO.

A mi madre Onitsha María Leger: Gracias por darme la vida y gracias por ser mi fuente de inspiración para muchas cosas, TE AMO.

A mis hermanas Katherine y Diana: Quiero que sepan que las quiero mucho y estoy orgulloso de tener unas hermanas como ustedes. Gracias chicas por estar conmigo a pesar de la distancia. LAS AMO.

A Mayra Cathme: Por estar siempre conmigo cuando más lo necesitaba, gracias por tu apoyo y por tu confianza. Fuiste una persona muy especial en mi corazón.

A la Doctora Orellana por acompañarme y confiar en mí durante todo el trayecto de la carrera. A la Doctora Plaza por siempre estar disponible y colaborar con mi desarrollo profesional. A la Doctora Leyda por su apoyo en mi trabajo de investigación. Al Doctor Fernando Pérez por su apoyo y su empatía en todo, aprendí mucho de usted como persona y como profesional profesor. A Félix Caro por siempre estar disponible a ayudarme con la compra de los materiales de mi tesis, eres lo máximo Félix. A Lorena por ayudarme con mi investigación. A Jorge Ortega por adiestrarme en el laboratorio de microbiología, te quedabas durante horas en el laboratorio conmigo, gracias hermano.

TABLA DE CONTENIDO

1.1	INTRODUCCIÓN	1
1.2	OBJETIVOS	4
1.3	OBJETIVO PRINCIPAL	4
1.4	OBJETIVOS SECUNDARIOS	4
2	REVISIÓN LITERARIA	5
2.1	LECHE.....	5
2.2	LACTOSA	5
2.3	LÍPIDOS.....	7
2.4	PROTEÍNAS:	11
	CASEÍNA:.....	12
2.5	EL AGUA	15
2.6	LA INDUSTRIA DE LA LECHE EN PUERTO RICO.....	16
2.7	LECHE UHT.....	17
2.8	FASES DEL PROCESAMIENTO UHT	18
2.9	MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA EN UHT	20
2.9.1	<i>Pseudomonas spp.</i>	25
2.9.2	<i>Grupo Bacillus cereus</i>	26
2.9.3	<i>Gelificación y daños por proteasas y lipasas en leche UHT</i>	27
2.9.4	<i>Prueba de alcohol</i>	29
2.9.5	<i>Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real</i>	30
2.10	MÉTODOS DE DETECCIÓN	33
2.10.1	<i>Prueba de termoestabilidad o prueba de alcohol</i>	34
2.10.2	<i>Aislamiento de Pseudomonas spp. y grupo Bacillus cereus</i>	35
3	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	36
3.1.1	<i>Toma de muestra y análisis microbiológico</i>	36
3.1.2	<i>Cepas de bacterias y primers</i>	39
3.1.3	<i>Extracción de ADN</i>	41
3.1.4	<i>Procedimiento con SYBR Green</i>	43
3.1.5	<i>Sensibilidad y especificidad del PCR en tiempo real</i>	43
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
4.1.1	<i>Sensibilidad, límite de detección y especificidad de los primers</i> :.....	45
4.1.2	<i>Resultados de los muestreos de leche cruda y leche procesada por UHT</i>	46
4.1.3	<i>Grupo Bacillus cereus y Otras bacterias</i>	49
4.1.4	<i>Conclusión</i>	51
4.1.5	<i>Recomendaciones</i>	52
5	REFERENCIAS.....	53
5.1	ANEXOS	59

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Primers utilizados durante la reacción de PCR en tiempo real.....	39
Tabla 2. Prueba de sensibilidad.....	45
Tabla 3. Resultados microbiológicos de bacterias en leche cruda, en leche UHT y resultados de la prueba de alcohol	48

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de la estructura de la caseína.....	13
Figura 2. Metodología del proceso para la leche cruda.....	38
Figura 3. Metodología del proceso para la leche procesada por UHT.....	40
Figura 4. Electroforesis de ADN de <i>Pseudomonas spp.</i> 165pb.....	46
Figura 5. Electroforesis de ADN del grupo <i>Bacillus cereus</i>	46
Figura 6 Gráfica de regresión lineal de bacterias psicrotróficas y la prueba de alcohol.....	48
Figura 7. Gráfica de regresión lineal de <i>Pseudomonas spp.</i> y la prueba de alcohol.....	48
Figura 8. Gráfica de regresión lineal del grupo <i>B. cereus</i> y la prueba de alcohol.....	49
Figura 9. Gráfica de regresión lineal de Otras bacterias psicrotróficas y la prueba de alcohol.....	49

1.1 INTRODUCCIÓN

La leche es la secreción láctea, prácticamente libre de calostro, obtenida por el ordeño de una o más vacas sanas, con un mínimo de 3.25% de grasa y 8.25% de sólidos no grasos (FDA, 2018). La leche de algunos animales, especialmente vacas, búfalos, cabras y ovejas se utilizan para el consumo humano; ya sea luego de ser pasteurizada, o en la forma de una gama de productos lácteos. Los principales componentes encontrados en la leche son: agua, proteínas, grasas, lactosa, vitaminas y minerales (Galván, 2005). Estos nutrientes son una buena fuente de energía comestible, no solo para los mamíferos, sino también para numerosos microorganismos, principalmente bacterias. Sin embargo, algunos mohos y levaduras también pueden propagarse en la leche (Walstra et al., 2006). De acuerdo con la legislación vigente de la European Commission (EU, 2010) el tratamiento de ultra alta temperatura (UHT, por sus siglas en inglés), es un proceso de esterilización, que consiste en un calentamiento continuo a una temperatura no inferior a 135°C, por un periodo de tiempo de 2 a 4 segundos (EU, 2010). Este tratamiento garantiza un largo de vida útil de seis meses a un año (Machado et al., 2017).

Según el Departamento de Agricultura de Puerto Rico (2014), la industria lechera es la empresa agrícola con más ingresos económicos. Por ejemplo, durante el año fiscal 2012-2013, el ingreso bruto ascendió a 929.7 millones de dólares, de los cuales 212.7 millones de dólares provenían de la producción lechera, es decir, un 22.9% del ingreso

total. Adicionalmente, la industria lechera es también fuente de producción de leche y carne, también es la fuente principal de empleo agrícola de la Isla. Se estima esta industria genera alrededor de 25,000 empleos de manera directa e indirecta en la Isla, con la fabricación y en las ventas de productos, que de una u otra forma, se relacionan con la industria de la leche. Teniendo en cuenta su importancia, así como para la economía y la salud del pueblo, es un compromiso realizar esfuerzos que impacten el desarrollo continuo, eficiente y ordenado de esta industria.

En Puerto Rico solo existen tres industrias lecheras, que son: Suiza Dairy, Tres Monjitas e Indulac (Industria Lechera de Puerto Rico, Inc.). Anteriormente Suiza Dairy y Tres Monjitas procesaban toda la leche fresca producida en el país, mientras que Indulac procesaba el excedente de leche proveniente de las demás industrias. La leche cruda que las plantas no pueden procesar y vender como leche fresca, se define como “leche excedente”, a causa de esto, se creó la empresa Indulac. Esta compra la leche excedente y la convierte en: leche UHT, queso, mantequilla, entre otros productos lácteos (Lara y Martínez, 2004). Actualmente, Suiza Dairy y Tres monjitas procesan leche UHT, sin embargo, Indulac es el principal distribuidor de leche UHT en la toda Isla.

Uno de los problemas que enfrentan las industrias lácteas que procesan leche UHT, es la presencia de enzimas termoestables como: la plasmina (Chavan et al., 2011), una enzima nativa de la leche y enzimas procedentes de bacterias como las proteasas y lipasas. Estas enzimas, son producidas por bacterias psicrotróficas, capaces de crecer a

una temperatura menor de 7°C y posteriormente afectando la calidad del producto (Vithanage et al., 2016). Las enzimas proteolíticas, al igual que la plasmina, hidrolizan la caseína haciendo que se desestabilice el micelio, lo que posteriormente causa coagulación. Por otro lado, las enzimas lipolíticas hidrolizan los ácidos grasos de la molécula de triglicéridos, lo que da lugar, a la liberación de ácidos grasos de cadenas cortas, tales como: ácido butírico, ácido capróico y ácido caprílico. Estos ácidos grasos libres causan un sabor jabonoso, amargo y rancio en la leche (Datta & Deeth, 2003). Un recuento de bacterias psicrotróficas totales menor a 8×10^6 CFU/mL, asegura en este tipo de producto un largo de vida útil mayor a seis meses, sin embargo, recuentos mayores tendrán un impacto negativo al disminuir el largo de vida útil (Law et al., 1977). Además, el incremento de bacterias en la leche, causa una disminución del pH y por consiguiente, inestabilidad térmica al procesar la leche a una alta temperatura y resultados positivos en la prueba de alcohol (Rodríguez, 2012).

Entre el grupo de bacterias psicrotróficas más importantes en el procesamiento de la leche UHT se encuentran: *Pseudomonas spp.* (Machado et al., 2017) y el grupo *Bacillus cereus* (Vithanage et al., 2016). Determinar la incidencia y concentración de estas bacterias, resulta de gran importancia, a la hora de tomar en cuenta la calidad y largo de vida útil de la leche. El objetivo de este estudio es determinar la incidencia de *Pseudomonas spp.* y del grupo *Bacillus cereus*, en leche cruda y leche procesada por ultra alta temperatura.

1.2 Objetivos

1.3 Objetivo Principal

- Determinar la incidencia de *Pseudomonas spp.* y del grupo *Bacillus cereus* en leche cruda y leche procesada por UHT.

1.4 Objetivos Secundarios

- Determinar la presencia de *Pseudomonas spp.* y del grupo *Bacillus cereus*, por el método de PCR en tiempo Real en leche procesada por UHT.
- Realizar la prueba de alcohol a los tanques de leche.
- Comparar las relaciones que existen entre el recuento de bacterias psicrófilas, *Pseudomonas spp.*, grupo *Bacillus cereus* y los resultados de la prueba de alcohol.
- Realizar electroforesis a las muestras de ADN.
- Utilizar cebadores (“primers”) específicos para la detección de bacterias.

2 REVISIÓN LITERARIA

2.1 Leche

La leche es uno de los alimentos más antiguos, que ha sido consumido por el hombre. Tiene un alto valor nutricional, ya que posee una gran cantidad de energía, proteínas de fácil asimilación, grasas, minerales y vitaminas necesarias para muchas etapas del desarrollo humano. Accidentalmente el hombre fue descubriendo, que a partir de la leche fluida, se podían obtener otros productos derivados. Al observar el principio de la fermentación natural y conforme fue experimentando e investigando, ha desarrollado una variedad muy amplia de productos como: el queso, el “yogurt”, la mantequilla, los dulces, entre otros (Galván, 2005). Los componentes principales de la leche son: agua, lactosa, lípidos, proteínas y sales.

Componentes de la leche

2.2 Lactosa

Es el carbohidrato distintivo de la leche, compuesto por D-glucosa y D-galactosa. El grupo aldehído de la galactosa está unido al carbono 4 de la glucosa, a través del enlace β -1,4- glucosídico, la lactosa es también conocida como azúcar de la leche (Walstra et al., 2006). La lactosa ó 0-4-D-galactopiranosil-(1-4)-glucopiranososa, es el mayor carbohidrato

de la leche, este azúcar ha sido encontrada en casi todas las leches de los mamíferos y se encuentra presente únicamente en la leche. La glucosa y la galactosa son azúcares que se encuentran de manera abundante en el metabolismo de los mamíferos. La lactosa es sintetizada en la vesícula de Golgi que se encuentran en los lactocitos, esto ocurre en presencia de la proteína del suero lactalbumina. La lactosa puede ser separada de la leche mediante la cristalización del suero de la leche. La cristalización de la lactosa se produce a gran escala a nivel industrial y es muy utilizada en alimento y medicamentos (casi todas las pastillas contienen lactosa como material de relleno). También es utilizada como materia prima para desarrollo de químicos o derivados enzimáticos, tales como: lactitol, un edulcorante artificial. La lactulosa, un isómero de la lactosa que es utilizado principalmente para combatir el estreñimiento, y los oligosacáridos, empleados en alimentos como prebióticos.

De igual manera, otras reacciones no deseadas pueden ocurrir durante el tratamiento térmico, tales como: la caramelización y la reacción de Maillard. Esta última ocurre debido a la presencia de grupos aminos, especialmente de los residuos de lisina. Esta reacción puede dar lugar a la formación de compuestos de sabores y pigmentos marrones, al mismo tiempo que reduce la disponibilidad nutricional de la lisina. La lactosa les provee energía a los animales jóvenes, pero tiene también otras funciones, tales como, darle un poco de sabor a la leche. Se estima de que el 60% de la población humana,

metaboliza eficientemente la lactosa, pero después de los 4 años de edad, la actividad enzimática se reduce de 5 a 10% (Walstra et al., 2006).

2.3 Lípidos

Los lípidos son ésteres de ácidos grasos y están relacionados con compuestos que son solubles en compuestos no polares u orgánicos e insolubles en compuestos polares, tales como el agua. También a los lípidos se les suele llamar grasas, pero el término grasas es considerado como una mezcla de triglicéridos, que parcialmente se solidifica a temperatura ambiente. En el rumen del animal, el potencial redox es bajo y se produce una excesiva hidrogenación de los enlaces dobles. Es decir, que la mayoría de los ácidos grasos extraídos del tracto intestinal están saturados. La esterificación es el resultado de los ácidos grasos con glicerol, que ocurren en las glándulas mamarias, esto da como resultado una grasa con un alto grado de fusión que parcialmente es sólida a temperatura ambiente. Esto no puede ser tolerado por el animal. Por consiguiente, las vacas han desarrollado unos mecanismos por los cuales los rumiantes mantienen la grasa de la leche líquida (Walstra et al., 2006).

El primer mecanismo consiste, en que en las glándulas mamarias los ácidos grasos de cadena corta son sintetizados en grandes cantidades, estos ácidos le confieren a los triglicéridos un bajo punto de fusión. La flora microbiana del rumen produce

β -hidroxibutirato, que aumenta la producción de ácido butírico (C4). El rumen también produce grandes cantidades de acetatos, que se combinan con C4, formando ácidos de C6-C14. Los ácidos grasos de la leche se derivan de los triglicéridos en la sangre. El segundo mecanismo consiste, en que las glándulas mamarias contienen desaturasa, una enzima que convierte el ácido esteárico (18:0) en ácido oleico (18:1) y en menor medida, C16:0 en C16:1. Los ácidos insaturados le confieren a las grasas un relativo bajo punto de fusión. Por último, los residuos de los ácidos grasos de los triglicéridos, no se encuentran distribuidos de igual manera entre las posiciones 1, 2 y 3 de la molécula de glicerol; los residuos de cadenas cortas son predominantes en la posición 3, en lugar de la posición 2, lo que le confiere un bajo punto de fusión. Existen varios tipos de lípidos en la leche que varían tanto en concentraciones como en composición. Entre los diferentes lípidos que podemos encontrar en la leche son: los triacilgliceroles monoglicéridos, diglicéridos, ácidos grasos libres, lípidos compuestos y lípidos no saponificables (Walstra et al., 2006).

Triacilgliceroles: Los triacilgliceroles, también llamados triglicéridos, componen el 98% de los lípidos que se encuentran en la leche y como consecuencia, determinan en gran medida las propiedades de la grasas en la leche. Los triglicéridos están formados por un glicerol y tres moléculas de ácidos grasos. Es un compuesto altamente no polar sin una superficie activa y en estado líquido, puede actuar como solvente de varias sustancias no polares tales como: esteroides, carotenoides y tocoferol (Rennó et al., 2013).

La distribución de los residuos de ácidos grasos sobre la molécula de los triglicéridos no se encuentran de manera aleatoria, por ejemplo: el ácido butírico y el ácido capríco se encuentran mayormente en la posición del carbono tres, y el ácido esteárico en la posición uno. La posición de los residuos de ácidos grasos en la molécula de triglicéridos tiene un efecto en el comportamiento y cristalización de la grasa de la leche.

Monoglicéridos y diglicéridos: Algunos de ellos pueden producirse e incrementarse en la leche fresca, especialmente cuando ha habido lipólisis. Los diglicéridos son predominantemente apolares y no se diferencian mucho de las propiedades de los triglicéridos. Los monoglicéridos, se encuentran presentes en cantidades pequeñas, son más polares que los diglicéridos, se encuentran activos en la superficie y por lo tal, se acumulan en una interfase de agua-aceite.

Ácidos grasos libres: Solo se encuentran presentes en leche fresca. La cantidad de ácidos grasos libres está altamente relacionada a la lipólisis, ya sea por enzimas bacterianas, o por la enzima nativa de la leche. Los ácidos grasos más cortos son parcialmente solubles en agua, y al mezclarse con agua se dividen en iones con un pKa de 4.8. En el plasma de la leche, su forma predominante es la forma ionizada (es decir, como jabones), estos son mucho más solubles en agua pura que en ácidos grasos puros (Fox & Mcsweeney, 1998). La distribución de las fases de los ácidos tiene mucha importancia, porque los ácidos se disuelven en la fase acuosa en forma de jabones. Por lo

tanto, los ácidos más cortos son los responsables del sabor jabonoso y rancio que se percibe luego de que ha ocurrido la lipólisis (Vithanage et al., 2016).

Lípidos compuestos: También se les llama lípidos polares, debido a que contienen cargas, es decir, grupos ácidos y grupos básicos. Estos lípidos son moléculas anfipáticas, y son prácticamente insolubles tanto en agua como en aceite. Son altamente tensioactivos, formando una bicapa, que son las estructuras básicas de las membranas celulares y se encuentran presentes en la membrana de los glóbulos grasos de la leche. La mayoría de los lípidos compuestos se encuentran en forma de fosfolípidos, derivados principalmente del ácido fosfatídico, mediante uniones con bases orgánicas.

Lípidos no saponificables: En la leche, gran parte de los lípidos no saponificables son constituidos por el colesterol, una molécula bastante polar que se asocia fácilmente con los fosfolípidos (Lindmark, 2008). Una parte del colesterol se encuentra dentro de la membrana de los glóbulos de grasas, y el resto está disuelto en la grasa de la leche. Entre los esteroides que se encuentran disueltos en la leche son: los carotenoides, en especial los β -carotenos que son los responsables del color amarillo de las grasas; los tocoferoles, que son antioxidantes y las vitaminas E, vitamina A, y la vitamina D, (Walstra et al., 2006).

Aspectos nutricionales de la grasa de la leche: Dentro del aspecto nutricional, las grasas proveen energía, cerca de 37kJ/g (8.84 kcal/g). También ayudan a absorber las vitaminas liposolubles tales como: vitamina A, E, K y D. Asimismo, la grasa de la leche

es fuente de ácidos grasos esenciales, por ejemplo: el ácido linoleico, un precursor de algunas hormonas y otros metabolitos esenciales (Walstra et al., 2006). Cabe añadir, que las grasas saturadas de la leche, están asociadas a la hipercolesterolemia, causando un aumento del colesterol en la sangre que puede causar enfermedades coronarias (Nestel et al., 2005).

2.4 Proteínas:

Las proteínas de la leche están compuestas principalmente por la mezcla de dos grupos de proteínas: caseínas (76%) y proteínas del suero (18%). La caseína es definida como la proteína de la leche que precipita a un pH 4.6, por lo tanto, la caseína no es soluble en su punto isoeléctrico. La caseína se encuentra en la leche formando grandes agregados, micelas de caseína unidas; las cuales también contiene fosfato de calcio coloidal. Determinada genéticamente con una estructura primaria, la caseína, a su vez, está compuesta por: Las α S1-, α S2-, β -, y κ -caseína, pero cada una de estas fracciones de caseína se encuentran en una serie de variantes (Rodríguez, 2012).

La mayor parte de la κ -caseína se encuentra glicosilada en varios grados. Las α S (α S1-, α S2) y la β - caseína, son fosfoproteína que tienen grupos fosfatos esterificados a los grupos de los residuos de serina. Las mismas pueden precipitar en presencia de iones

de calcio Ca^{2+} , pero la k-caseína la protege de dicha precipitación. Sin embargo, la k-caseína es atacada fácilmente por la enzima renina, la cual divide una porción de la k-caseína y hace que esta pierda su habilidad protectora. Como resultado, las α S y la β -caseína, se precipitan en la presencia de calcio. Esta reacción es la base de la coagulación de la leche por la acción de la enzima renina, la cual da lugar a la elaboración del queso. La caseína alterada por la acción de la renina es llamada paracaseína, y esta contiene gran cantidad de fosfato de calcio. La caseína no muestra desnaturalización, sin embargo, cuando está sometida a altas temperaturas por encima de 120°C , la caseína se vuelve insoluble debido a los cambios químicos (Walstra et al., 2006).

Caseína: Los modelos de caseína consideran, que la micela está dividida en submicelas que pueden contener una composición variante o idéntica. El modelo más aceptado hasta el momento, es el modelo propuesto por Walstra et al., en el 1984 (Figura I). Este establece que las micelas de caseína son partículas esféricas con una superficie rugosa, cada micela está compuesta por 20-25 moléculas de submicelas con un diámetro de 12-15nm. Así mismo, describe que las micelas presentan dos partes fundamentales: una parte hidrofóbica, que está en el centro de la micela, y otra parte hidrofílica, que está en la superficie de la micela de caseína.

La parte hidrofóbica de la micela de caseína, está compuesta por las α S y la β -caseína, mientras que la parte hidrofílica está compuesta por las α S y k-caseína. Las propiedades hidrofílicas de estas últimas, es debido a los residuos glucosídicos de la k-

caseína. Las diferentes submicelas se encuentran unidas mediante el fosfato cálcico coloidal. La molécula de k-caseína se encuentra orientada hacia la parte superior de la micela, con la parte de grupo carboxilo terminal sobresaliendo de la superficie de la micela en forma de vellosidad. Esta vellosidad constituye, una capa pilosa alrededor de la micela de caseína, que la protege de la agregación mediante un mecanismo de estabilización estérica y electrostática (Walstra et al., 1984).

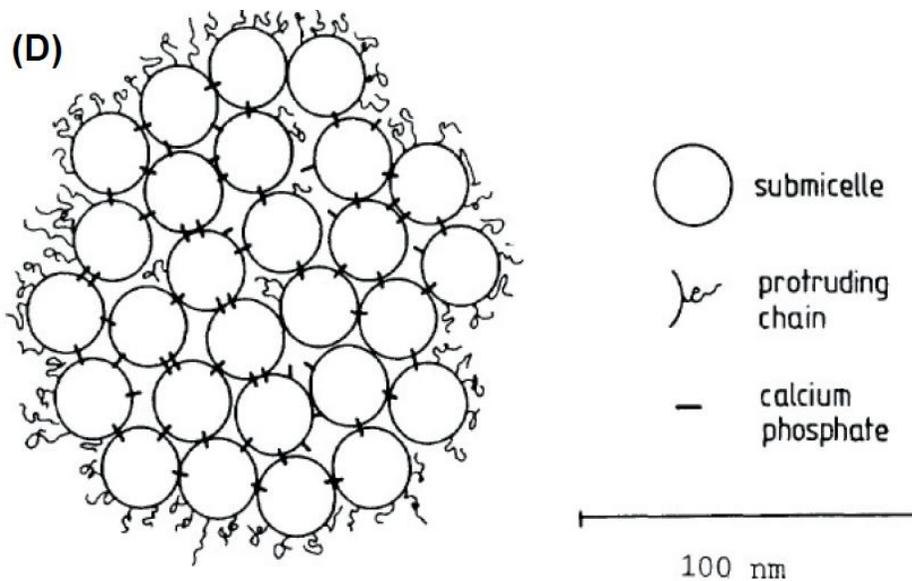


Figura I. Modelo de la estructura de la caseína

Proteínas del suero: Las proteínas del suero, se encuentran principalmente en forma de proteínas globulares y son relativamente hidrofóbicas. La mayoría de las proteínas del suero contienen una proporción apreciable de α -hélice y β -láminar. La distribución de las

cargas es bastante homogénea; y las mismas se vuelven insolubles si la leche se calienta a un pH por debajo de 6.5. La desnaturalización de estas proteínas, no resulta en una agregación entre ellas, sin embargo, estas precipitan sobre la micela de la caseína y se mantienen dispersas. Entre las proteínas globulares tenemos: la α - lactoglobulina y β -lactalbúmina.

La α - lactoglobulina, actúa como coenzima en la síntesis de lactosa. La proteína es pequeña, compacta y organizada estructuralmente, casi como una molécula esférica. Esta presenta una completa renaturalización luego del tratamiento térmico, si otras proteínas no se encuentran presentes durante el calentamiento. La β -lactalbúmina, es la proteína del suero que se encuentra en mayor cantidad, esta propiedad permite dominar las propiedades de las proteínas del suero, en especial durante las reacciones que ocurren durante el calentamiento térmico. Su solubilidad depende del pH y las fuerzas iónicas, pero no precipita al acidificar la leche, de igual manera sucede lo mismo con las demás proteínas del suero (Fox & Mcsweeney, 1998).

El principal rol de las proteínas es proveer aminoácidos esenciales tales como: leucina, lisina, metionina, fenilalanina, triptófano, treonina y valina. Por lo cual, para estos fines, la proteína debe tener una buena digestibilidad (capacidad para digerir y aprovechar las proteínas) y en cantidades suficientes. La proteína de la leche tiene una digestibilidad cerca del 100%, sin embargo, si se calienta a muy altas temperatura, la digestibilidad disminuye, debido a la reacción de Maillard. Otra función de las proteínas

es que puede unir grandes cantidad importantes de nutrientes, tales como: el calcio y el fosfato. Esta propiedad de las proteínas evolucionó de manera natural, para proporcionar al ternero suficientes minerales para el desarrollo de los huesos, no obstante, también es importante para la nutrición humana (Walstra et al., 2006).

Sales: Principalmente se encuentran: K, Na, Ca, Mg, Cl, y fosfatos (Walstra et al., 2006). No todas las sales están disueltas y no toda las sales están ionizadas, así pues, las micelas de caseína contiene sales no disueltas, además de los contraiones cargados negativamente, tales como: Ca, Mg, K y Na. Las sales disueltas afectan varias propiedades de la leche, por ejemplo, la estabilidad de las proteínas. Las micelas de caseína contienen la sal llamada fosfato cálcico coloidal que también contienen trazas de citrato. El fosfato cálcico coloidal es un compuesto amorfo que varía en su composición y debido a sus propiedades, también puede establecer intercambio iónico (Fox & Mcsweeney, 1998).

2.5 El agua

El 87% de los componentes de la leche es agua y el 13% restante, lo constituye otros componentes, tales como, los sólidos totales. La actividad de agua en la leche es cerca de 0.995, lo que permite, que microorganismos puedan encontrar agua disponible para su crecimiento y desarrollo (Henningsson et al., 2007). La cantidad de agua que contiene la leche es regulada por la azúcar lactosa, la que es sintetizada por las células secretoras de

las glándulas mamarias. La producción de leche es afectada casi de manera inmediata, si se presenta un suministro limitado de agua para el animal (Pineda, 2014).

2.6 La industria de la leche en Puerto rico

La industria de la leche en Puerto Rico, fue una las empresas con mayores fuente de ingresos económicos durante décadas. En el año 1920, aproximadamente, la industria comienza su desarrollo, con la importación de ganados y la siembra de pasto de mejor calidad (Fernández, 2018). Al principio, las vacas eran ordeñadas a mano y la leche se recogía en todo tipo de envase, luego se vertían en garrafas de metal, que posteriormente eran llevadas a las plantas procesadoras. Según el Departamento de Agricultura de Puerto Rico, (2014) en la actualidad, se produce alrededor de 242,030,396 cuartillos de leche al año y genera más de 25,000 empleos. Aproximadamente, el 15.61% de la producción de leche pasa a ser leche excedente, de la cual, Indulac procesa unos 24,649,404 millones en ventas entre leche UHT y otros productos lácteos.

Hay varios municipios en donde hay establecimiento de vaquerías para la producción de leche, sin embargo, Hatillo era el municipio con más vaquerías, por este motivo, Hatillo es conocido como la Central de la Industria Lechera. Este municipio alberga una población promedio de 38,925 personas y 30,159 vacas. Para el año 2014, la Industria lechera reportó que Arecibo era la región con más vaquería en toda la Isla (Fernández, 2018).

2.7 Leche UHT

La leche, debido a que es un alimento rico en nutrientes, resulta también un medio muy viable para el crecimiento de microorganismos, entre ellos, los patógenos (Galván, 2005). Como resultado, la leche debe ser sometida a tratamientos térmicos o procesos que garanticen la inocuidad del producto. En la actualidad, algunos de los procesos más utilizados son: la pasteurización y la ultra alta temperatura. En adición, la leche puede ser sometida a otras operaciones de estandarización, homogeneización, clarificación u otras; siempre y cuando preserven la inocuidad del producto y cumplan con las especificaciones de su denominación.

De acuerdo con el Departamento de Agricultura, (2014) el método de UHT es uno de los procedimientos térmicos más utilizado en Puerto Rico para preservar la leche. Con este tratamiento se obtiene un producto libre de microorganismos y se aumenta el tiempo de vida útil del mismo, de 6 meses a 1 año. Sin embargo, una alta temperatura del proceso UHT y un tiempo de almacenamiento prolongado pueden, resultar en cambios en las propiedades sensoriales que pueden llegar a un límite más allá, en el cual el consumidor puede rechazar el producto.

Varias reacciones enzimáticas y fisicoquímicas pueden producirse en la leche UHT que son responsables del desarrollo de diversos sabores desagradables, y efectos negativos como: la sedimentación, la gelificación y la decoloración de la leche (Richards

et al., 2016). Existen dos tipos de calentamiento que se le aplica a la leche UHT: el calor directo y calor indirecto. El sistema de calor indirecto, consiste en que el producto y el medio de calentamiento no tienen contacto directo, sino que se encuentra dividido por medio de barreras de acero inoxidable. En los sistemas de calentamiento directo, se inyectan a presión el vapor culinario sobre el alimento. La regeneración permite la transferencia de calor entre el producto estéril y el producto crudo, esto reduce el consumo de energía y es utilizada en la transmisión directa e indirecta en los procesos UHT (Burton, 1988).

2.8 Fases del procesamiento UHT

Las siguientes fases de operaciones son comunes en todos los sistemas UHT: pre-esterilización, producción y empaque aséptico.

Fase de pre-esterilización: Antes de empezar la producción, la planta procesadora debe pre-esterilizar los equipos, para evitar una contaminación cruzada del producto que ha sido tratado térmicamente. La fase de pre-esterilización envuelve las siguientes etapas: la primera etapa, consiste en inyectar vapor de agua al equipo de UHT, a la misma temperatura en la cual el producto será sometido. El tiempo mínimo de la esterilización con vapor de agua es de 30 minutos. Luego, la segunda etapa consiste en enfriar el equipo UHT hasta la temperatura requerida para empezar la producción (Gedam et al., 2007).

Producción: El medio de calentamiento y la leche no hacen contacto directo, sino, están separados través de placas o superficie de acero. Diferentes tipos de intercambiadores de calor se usan en la actualidad, tales como: de placas, tubular y de superficies raspadas. Las etapas de producción pueden variar dependiendo del tipo de proceso. El proceso que describiremos a continuación es para el método indirecto de intercambio de calor por placas (Gedam et al., 2007).

La leche que se encuentra a 4°C, es bombeada desde el tanque de almacenamiento hasta el tanque de balance, en donde se realiza la formulación dependiendo del tipo de leche que se quiera obtener. Luego la leche se bombea hacia la sección regenerativa de intercambio de calor en placa, en la cual, el producto es calentado hasta una temperatura de 75°C por la leche tratada UHT, al mismo tiempo que la leche tratada UHT se enfría. La leche precalentada, se homogeniza a una presión de 180-250 bars, después la leche homogenizada y precalentada continúa hacia la sección regeneradora en donde se calienta a una temperatura de 137°C (Bylund, 1995).

El medio de calentamiento, es un ciclo de agua caliente con una temperatura regulada por la inyección de vapor en el agua. Posteriormente, la leche pasa a través de un tubo de sostenimiento dimensionado, durante unos 4 segundos. Finalmente, el enfriamiento es realizado regenerativamente en dos etapas: primero contra el extremo frío del circuito de agua caliente, y luego contra el producto frío entrante. La leche ha sido enfriada

regenerativamente, continúa hacia el área de empaque aséptico o hacia un tanque de almacenamiento (Bylund, 1995).

Empaque aséptico: la leche esterilizada es vertida en un empaque estéril y hermético. Esto permite preservar la leche por un largo periodo sin la necesidad de utilizar preservativos o refrigeración. Lo más importante durante esta fase es que el envase a utilizarse para empaquetar la leche tiene que estar estéril. Todo el manejo del producto post-proceso debe ser dentro de un ambiente estéril (Gedam et al., 2007).

2.9 Microorganismos de importancia en UHT

Regularmente la leche es estéril cuando proviene de ubres sanas. Cuando la leche abandona la ubre, normalmente contiene un bajo número de microorganismos que suelen oscilar entre cientos y unos pocos miles de unidades formadoras de colonias por mililitro (CFU/ml). De Jonghe et al., (2011) realizaron un recuento total de placas aeróbicas con resultados alrededor de 10,000 UFC /ml al inicio del almacenamiento de la leche cruda. La contaminación por bacterias puede darse durante y después del ordeño, no obstante, existen seis vías principales por las cuales los microorganismos se introducen y colonizan la leche, estos son: el animal, el medio ambiente, el alimento del animal, equipos de ordeño, el agua y el ordeñador (Walstra et al., 2006).

El animal: Durante el ordeño, los microorganismos pueden ingresar a la leche desde la piel de la vaca hasta de la ubre, que a menudo están contaminados por estiércol, tierra

o polvo. Las escamas de la piel, los pelos, la suciedad de las patas y los flancos también pueden contaminar la leche. Varios tipos de microorganismos pueden contaminar la leche, tales como: coliformes, estreptococos fecales, bacterias intestinales, esporas de bacterias (en su mayoría *Clostridium spp.*), levaduras y mohos. Algunos de estos microorganismos son patógenos del ser humano. Una apropiada vivienda y el cuidado de las vacas, es una medida esencial para mantener las ubres limpias. Como resultado, una limpieza en seco, incluida la eliminación de suciedad de la superficie del animal, es suficiente durante el ordeño. Dicho tratamiento en seco, además, provoca menos pérdida de leche y menos bacterias se desprenden de la piel del pezón. Cuando las ubres están sucias, hay que limpiarlas a fondo antes del ordeño. Sin embargo, la eliminación completa de las bacterias es imposible (Walstra et al., 2006).

El medio ambiente: Las fuente de contaminación proveniente del medio ambiente son: el suelo, el estiércol y el polvo. Todos estos contaminantes pueden llegar a la leche y así aumentar las cantidades de bacterias presentes. Además, las esporas de bacterias, levaduras y mohos también pueden encontrarse en el aire, como por ejemplo, las bacterias del grupo *Bacillus cereus* que se encuentra principalmente en el polvo del heno. Estas esporas pueden entrar en la leche, a través del aire aspirado durante el ordeño mecánico, o caer directamente sobre la leche que se encuentra en los cubos abiertos mientras el ordeño se está realizando. La limpieza de la sala de ordeño y el lugar de descanso de las vacas durante el ordeño, se encuentran entre los factores que determinan en gran medida la contaminación de la leche (Walstra et al., 2006).

El alimento del animal: El alimento a menudo contiene grandes cantidades de microorganismos. Estos pueden caer directamente en la leche pero, más significativamente, ciertos microorganismos en el alimento sobreviven el paso a través del tracto digestivo, y posteriormente ingresan a la leche a través del estiércol, entre estos microorganismos, se incluyen algunos patógenos que afectan a los humanos. Las bacterias formadoras de esporas, tales como: grupo *B. cereus*, *B. subtilis* y *Clostridium tyrobutyricum*, pueden deteriorar la leche y los productos lácteos. La bacteria *C. tyrobutyricum* por ejemplo, se reproduce en grandes cantidades cuando se usa un ensilaje de baja calidad y las esporas bacterianas sobreviven a la pasteurización de la leche y del queso.

A productos como el queso, no se le puede aplicar un tratamiento térmico más intenso para eliminar las esporas por problemas de coagulación, en consecuencia, las esporas presentes luego del tratamiento térmico, pueden causar un "soplado tardío" en algunos tipos de queso. Por esa razón, la alta calidad del ensilaje es de suma importancia para controlar la contaminación de la leche por el estiércol. En algunas regiones, el uso de ensilaje está estrictamente prohibido, por ejemplo, en zonas de Suiza y en el norte de Italia, en donde el queso emmental y el queso parmesano respectivamente se elaboran (Walstra et al., 2006).

Equipos de ordeño: La contaminación cruzada, representa la mayor amenaza de contaminación para casi todos los alimentos, incluyendo la leche. Un equipo de ordeño sin la limpieza adecuada, puede contener una gran cantidad de microorganismos. Estos organismos generalmente provienen de la leche, por lo que pueden crecer rápidamente y pueden disminuir la calidad de la misma. Los métodos de limpieza y desinfección que se aplican a los equipos de ordeño, determinan en gran medida las especies de los organismos contaminantes (Murphy & Boor, 2000). Si se utiliza altas temperaturas, acompañado de una limpieza y desinfección inadecuada, las principales especies contaminantes serán resistentes al calor. Entre las bacterias contaminantes que son resistente al calor se encuentran: micrococos, *Microbacterium lacticum*, algunos estreptococos y bacterias formadoras de esporas. Por otro lado, si la limpieza se realiza a temperatura ambiente, las bacterias que predominarían son: *Lactococcus lactis*, *Pseudomonas spp.* y coliformes. Por lo tanto, es de suma importancia el uso de equipos de ordeño que puedan limpiarse y desinfectarse adecuadamente. Una práctica recomendable es evitar las pequeñas grietas en unidades de goma desgastadas y los "dead end" en los equipos que no se puedan limpiar y enjuagar de manera eficiente (Walstra et al., 2006).

El agua: El agua del grifo debe de ser de buena calidad, cualquier suministro privado de agua debe ser examinado rigurosamente. El agua superficial puede contener muchos microorganismos, incluyendo los patógenos de seres humanos, por lo tanto, no debe ser utilizada para limpiar ni enjuagar. Las bacterias psicrotróficas Gram negativas, tales

como: *Pseudomonas spp*, *Achromobacter*, *Flavobacterium* y *Alcaligenes spp.*, a menudo se encuentran en aguas contaminadas; también en estiércol, tierra y utensilios mal limpiados. Especialmente en los trópicos, el agua puede tener conteos muy altos de bacterias psicrotróficas (Samarzija et al., 2012).

El ordeñador: El ordeñador influye en muchos de los factores precedentes, y por lo tanto, en la calidad de la leche. También puede contaminar la leche directamente, por ejemplo, con las manos. También, si sufren de alguna enfermedad infectocontagiosa, pueden contaminar de manera directa la leche con patógenos (Samarzija et al., 2012).

Las buenas prácticas de manufactura y las buenas prácticas agrícolas tendrán un gran impacto en el largo de vida útil del producto aun después de ser esterilizada (Datta & Deeth, 2003). Bajo condiciones adecuadas, inmediatamente luego del ordeño, las bacterias psicrotróficas, se encuentran en una proporción de 5,000-20,000UFC/ml (Samarzija et al., 2012).

Las bacterias psicrotróficas son capaces de crecer a temperaturas de refrigeración (4°C), durante el almacenamiento y transporte de la leche cruda, lo cual induce a la degradación de la caseína y de los lípidos. Como resultado, se producen sabores u olores indeseables, tales como: sabor amargo, rancio e incluso un olor pútrido (Vithanage et al., 2016). El grupo de bacterias psicrotróficas más importantes, productoras de enzimas proteolíticas y lipolíticas termoresistentes, en la leche UHT son: *Pseudomonas spp.* y grupo *Bacillus cereus* (Parkash et al., 2007).

2.9.1 *Pseudomonas spp.*

Pseudomonas spp. son bacilos psicrotróficos, Gram-negativo, no formadores de esporas, que crecen a un pH neutro o básico. Son organismos aeróbicos, habitantes del suelo, y el agua, con la capacidad de formar biopelículas. Del género *Pseudomonas*, la especie psicrotrófica más común, aislada en la leche cruda y la leche pasteurizada, es *P. fluorescens* (Martins et al., 2015). La mayoría de estas bacterias (58-91%), tienen la habilidad de producir distintas enzimas extracelulares como las proteasas y las lipasas; estas enzimas, resisten los tratamientos a altas temperaturas (Samarzija et al., 2012). Sin embargo, otras especies de *Pseudomonas* se han visto relacionadas con la producción de enzimas termoestables (Marchand et al., 2009).

Diferentes estudios han demostrado que *P. fluorescens* es la especie más predominante de las bacterias psicrotróficas de importancia en la leche cruda y en los procesos UHT. Hammad, (2015) realizó una investigación en la que recolectó muestras de 80 quesos, con el propósito de observar la incidencia de *Pseudomonas spp* y *P. fluorescens*. El 87.5% de las muestras resultaron positiva para *Pseudomonas spp*, de las cuales el 45% correspondía a la bacteria *P. fluorescens*. Por otro lado, una investigación en Australia, evidenció los efectos de las estaciones del año y de las condiciones de almacenamiento en relación a la biodiversidad de las bacterias psicrotróficas en la leche cruda. De las 108 muestras tomadas, el género predominante de bacterias capaces de

producir enzimas termoestables como: las proteasas, lipasas y la fosfolipasa, fue el género *Pseudomonas spp.* (19.9%), de las cuales, *P. fluorescens* representó el 13.8% de la población total de *Pseudomonas spp.* (Vithanage et al., 2016).

Machado et al., (2015) realizaron un estudio en Brasil, para identificar las bacterias psicrotróficas más predominante de la leche cruda, capaces de producir enzimas termoestables. El 26.1% de las bacterias pertenecían al género *Pseudomonas spp.*, sin embargo, el 73.9% de las bacterias, pertenecían a *Serratia liquefaciens*.

2.9.2 Grupo *Bacillus cereus*

El grupo *Bacillus cereus*, es un grupo de bacterias Gram-positiva, formadora de: esporas, productora de toxinas y biopelículas (Gopal et al., 2015). El grupo *B. cereus* está formado por: *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, y *B. weihenstephanensis*. Estas bacterias están distribuidas en el ambiente y pueden introducirse fácilmente en la leche o sus productos, durante el procesamiento de estos o el manejo inadecuado de los mismos (Chen et al., 2004). Las enfermedades transmitidas por los alimentos causadas por *Bacillus spp.* siempre ha estado vinculado a un alto número de células y/o esporas en el alimento (igual o mayor de 6 log CFU por g) (International Dairy Federation, 2016).

El grupo *B. cereus* es responsable de dos enfermedades gastrointestinales transmitidas por los alimentos: el síndrome emético, causado por la ingestión de toxinas

preformadas en el alimento, las cuales son termoestables a 126°C por 90 minutos; y el síndrome diarréico, causada por la ingestión de células que posteriormente al llegar a intestino delgado pueden producir tres tipos de toxinas: HBL, Nhe y/o CYTK. Estas tres últimas toxinas son termolábiles y son producidas al ingerir grandes cantidades de células o esporas (Drobniewski, 1993).

Las esporas del grupo *B. cereus*, son resistentes a las altas temperaturas y a los desinfectantes; estos permiten, que puedan colonizar los equipos de procesos y sobrevivir al tratamiento de UHT (Vidal et al., 2016). La adherencia de las bacterias en las tuberías y superficies de las plantas lecheras, pueden resultar en la formación de biopelículas, lo cual, puede inducir a una importante contaminación recurrente (Kumari y Sarkar, 2016). Se ha reportado la presencia del grupo *Bacillus cereus* en la leche pasteurizada, en la leche UHT, en la leche en polvo y otros productos lácteos (Lesley et al., 2017). Este grupo de bacterias producen lipasas y proteasas que deterioran, y reducen el tiempo de vida útil de la leche UHT (Montanhini y Bersot, 2013; Samarzija et al., 2012).

2.9.3 Gelificación y daños por proteasas y lipasas en leche UHT

La gelificación de la leche UHT es uno de las mayores preocupaciones en las plantas procesadoras de leches, ya que disminuye el largo de vida útil lo cual afecta el mercado potencial. Solo la presencia de algunas trazas de proteasas bacteriana, son suficiente para

causar coagulación en la leche. Richardson & Newstead, (1979) realizaron un estudio, donde determinaron que leche UHT con 1 ng de proteasas bacteriana, puede tener un largo de vida útil de tan solo 5 meses.

Las causas para que ocurra la gelificación de la leche son: por proteólisis de la caseína por las proteasas nativas de la leche, por la acción de metaloproteasas bacterianas o por ambas (Datta y Deeth, 2003). Las proteasas y lipasas nativas de la leche, a excepción de la plasmina, son inactivadas por el tratamiento térmico. Sin embargo, algunas proteasas y lipasas provenientes de bacterias como: *Pseudomonas spp.* y del grupo *Bacillus cereus*, son termoestables o contaminantes luego del proceso de la esterilización, que afecta a la leche aún después de ser tratada (Parkash et al., 2007).

La proteólisis de leche UHT, empieza por el desarrollo de malos sabores, aumentando la viscosidad con la eventual formación de un gel o un coágulo insoluble. Este cambio es causado, o al menos acelerado por la hidrólisis de la caseína (Datta & Deeth, 2003). Tanto la plasmina, una proteasa endógena, o proteasas bacterianas, pueden acelerar el tiempo de gelificación. Las proteasas bacterianas, hidrolizan los extremos carboxílicos de la k-caseína causando desestabilización de la micela y su posterior agregación. Sin embargo a diferencia de la renina, las proteasas bacterianas continúan hidrolizando la α 1 y la β -caseína, lo que causa una destrucción del sistema coloidal. Una manifestación evidente de la destrucción del sistema coloidal, es la coagulación y el desarrollo de un intenso sabor amargo en el producto (Muir, 1996).

El gel que se forma en la leche UHT es un producto tridimensional formado por la caseína y las proteínas del suero. Esto se debe particularmente a la β -lactoglobulina, que interactúa con la k-caseína durante el tratamiento térmico, formando el complejo lactoglobulina-k-caseína o el complejo bk (Datta & Deeth, 2003). Por otro lado, las enzimas lipolíticas causan rancidez en la leche debido a la hidrólisis de los ácidos grasos. Esta reacción libera grandes cantidades de ácidos grasos de cadena corta que causan un sabor amargo antes de llegar al largo de vida útil estipulado (Vithanage et al., 2016).

2.9.4 Prueba de alcohol

La leche cruda tiene que pasar por tratamientos térmicos para elevar su inocuidad y su tiempo de vida útil. Sin embargo, no todas las leches crudas pueden ser sometidas a tratamientos de: pasteurización o esterilización. La prueba de alcohol es una de las pruebas más utilizadas para determinar si la leche podría soportar y permanecer estable a los tratamientos térmicos (Rodríguez, 2012). Esta prueba es aplicada en las plantas procesadoras, durante la recepción de la leche para evitar que formen coágulos; esto se determina mediante la observación de una gelificación visible.

La prueba de alcohol puede resultar positivo, debido a dos factores: en primer lugar los factores proteolíticos y en segundo lugar los factores fisicoquímicos. Los factores proteolíticos se relacionan principalmente al crecimiento bacteriano. Mientras que en los factores fisicoquímicos se encuentran: la raza, la alimentación de las vacas, la

composición de la leche, el equilibrio mineral, el estrés calórico y el tratamiento térmico. Debido a este segundo factor, la prueba de alcohol puede resultar positiva sin estar ácida (Barchiesi-Ferrari, 2007).

2.9.5 Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real

La reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RT-PCR, por sus siglas en inglés), es una técnica que se ha convertido en uno de los métodos más importantes de la biología molecular moderna. La RT-PCR es una forma avanzada de la reacción de la polimerasa que maximiza el potencial de detección de una muestra a estudiar. Utilizando RT-PCR y secuencias específicas dentro de una plantilla de ADN o ADNc, se puede copiar, o "amplificar", por miles a un millón de veces utilizando; oligonucleótidos o cebadores específicos y ADN polimerasa. En la PCR tradicional (punto final), la detección o cuantificación de las secuencias amplificadas, se realizan al finalizar las reacciones, y envuelve análisis como: la electroforesis y análisis de imágenes. En PCR en tiempo real, el producto es medido en cada ciclo de la reacción durante la fase de replicación. El usuario puede determinar la cantidad inicial de la muestra con una gran precisión (Tamay et al., 2013). Hay tres pasos principales que componen cada ciclo en una reacción de PCR en tiempo real: desnaturalización, hibridación y extensión.

Desnaturalización: Se utiliza la incubación a alta temperatura para "separar" el ADN de doble cadena en cadenas simples y forjar la estructura secundaria en el ADN a una sola hebra. La temperatura que normalmente se usa en esta etapa es de 95 °C durante 20-30 segundos. Sin embargo, el tiempo de desnaturalización se puede aumentar, si la

cadena de ADN tiene un alto contenido de Guanina y Citosina. Además, también depende del modelo del termociclador, esto debido a la velocidad que tiene cada equipo para aumentar la temperatura.

Hibridación: En esta etapa los primers se alinean con la hebra singular de ADN que se separó en la etapa de desnaturalización, y se forma el complejo ADN-primers. La temperatura óptima de la hibridación oscila entre 50-60°C.

Extensión: En esta etapa la Taq polimerasa actúa sobre el complejo ADN-primer y empieza a catalizar la reacción a una alta velocidad. Mientras que la Taq polimerasa va actuando, las bases nitrogenadas complementarias (dNTP) se van agregando para crear la doble cadena de ADN con dirección que va de 5' a 3'. La temperatura óptima de la etapa de hibridación es aproximadamente de 72 °C. Al finalizar esta etapa, se van a formar los amplicones del tamaño dictado por la cantidad de pares de bases (pb), la cual debe ser conocido por el investigador. El monitoreo de los productos amplificados durante la reacción, es un paso muy importante en la PCR en tiempo real, para ello se utilizan reporteros fluorescentes. Estos reporteros fluorescentes pueden ser clasificados de dos tipos: específicos y no específicos.

Reporteros no específicos: Estos métodos se basan en el uso moléculas intercalantes que tienen afinidad por cualquier estructura de ADN de doble cadena, y que al oxidarse emiten una señal fluorescente. La señal fluorescente es emitida y capturada durante la etapa de extensión de cada ciclo, mientras más copia de ADN es producida, más

fluorescencia será emitida. El reportero fluorescente más utilizado no específico es el SYBR Green. La molécula de SYBR Green, cuando está en solución sin unirse al ADN de doble cadena, se encuentra prácticamente sin fluorescencia. Sin embargo, cuando se une con la molécula de ADN de doble cadena, puede aumentar hasta 1,000 veces su fluorescencia.

A pesar de su bajo costo, presenta varias desventajas que son importantes considerar; la principal desventaja, es que la molécula de SYBR Green puede unirse a cualquier molécula de ADN de doble cadena, incluyendo dímeros de primer. Al unirse a cualquier molécula de ADN de doble cadena, no discrimina entre productos específicos y no específico, lo cual puede dar resultados falsos positivos (Tamay et al., 2013).

Para evitar los falsos positivos e inconvenientes al momento de interpretar los resultados, se optimizan las reacciones realizando una curva de calibración. Esta consiste en evaluar si se formó un producto único o si se debe a la presencia de dímeros de primers.

Reporteros específicos: A diferencia de los reporteros no específicos, este método consiste en la transferencia de energía del reportero a un receptor. Existen dos métodos específicos: de hidrólisis y por hibridación. Los primeros, son las sondas comerciales TaqMan, lo cual se basan en una sonda fluorescente de oligonucleótidos etiquetado con un reportero (Tamay et al., 2013). Cada reacción de hidrólisis contiene un par de primers,

una sonda TaqMan con un tinte FAM o VIC en el extremo 5', un ligante menor y un "quencher" no fluorescente en el extremo 3'. Una vez la sonda hibrida en la cadena de ADN, ocurren cambios en la estructura del reportero y el quencher, lo que permite que la actividad de la exonucleasa de la Taq polimerasa rompa esa unión. Una vez, se ha roto esa unión, la fluorescencia por el reportero será emitida y capturada por el equipo (Tamay et al., 2013).

2.10 MÉTODOS DE DETECCIÓN

La determinación del tipo del microorganismo y en qué cantidad se encuentra en el alimento, resulta crucial para obtener un alimento inocuo y de buena calidad. Los métodos convencionales para la detección microbiológica en alimentos, resultan ser muy lentos y trabajosos. Por lo cual, se ha venido desarrollando los métodos rápidos. Los métodos rápidos fueron diseñados para la detección, caracterización, subtipificación y recuento de microorganismos (patógenos y de deterioro) mediante los cuales se obtienen resultados de manera fiable, sencilla y en menor tiempo que cuando se utilizan los métodos convencionales (Leotta, 2009).

A partir de la década de los años 70, empieza la evolución y desarrollo de los métodos rápidos para la identificación de microorganismos; en particular, el uso de galerías de pruebas bioquímicas miniaturizadas. Para el año 2000, comenzó el desarrollo de biosensores, biochips, microarrays y el crecimiento exponencial de los métodos

rápidos. Esta nueva tecnología fue aplicada a la microbiología de los alimentos, con el objetivo de tener resultados rápidos, en tiempo real, exactos y de bajo costo. Por ejemplo, el estudio de genotipos bacterianos pasó de ser un proceso tedioso y lento a un método práctico que se puede aplicar en los ensayos microbiológicos del día a día (Leotta, 2009; Sorribes, 2008).

Como se ha observado, las pruebas para detectar bacterias por métodos convencionales son muy importantes, pero a la vez son procedimientos largos, que requieren días para obtener resultados. En la industria de los alimentos, las decisiones requieren ser tomadas lo antes posible para evitar pérdida del producto (Leotta, 2009). Debido a esto, se recurre a métodos rápidos y específicos de detección, que nos brindarán resultados dentro del tiempo esperado y así poder efectuar los pasos correspondientes.

2.10.1 Prueba de termoestabilidad o prueba de alcohol

La prueba de alcohol o alcohol étílico, consiste en mezclar en partes iguales de leche y alcohol al 68% y al 72% en una placa de Petri y observar si existe aglutinación con movimientos circulares. Si existe aglutinación al enfrentarlo con el alcohol al 72% significa que la leche no es estable para UHT, si no presenta aglutinación con el alcohol al 68% esta puede ser utilizada en la pasteurización o darle otros usos como la elaboración de quesos (Galván, 2005).

2.10.2 Aislamiento de *Pseudomonas spp.* y grupo *Bacillus cereus*

- **Pseudomonas (CFC) Selectavial**

Es un medio de cultivo sólido compuesto por cefalotina, ácido fusídico, ceftrixima y suplemento CFC para el aislamiento selectivo de *Pseudomonas spp.* de muestras alimentarias y ambientales. Una vez sembrada la muestra en este medio, cualquier crecimiento sobre este medio indicará la posible presencia de *Pseudomonas spp.* Pseudomonas (CFC) Selectavial se incuba por 48 horas a una temperatura de 25-30°C (Hardly Diagnostics, 1996).

- **Agar selectivo *Bacillus cereus***

Es un medio de cultivo utilizado para el aislamiento presuntivo de *B. cereus* en alimentos. También es conocido por sus siglas en inglés como medio PEMBA (Polymyxin Pyruvate Egg Yolk Mannitol Bromothymol). El aislamiento selectivo de *B. cereus* se logra inhibiendo el desarrollo de la flora acompañante al agregar un suplemento para *B. cereus*, con el que se obtiene una concentración de 100 U de Polimixina B /mL del medio (Britania, 2017).

Bacillus cereus produce lecitinasa, que degrada la lecitina que contiene la suspensión de yema de huevo. La lecitina hidrolizada da un precipitado blanco alrededor de las colonias de *B. cereus*. Luego de incubar a 32°C por 48 horas, las colonias de *B. cereus* son ásperas, rugosas y secas, con un color que va de rosado a púrpura rodeado por

un anillo de blanco de un denso precipitado. Las colonias rodeadas por una zona amarilla o clara, no son *B. cereus* (Sigma Aldrich, 2013).

3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1.1 Toma de muestra y análisis microbiológico

Se recolectaron un total de 16 muestras de leche: 8 muestras de leche cruda y 8 muestras de leche procesada por UHT de una planta procesadora de Puerto Rico. Las muestras de leche cruda fueron tomadas en envases de Whirl-Pak estéril y las muestras de leche UHT en cajas de 32 oz (946ml). Una vez debidamente rotuladas, fueron almacenadas a 4°C y posteriormente enviadas al Laboratorio de Microbiología de Alimentos (CTA-219), en donde se procesó la muestra inmediatamente. El tiempo de transporte tardó aproximadamente dos horas y media. Las muestras se tomaron en dos etapas de un mismo lote:

- Antes del tratamiento UHT (AT)
- Después del tratamiento UHT (DT)

Como se muestra en la Figura 2, las muestras tomadas AT se les realizó la prueba de alcohol, modificando el protocolo de Galván (2005). La leche AT fue sometida a distintas concentraciones de alcohol: 70%, 75%, 80% y 85%. La leche fue observada en busca de

aglutinación. Una vez se obtuvieron los resultados de la prueba de alcohol, se procedió a preparar las diluciones correspondientes para la inoculación en placas Petri. Se prepararon diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-7} y se inocularon por duplicado en agar Pseudomonas CFC Selectavial siguiendo las especificaciones del fabricante (Hardly Diagnostics, 1996).

La inoculación fue realizada por el método de vertido en placa y se incubaron a una temperatura de 25-30°C por 48 horas. Para la siembra de leche AT en Agar Selectivo para *Bacillus cereus*, se realizó el método de vertido en placa de diluciones seriadas de 10^{-1} hasta 10^{-7} por duplicado. Luego se incubaron a 32°C por 48 horas, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Sigma Aldrich, 2013).

Para el conteo de bacterias psicrotróficas totales se utilizó el método de vertido en placa utilizando el medio de cultivo Standard Plate Count (SPC, por sus siglas en inglés), y se incubó a 7°C por 10 días. Para obtener la cantidad de otras bacterias psicrotróficas, se utilizó la siguiente fórmula: $O = T - (B + P)$. Donde **O** significa otras bacterias psicrotróficas, **T** bacterias psicrotróficas totales, **B** grupo *Bacillus cereus* y **P** para *Pseudomonas spp.*

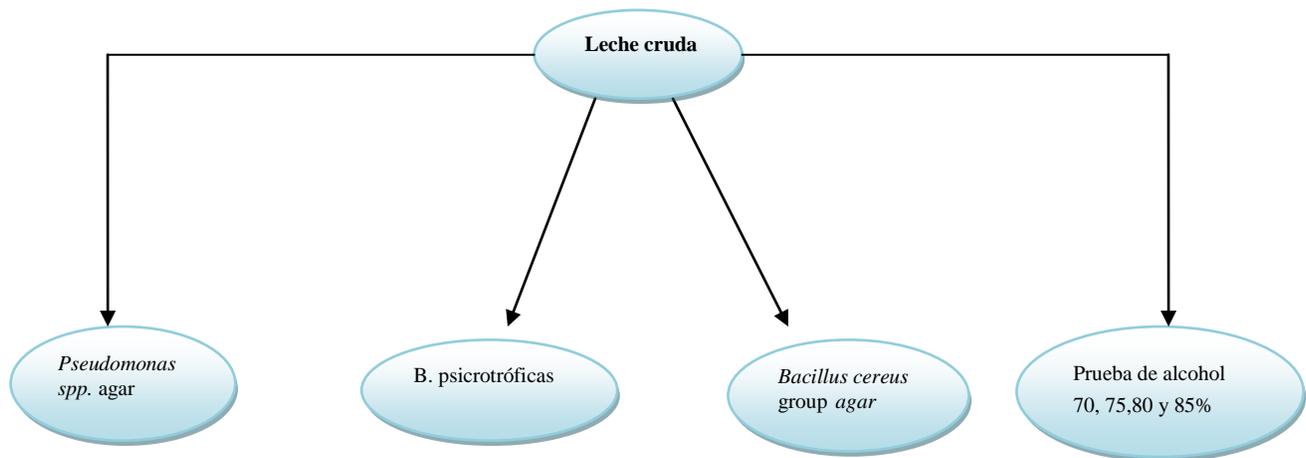


Figura 2. Metodología del proceso para la leche cruda.

Para realizar el análisis microbiológico de las muestras DT, se utilizó el método recomendado por Lesley et al., (2017), el cual se muestra en la Figura 3. Se recolectaron 8 cajas de leche de 32 oz (946mL) por cada lote. Inmediatamente después del procesamiento UHT de la leche, se tomó 10mL de leche, se inoculó en 90ml de Tryptic Soy Broth (TSB, por sus siglas en inglés) y se incubó a 37°C por 24 horas. Cada muestra de leche fue procesada por duplicado para luego continuar con los análisis microbiológicos y PCR en tiempo real.

Una vez terminado el tiempo de incubación, se tomó 0.1 mL del cultivo y se inoculó en: Agar Selectivo para *B. cereus*, Pseudomonas CFC Selectavial y en SPC agar. Para confirmar el tipo de microorganismo presente en cualquiera de los medios de cultivos que mostró crecimiento, se les realizó PCR en tiempo. En las muestras donde no hubo

crecimiento, se repitió el procedimiento a los 30, 90 y 120 días para asegurar la ausencia de microorganismos.

3.1.2 Cepas de bacterias y primers

Las cepas de bacterias utilizadas como controles y la preparación de la curva de calibración fueron: *Bacillus cereus* ATCC 14579 y *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525. Las bacterias fueron obtenidas a través de la compañía “VWR Advanced Instruments”. Los primers utilizados para grupo *Bacillus cereus* y *Pseudomonas spp.*, se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1. Primers utilizados durante la reacción de PCR en tiempo real.

Bacterias	Primer	Gen	Secuencias (5'-3')	Tamaño del amplicón(pb)	Referencias
<i>Grupo B.cereus</i>	Forward	pc-plc	GGA TTC ATG GAG CGG CAG TA	144	(Martínez et al., 2009)
	Reverse		GCT TAC CTG TCA TTG GTG TAA CTCA		
<i>Pseudomonas spp.</i>	Forward	CarA	TTT CAG GTA RTC GGA CAG	165	(Zhang, 2012)
	Reverse		CAR CAR ATC GTT ACC CTG ACT T		

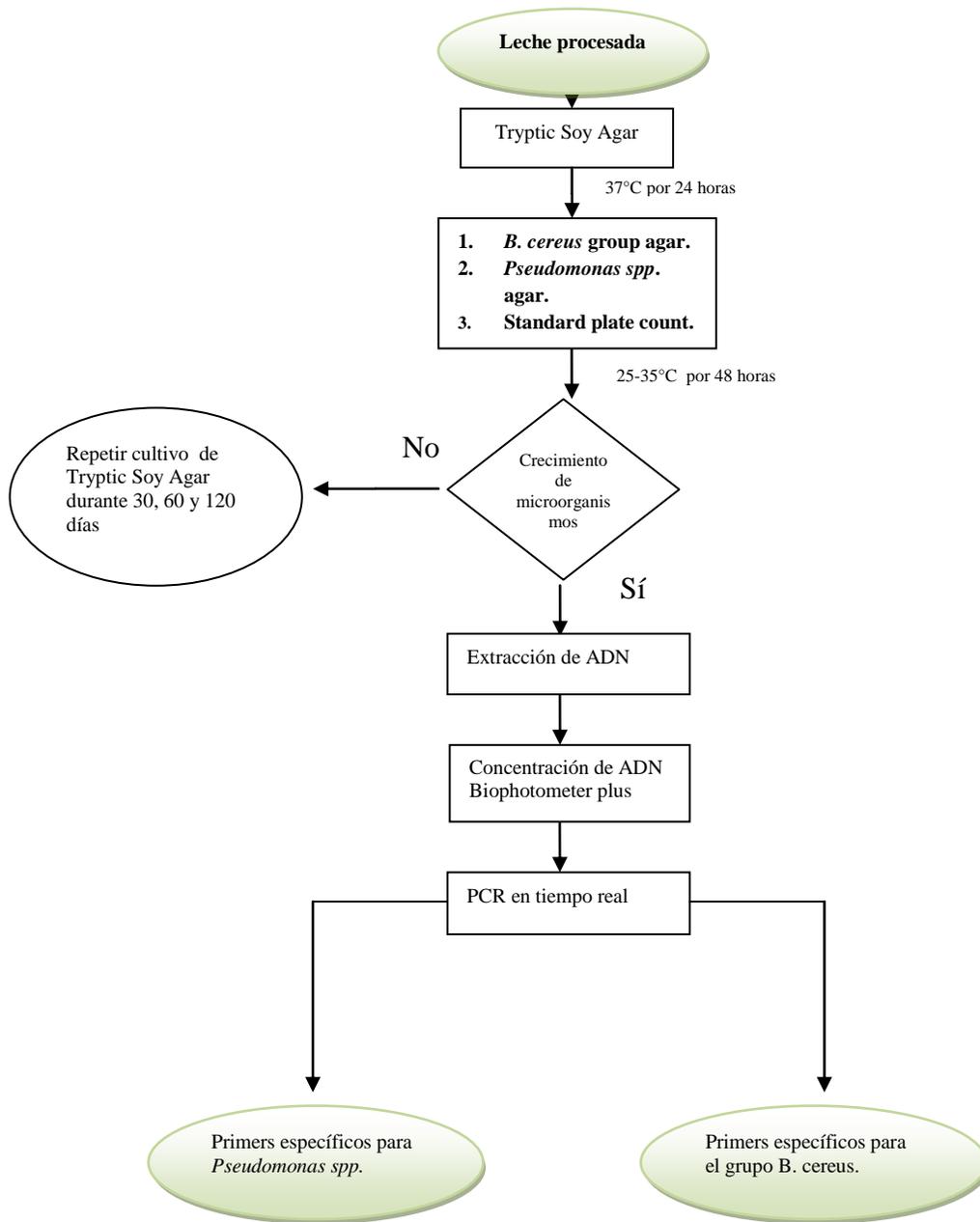


Figura 3. Metodología del proceso para la leche procesada por UHT.

3.1.3 Extracción de ADN.

La extracción del ADN se llevó a cabo utilizando el kit comercial “DNeasy PowerFood Microbial Kit” (Qiagen, 2017), siguiendo el protocolo del fabricante que se describe a continuación. En un tubo eppendorf de 2ml, se agregó 1.8ml de cultivo microbiano y se centrifugó a 13.000 x g durante 1 min a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y nuevamente se volvió a centrifugar a 13.000 x g durante 1 min. Se retiró completamente el sobrenadante restante con una pipeta, y se resuspendió el sedimento celular en 450 µl de solución MBL, un reactivo de lisis fuerte. Luego se transfirieron las células resuspendidas a un tubo PowerBead y se llevo al vortex durante 10 minutos a velocidad máxima.

Después, los tubos se centrifugaron a una velocidad máxima de 13,000 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente. A continuación se transfirió el sobrenadante a un tubo de recolección limpio de 2 ml, se le añadió 100µl de solución IRS, el cual elimina el material orgánico e inorgánico que no contiene ADN, incluyendo los residuos celulares y las proteínas. Se mezcló brevemente y se incubó a una temperatura de 2–8 °C durante 5 min. Después de la incubación, se centrifugaron los tubos a 13,000 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente, y evitando el sedimento, se transfirió todo el volumen del sobrenadante a un tubo de 2 ml.

Luego a cada tubo se le agregó 900µl de solución MR, esta solución permite ajustar la concentración de sal de la solución de ADN. Posteriormente se mezcló en el vórtex. Por último, se tomó 650µl del sobrenadante, se depositó en un tubo de columna giratoria MB. La columna giratoria MB, permite que el ácido ADN se una a la fase sólida de la sílice impregnada en el mismo tubo. Seguidamente se centrifugó a 13,000 x g por 1 minuto. Se repitió el procedimiento hasta haber descargado todo el sobrenadante al tubo de columna MB.

Se removió la columna MB Spin a un tubo de recolección limpio de 2 ml, luego se añadió 650µl de solución PW y se centrifugó a 13.000 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente. La solución PW, es una solución de lavado a base de alcohol que se utiliza para limpiar aún más el ADN que está unido a la membrana del filtro de sílice de la columna MB. Después, se descartó el sedimento, se le añadió 650µl de etanol y se centrifugó dos veces: la primera vez a 13,000 x g por 1 minuto y la segunda vez a 13,000 x g por 2 minutos.

Se cambió nuevamente la columna MB Spin a un tubo de recolección limpio de 2 ml. Por último, se le añadió 100µl de solución EB en el centro de la membrana del filtro blanco y se centrifugó a 13,000 x g por 1 min. LA solución EB, asegura de que toda la membrana esté húmeda, esto proporciona que el ADN que esté unido a la columna MB pueda ser liberado y pueda ser recogido en el tubo de recolección. De no procesarse la muestra inmediatamente, se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

3.1.4 Procedimiento con SYBR Green.

Se procesaron cuarenta muestras; veinte de *Bacillus cereus* ATCC 14579 y veinte para *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525. Para evaluar el uso de SYBR Green en el PCR en tiempo real, se utilizó el protocolo modificado recomendado por Duque et al., (2017) y Wolk et al., (2012). La concentración de los primer para *B. cereus* y *Pseudomonas spp.* fue de 0.3 μM , 5 μl de muestra de ADN, 10 μl de SYBR y se completó con agua molecular hasta un volumen final de 25 μl .

La amplificación fue realizada según las instrucciones del fabricante del SYBR Green (Sigma Aldrich, 2007). El protocolo de calentamiento incluyó: un ciclo de desnaturalización a 95 °C por 2 min, 25 ciclos a 95 °C por 15 seg, seguido de alineamiento a 55 °C por 15 seg. y finalmente una etapa de extensión de 60 °C por 60 seg.; para *B. cereus* se utilizaron 30 ciclos. El PCR en tiempo real, fue realizado en el equipo Eppendorf Mastercycler Realplex y se utilizó las instrucciones recomendadas por el equipo para la curva de disociación.

3.1.5 Sensibilidad y especificidad del PCR en tiempo real

Para comprobar la especificidad de los primers de *Pseudomonas spp.* y del grupo *B. cereus*, los primers fueron confirmados utilizando el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, por sus siglas en inglés) e In Silico PCR (Bikandi et al., 2015; Sayers, 2016). Los primers no reconocen otro segmento que sea distinto a la secuencia

objetivo. Se realizaron dos pruebas de calibración: una para *Pseudomonas spp.* y otra para el grupo *B. cereus*, utilizando concentraciones conocidas de ADN: 0.8 ng, 4 ng, 20 ng y 100 ng. A todos los productos de amplificación de PCR, se les realizó electroforesis de ADN para confirmar los productos amplificados. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5% y se les aplicó un voltaje de 100 V por 30 minutos.

Para comprobar la sensibilidad del método, se realizaron 5 repeticiones (n=5) de cada concentración de ADN, para un total de N=20 por cada bacteria. Una vez obtenido los resultados se procedió a realizar el cálculo para determinar la sensibilidad del método. La sensibilidad es la capacidad de detectar la tasa o proporción de verdaderos positivos y está dada por la fórmula: $\frac{\text{Resultados Positivos}}{\text{Número total de muestras}} \times 100$.

Para comprobar la especificidad de los primers, luego de comprobar con BLAST e In Silico, se realizó un intercambio entre primers y bacterias para observar si hubo alguna amplificación no deseada. Se utilizaron primer específicos para el grupo *B. cereus* con muestras de *Pseudomonas spp.* y primers específicos de *Pseudomonas spp.* con muestras de *B. cereus*.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.1 Sensibilidad, límite de detección y especificidad de los primers:

Para comprobar la sensibilidad del método, se procesaron 20 muestras control positivo de diferentes concentraciones y una muestra control negativo. Como se muestra en la tabla 2, los primers presentaron una sensibilidad al 100%, lo que hace que su uso en la identificación del grupo *B. cereus* y *Pseudomonas spp.* sea confiable. El límite de detección establecido fue de 0.8ng/μl hasta 100ng/μl según muestra la tabla número 2. Los controles positivos dentro del rango seleccionado del límite de detección, resultaron positivos, indicando resultados confiables que se encuentren dentro de los límites de detección. La Figura 4 y 5, muestra los fragmentos amplificados de controles utilizados para la PCR en tiempo real, mediante la electroforesis de ADN en gel de agarosa.

Tabla 2. Prueba de sensibilidad, según las recomendaciones de Duque et al., (2017) y Wolk et al., (2012).

ADN ng/ μl	Resultados (1)	Resultados (2)	Resultados (3)	Resultados (4)	Resultados (5)
0.8	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
4.0	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
20	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
100	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Control	Negativo y positivo				

Al verificar la especificidad de los primers con los programas BLAST e In Silico, se observó que los primers son específicos y confiables para ser utilizado en la identificación del grupo *B. cereus* y *Pseudomonas spp.* Luego, para validar la especificidad en el laboratorio, se mezclaron colonias del grupo *B. cereus*, *Pseudomonas spp* y primers diferentes. Se observó que los primers no reconocen otro segmento que sea distinto a la secuencia objetivo. Estos resultados muestran la confiabilidad de los primers, y su uso para la PCR cualitativa en tiempo real.

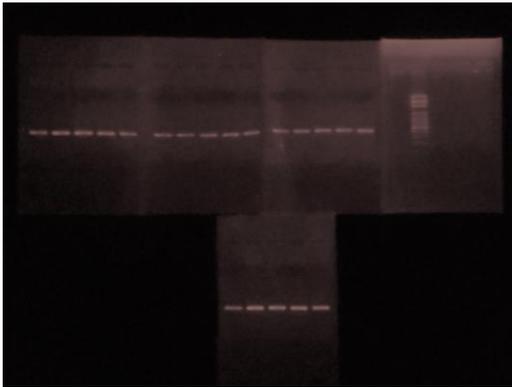


Figura 4. Electroforesis de ADN de *Pseudomonas spp*, 165pb.

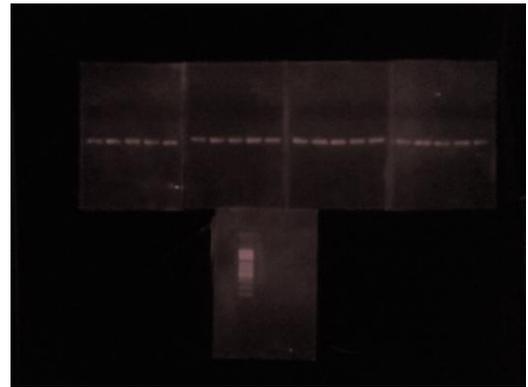


Figura 5. Electroforesis de ADN del grupo *B. cereus*, 144pb.

4.1.2 Resultados de los muestreos de leche cruda y leche procesada por UHT

Se tomaron 16 muestras, de las cuales 8 eran de leche cruda, y 8 de leche post-proceso UHT. La tabla 3 muestra los resultados de la leche cruda y leche procesada por UHT. Como se puede observar en dicha tabla, en el 25% de las muestras tomadas de leche cruda, las bacterias psicrotóficas resultaron por encima de 8×10^6 CFU/ml. Según Law et al., (1977), las leches crudas que se encuentran por encima de 8×10^6 CFU/ml de

bacterias psicrotróficas, tendrán un largo de vida útil por debajo de 145 días, luego de ser procesada por UHT. De los dos grupo de bacterias investigadas, *Pseudomonas spp.* se encontró en más cantidad que el grupo *B. cereus*, lo que concuerda con diferentes investigaciones en la que *Pseudomonas spp.* es el grupo de bacteria psicrotróficas más predominante de la leche cruda (Datta & Deeth, 2001; Datta & Deeth, 2003; Ercolini et al., 2007; Machado et al., 2017; Montanhini & Bersot, 2013; Samarzija et al., 2012; Torres, 2013; Zhang, 2012). Para observar si existe una correlación lineal entre las variables de esta investigación, se realizó un análisis estadístico de regresión lineal (Ver Anexos).

En la actualidad algunas plantas lecheras, continúan interpretando la prueba de alcohol como un indicador del nivel de contaminación bacteriana y termoestabilidad. Sin embargo, como nos muestran las Figuras 6, 7 y el p-valor (Ver Anexos) en los resultados de esta investigación, no se encontró correlación lineal entre las bacterias psicrotróficas, *Pseudomonas spp.* y la prueba de alcohol. Esto es debido a que las bacterias psicrotróficas totales no producen un aumento considerable del pH y por tanto, no afecta significativamente la prueba de alcohol (Johnston & Bruce, 1982). No se evidenció la presencia de *Pseudomonas spp.* en ningunas de las muestras de recolectadas de leche procesada por UHT.

La prueba de alcohol es una prueba que se realiza para observar la termoestabilidad de la leche, cuando va a ser sometida a altas temperatura, como es el tratamiento UHT. Sin embargo, en un estudio realizado por Molina et al., (2001), en el cual se tomaron 96 muestras de 11 vaquerías para estudiar la correlación existente entre la prueba de alcohol y la termoestabilidad de la leche. No encontraron diferencias significativas entre la termoestabilidad y la prueba de alcohol, lo que indica que antes de asumir que la leche no es apta para procesar se deben realizar otros análisis de laboratorio.

Tabla 3. Resultados microbiológicos de bacterias en leche cruda, en leche UHT y resultados de la prueba de alcohol

Muestras	<i>Pseudomonas spp.</i> (ufc)	<i>Grupo B. cereus</i> (ufc)	Otras (ufc)	Psicrótróficas totales. (ufc)	Alcohol positivo (%)	UHT
1	1.9x10 ⁴	7.0x10 ³	1.4x10 ⁵	1.7x10 ⁵	75	<i>B. cereus</i>
2	1.4x10 ⁵	5.0x10 ⁴	1.0x10 ⁶	1.2x10 ⁶	70	<i>B. cereus</i>
3	1.4x10 ⁷	5.0x10 ⁵	1.1x10 ⁸	1.3x10 ⁸	75	<i>B. cereus</i>
4	2.4x10 ⁷	9.5x10 ⁵	1.9x10 ⁸	2.2x10 ⁸	70	<i>B. cereus</i>
5	1.0x10 ⁴	1.0x10 ⁴	7.2x10 ⁴	9.3x10 ⁴	85	<i>B. cereus</i>
6	2.0x10 ⁵	6.5x10 ²	1.4x10 ⁶	1.6x10 ⁶	85	Negativo
7	7.9x10 ⁵	3.5x10 ³	1.5x10 ⁶	2.3x10 ⁶	85	Negativo
8	1.0x10 ⁵	1.6x10 ⁴	2.1x10 ⁵	3.3x10 ⁵	85	Negativo

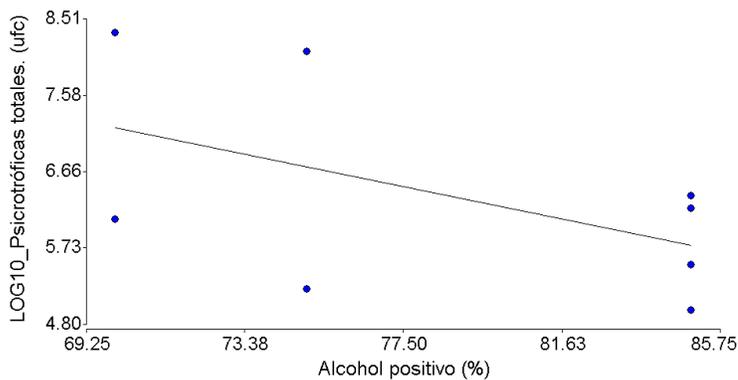


Figura 6. Gráfica de regresión lineal de bacterias psicrótróficas y la prueba de alcohol.

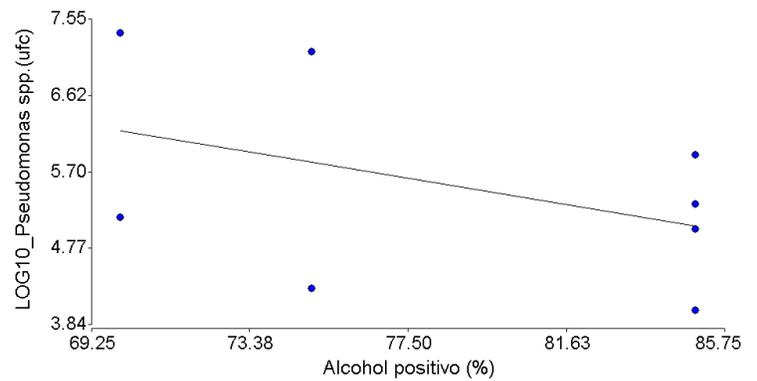


Figura 7. Gráfica de regresión lineal de *Pseudomonas spp.* y la prueba de alcohol

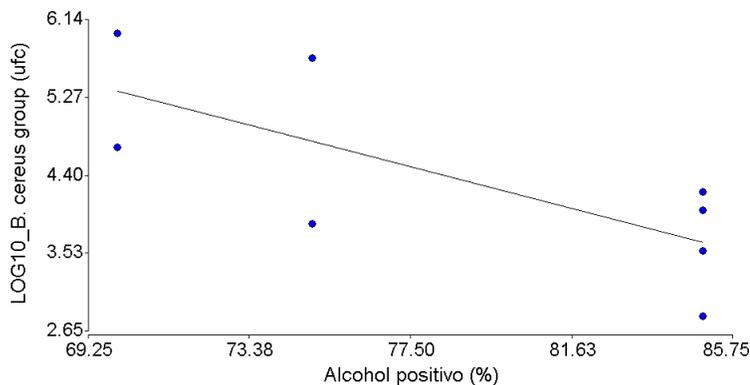


Figura 8. Gráfica de regresión lineal del grupo *B. cereus* y la prueba de alcohol

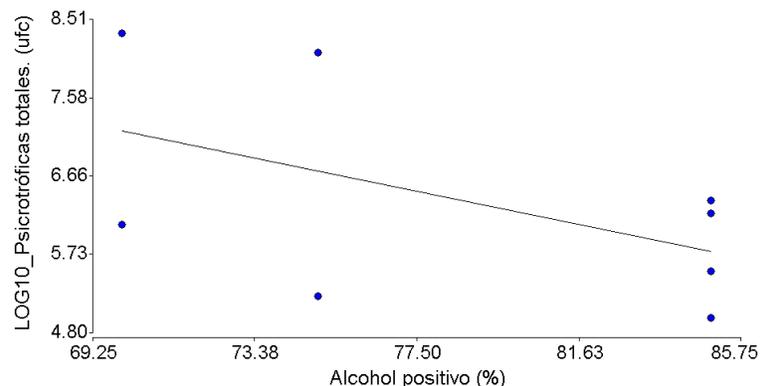


Figura 9. Gráfica de regresión lineal de Otras bacterias psicrotróficas y la prueba de alcohol

4.1.3 Grupo *Bacillus cereus* y Otras bacterias

Se realizó un análisis de regresión lineal entre el grupo *B. cereus*, otras bacterias y la prueba de alcohol. Como se muestra en la figura 9 y en el p-valor (Ver Anexos) no se encontró correlación línea entre otras bacterias y la prueba de alcohol. Lo que coincide con otras investigaciones, en las que las bacterias psicrotróficas no aumentan de manera significativa el pH de la leche, esto da como resultado una prueba de alcohol negativa a los valores predeterminados por la planta lechera (Johnston & Bruce, 1982). Por otro lado, como muestra la Figura 8 y el p-valor (Ver Anexos) el análisis de regresión lineal entre el grupo *Bacillus cereus* y la prueba de alcohol, mostró una relación significativa. Es decir, que a mayor cantidad de bacterias del grupo *B. cereus*, menor concentración de alcohol se va a necesitar para coagular la leche.

En las muestras analizadas post-proceso UHT en busca de bacterias, se encontró que el 63% de las muestras tomadas contenían bacterias del grupo *B. cereus*. Estos valores también coinciden con la concentración inicial del grupo *B. cereus* encontradas al momento de procesar la leche en la planta, de manera que, la concentración inicial del grupo *B. cereus* está directamente relacionada con la incidencia en la leche UHT, según la prueba T para muestras independientes realizada (Ver Anexos).

De modo similar, en otra investigación realizada por Lesley et al., (2017), se encontró que en el 30% (6/20) de las muestras UHT analizadas y en el 41.7% (5/12) de leche en polvo, el grupo *B. cereus* estuvo presente. De igual manera, se realizó una investigación en Brasil, para identificar la presencia de *B. cereus* en muestras de leche procesada por UHT a una temperatura de 150°C por 4 segundos. Los resultados mostraron que el 13.8% de las leches UHT contenían *B. cereus*, de las cuales el 42.6%, resultaron positivas a la prueba de enterotoxina BCET-RPLA kit (Vidal et al., 2016). Aunque la mayoría de las investigaciones han demostrado que el grupo *B. cereus* y *Pseudomonas spp.* son el grupo de bacterias psicrotróficas más importantes, existen otras bacterias psicrotróficas que están presentes aunque no sea en cantidades importantes o no presentan un peligro significativo para las industrias.

Entre otras bacterias psicrótróficas están: *Microbacterium*, *Lactococcus*, *Acinetobacter* y *Hafnia* (Vithanage et al., 2016). Estas bacterias también producen proteasas y lipasas termoestables que sobreviven a una temperatura de 142°C por 4 segundos.

4.1.4 Conclusión

Las bacterias psicrótróficas son parte de la flora normal de la leche cruda, sin embargo controlar los niveles de estas bacterias resulta de gran importancia, especialmente para leche UHT. En esta investigación se pudo demostrar la presencia del grupo *Bacillus cereus* en leche tratada por UHT, por lo que este estudio podría servir para un llamado de alerta a las autoridades reguladoras a controlar la presencia de un microorganismo que puede producir toxinas durante el largo de vida útil del producto, lo que se convertiría en un peligro potencial para los consumidores.

Pseudomonas spp. no se pudo encontrar presente en leche UHT, no obstante, las muestras de leche cruda que iban ser procesadas, se encontraban con altos niveles de bacterias por encima de 8×10^6 CFU/ml. Las muestras que dieron alcohol positivo por debajo de los estándares establecidos por la planta, no presentaron ninguna correlación con la cantidad de bacterias psicrótróficas, *Pseudomonas spp* y otras bacterias, debido a que estas bacterias coagulan la leche sin acidificarla. Solo el recuento bacteriano del grupo *B. cereus* mostró correlación significativa con la prueba de alcohol y la incidencia del grupo *B. cereus* en la leche procesada por UHT.

4.1.5 Recomendaciones

- Poder realizar auditorías ocasionales a los proveedores, con el fin de monitorear la producción de la leche cruda, la implementación de las buenas prácticas agrícolas y las buenas prácticas de manufactura.
- Se recomienda recibir la leche cruda con recuentos de bacterias psicrotróficas totales menor o igual a 10^{-3} y no almacenar la leche por más de 3 días a 4 °C.
- Colocar un dispositivo electrónico en el tanque de transporte, que pueda monitorear la temperatura de la leche cruda en tiempo real.
- Realizar futuras investigaciones que determinen la concentración de las enzimas termoestables bacterianas antes y después del tratamiento UHT.
- Para futuras investigaciones con bacterias psicrotróficas de importancia en la leche UHT, se sugiere utilizar un mayor número de muestras representativas.
- Se recomienda realizar investigaciones para inactivar las enzimas procedentes de bacterias psicrotróficas a 55°C por 60 minutos. Este tratamiento puede ser efectuado antes o después del tratamiento UHT.

5 REFERENCIAS

- Barchiesi-Ferrari, C. G. (2007). Inestabilidad de la leche asociada a componentes I. *Pesquisa Agropecu*, 42(12), 1–8. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2007001200017>
- Bikandi, J., San Millán, R., Rementeria, A., & Garaizar, J. (2015). In silico analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR, and endonuclease restriction. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg491>
- Britania. (2017). *Bacillus cereus Selectivo Agar (según Mossel)* (No. B0216106). Argentina. Retrieved from http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a2818a041dc6.pdf
- Burton, H. (1988). *Ultra-High Temperature Processing of Milk And Milk Products* (first). New York: Elsevier Science Publishing Co., Inc. Retrieved from <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4615-2157-0#about>
- Bylund, G. (1995). *Dairy processing handbook*. (T. P. P. S. AB, Ed.). Sweden. Retrieved from https://books.google.com.pr/books/about/Dairy_processing_handbook.html?id=FgKloAEACAAJ&redir_esc=y
- Chavan, R. S., Chavan, S. R., Khedkar, C. D., & Jana, A. H. (2011). UHT milk processing and effect of plasmin activity on shelf life: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(5), 251–268. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00157.x>
- Chen, L., Coolbear, T., & Daniel, R. M. (2004). Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus* sp. isolated from milk powder production lines. *International Dairy Journal*, 14(6), 495–504. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.10.006>
- Datta, N., & Deeth, H. C. (2001). Age Gelation of UHT Milk—A Review. *Food and Bioproducts Processing*, 79(4), 197–210. <https://doi.org/10.1205/096030801753252261>
- Datta, N., & Deeth, H. C. (2003). Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. *LWT - Food Science and Technology*, 36(2), 173–182. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(02\)00214-1](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(02)00214-1)
- De Jonghe, V., Coorevits, A., Van Hoorde, K., Messens, W., Van Landschoot, A., De Vos, P., & Heyndrickx, M. (2011). Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(2), 460–470. <https://doi.org/10.1128/AEM.00521-10>
- Departamento de Agricultura de PR. (2014). *Informe Anual de la Oficina para la Reglamentación de la Industria Lechera*. Puerto Rico. Retrieved from <https://www.agricultura.pr/documentos>
- Drobniewski, F. (1993). *Bacillus cereus* and Related Species. *American Society for Microbiology*, 6(4), 324–338. Retrieved from <https://cmr.asm.org/content/cmr/6/4/324.full.pdf>
- Duque, C. M., Sánchez, D. M., Gómez, B., Carmona, J. A., Cifuentes, D., Gaviria, A. M.,

- & Hernández, O. (2017). Evaluación de una técnica de PCR en tiempo real para determinar colonización por *Streptococcus agalactiae* en mujeres gestantes de Medellín que consultan en Dinamica IPS. *Infection*, 22(1), 26–29. <https://doi.org/10.22354/in.v0i0.701>
- Ercolini, D., Russo, F., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G., & Villani, F. (2007). Simultaneous detection of *Pseudomonas fragi*, *P. lundensis*, and *P. putida* from meat by use of a multiplex PCR assay targeting the *carA* gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(7), 2354–2359. <https://doi.org/10.1128/AEM.02603-06>
- EU. Diario Oficial de la Unión Europea, 1 Diar § (2010). Europa: EUR-Lex. Retrieved from <http://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2010/605/2018-02-09>
- FDA. (2018). Code of Federal Regulations Title 21. Retrieved from <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=131.110>
- Fernández, R. (2018). “ Ruta de la Industria Lechera de Puerto Rico .” Retrieved from <http://www.bvirtual.ogp.pr.gov/ogp/Bvirtual/Pages/biblioteca.aspx>
- Fox, P., & Mcsweeney, P. (1998). *Dairy Chemistry and Biochemistry*. (T. Science, Ed.) (First edit). New York: Blackie Academic & Professional. Retrieved from [http://www.khuisf.ac.ir/prof/images/Uploaded_files/DairyChemistryAndBiochemistry_muyac\[4303183\].PDF](http://www.khuisf.ac.ir/prof/images/Uploaded_files/DairyChemistryAndBiochemistry_muyac[4303183].PDF)
- Galván, P. (2005). Proceso básico de la leche y el queso. *Revista Digital Universitaria*, 6(9), 1–17.
- Gedam, K., Prasad, R., & Vijay, V. K. (2007). The Study on UHT Processing of Milk : A Versatile Option for Rural Sector, 2(2), 49–53. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/e7e0/d5c0a536678d9ae2183688fc4950a0cf17b8.pdf>
- Gopal, N., Hill, C., Ross, P. R., Beresford, T. P., Fenelon, M. A., & Cotter, P. D. (2015). The prevalence and control of *Bacillus* and related spore-forming bacteria in the dairy industry. *Frontiers in Microbiology*, 6(DEC), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01418>
- Hammad, A. M. (2015). Spoilage potential of *Pseudomonas* spp. isolated from Domiati cheese. *Assiut Vet. Med. J.*, 61(147), 18–23.
- Hardly Diagnostics. (1996). *CRITERION Pseudomonas Isolation Agar Base for the isolation and cultivation of Pseudomonas spp.* (No. C6681). EEUU. Retrieved from https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/CRITN-PseudomonasIsolationAgarBase.html
- Henningsson, M., Östergren, K., & Dejmek, P. (2007). The Electrical Conductivity of Milk — The Effect of Dilution and Temperature. *International Journal of Food Properties*, 1(8), 15–22. <https://doi.org/10.1081/JFP-200048143>
- International Dairy Federation. (2016). *Bacillus cereus in Milk and Dairy Products*. Belgium. Retrieved from <https://www.fil-idf.org/?s=Bacillus+cereus+in+Milk+and+Dairy+Products>

- Johnston, D., & Bruce, J. (1982). Incidence of thermo-duric psychrotrophs in milk produced in West Scotland. *The Journal of Applied Bacteriology*, 52(3), 7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1982.tb05061.x>
- Kumari, S., & Sarkar, P. K. (2016). *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing environment. *Food Control*, 69, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.012>
- Lara, J., & Martínez, F. (2004). Boletín de economía. *Unidad de Investigaciones Económicas*, 7(2), 1–11. Retrieved from <http://economia.uprrp.edu/vol7num2.pdf>
- Law, B., Andrews, A., & Sharpe, E. (1977). Gelation of ultra-high-temperature-sterilized milk by proteinases from a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from raw milk. *Journal of Dairy Research*, 44(1), 145–148. Retrieved from <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-dairy-research/article/gelation-of-ultrahightemperaturesterilized-milk-by-proteases-from-a-strain-of-pseudomonas-fluorescens-isolated-from-raw-milk/BFF4AA5802BD608CDA094AD8F7EFE3B2>
- Leotta, G. A. (2009). Redalyc. Métodos rápidos: una herramienta útil y práctica para el análisis microbiológico de los alimentos. *Revista Argentina de Microbiología*, 41, 63–64. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/262748458_Metodos_rapidos_una_herramienta_util_y_practica_para_el_analisis_microbiologico_de_los_alimentos
- Lesley, M., Ernie, S., Kasing, A., & Son, R. (2017). Detection of *Bacillus cereus* in formula milk and ultra high temperature (UHT) treated milk products. *International Food Research Journal*, 24(3), 985–989.
- Lindmark, H. (2008). *Fatty acids in bovine milk fat* (Vol. 1). Lund. <https://doi.org/10.3402/fnr.v52i0.1821>
- Machado, S. G., Baglinière, F., Marchand, S., & Coillie, E. Van. (2017). The Biodiversity of the Microbiota Producing Heat-Resistant Enzymes Responsible for Spoilage in Processed Bovine Milk and Dairy Products, 8(March), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00302>
- Machado, S. G., da Silva, F. L., Bazzolli, D. M. S., Heyndrickx, M., Costa, P. M. de A., & Vanetti, M. C. D. (2015). *Pseudomonas* spp. and *Serratia liquefaciens* as Predominant Spoilers in Cold Raw Milk. *Journal of Food Science*, 80(8), M1842–M1849. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12957>
- Marchand, S., Heylen, K., Messens, W., Coudijzer, K., De Vos, P., Dewettinck, K., ... 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>
- Martínez-Blanch, J. F., Sánchez, G., Garay, E., & Aznar, R. (2009). Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of enterotoxigenic members of *Bacillus cereus* group in food samples. *International Journal of Food Microbiology*, 135(1), 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.013>
- Martins, M. L., Pinto, U. M., Riedel, K., & Vanetti, M. C. D. (2015). Milk-deteriorating

- exoenzymes from *Pseudomonas fluorescens* 041 isolated from refrigerated raw milk. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), 207–217. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246120130859>
- Molina, L., González, R., Brito, C., Carrillo, B., & Pinto, M. (2001). Correlacion entre la termoestabilidad y prueba de alcohol de la leche a nivel de un centro de acopio lechero. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 33(2), 1–10. Retrieved from https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2001000200012
- Montanhini, M. T. M., & Bersot, L. D. S. (2013). Evaluation of psychrotrophic behavior and lipolytic and proteolytic activity of *Bacillus cereus* isolated from refrigerated dairy products. *Acta Scientiarum. Technology*, 35(1), 163–167. <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v35i1.13752>
- Muir, D. (1996). The shelf-life of dairy products: 1. Factors influencing raw milk and fresh products. *International Journal of Dairy Technology*, 49(1), 24–32. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.1996.tb02616.x>
- Murphy, S., & Boor, K. (2000). Trouble-shooting sources and causes of high bacteria counts in raw milk. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, 20(8), 606–611. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20000405566>
- Nestel, P. J., Chronopulos, A., & Cehun, M. (2005). Dairy fat in cheese raises LDL cholesterol less than that in butter in mildly hypercholesterolaemic subjects, 1059–1063. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602211>
- Parkash, M., Rajasekar, K., Karmegam, N., Nadu, T., & Seeragapadi, P. (2007). Bacterial Population of Raw Milk and Their Proteolytic and Lipolytic Activities. *Agriculture and Biological Sciences*, 3(6), 848–851. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/228512531_Bacterial_population_of_raw_milk_and_their_proteolytic_and_lipolytic_activities
- Pineda, M. (2014). *Importancia de la leche y productos lácteos*. Universidad Nacional De San Agustín De Arequipa. Retrieved from http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/5948/IApipomm.pdf?sequence=1&isAllowed=y&fbclid=IwAR0hLZLYSGXj7Kp06nMVaUAMrNDbGkXFYcQo p9kkgB0rMQJI_u1UJc4GhhE
- Qiagen. (2017). *DNeasy® PowerFood® Microbial Kit*. EEUU. Retrieved from <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=2ce6f95d-d62b-4f93-901e-7c6f0e2f35ac&lang=en>
- Rennó, F., Esler, J., Júnior, D., Gandra, J., Verdurico, L., Veiga, M., Barletta, R., Conte, B., & Vilela, F. (2013). Revista Brasileira de Zootecnia Fatty acid profile and composition of milk protein fraction in dairy cows fed long-chain unsaturated fatty acids during the transition period. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 42(11), 813–823. Retrieved from <http://www.scielo.br/pdf/rbz/v42n11/v42n11a08.pdf>
- Richards, M., Buys, E. M., & De Kock, H. L. (2016). Survival analysis, consumer perception and physico-chemical analysis of low fat UHT milk stored for different time periods. *International Dairy Journal*, 57, 56–61.

- <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.02.037>
- Richardson, B., & Newstead, D. (1979). Effect of heat-stable proteinases on the storage life of UHT milk. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 14, 273–279. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=NZ19800564311>
- Rodríguez, E. (2012). *Caracterización de leches con diferentes grados de estabilidad proteica*. Universidad Nacional De Colombia.
- Samarzija, D., Zamberlin, S., & Pogacic, T. (2012). Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. *Mljekarstvo*, 62(2), 77–95.
- Sayers, E. (2016). Database resources of the National Center for Biotechnology Information [ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/Bacteria]. *Nucleic Acids Research*, 44(November 2015), 7–19. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1290>
- Sigma Aldrich. (2007). *KiCqStart SYBR Green qPCR ReadyMix* (No. KCQS00). EEUU. Retrieved from https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/SIGMA/KCQS02?lang=en®ion=US&gclid=Cj0KCQiA8f_eBRDcARIsAEKwRGcdYp8W7Yg1U61xGg9lCiaNDT3CqPCCY9qaPUK_vYZGSYCsVcEpO-YaAmvyEALw_wcB
- Sigma Aldrich. (2013). *Bacillus Cereus Selective Agar*. United States. Retrieved from <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Datasheet/1/22310dat.pdf>
- Sorribes, C. H. (2008). Métodos rápidos y automatización en microbiología alimentaria. In *VI Workshop Mrama* (pp. 87–109). Madrid. Retrieved from http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Monografico_VI_workshop_MRAMA.pdf
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2(5), 70–78. <https://doi.org/10.1157/13059826>
- Torres, L. R. (2013). Estrategias de identificación de genes de proteasas en una cepa de pseudomonas fluorescens alterante de leche. Retrieved from <http://digibuo.uniovi.es/dspace/handle/10651/18230>
- Vidal, A., Junior, O., Abreu, I., Bürger, K., Cardoso, M., Gonçalves, A., Rossi, G., & D'Abreu, L. (2016). Detection of Bacillus cereus isolated during ultra high temperature milk production flowchart through random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Ciência Rural*, 46(2), 286–292. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20141539>
- Vithanage, N. R., Dissanayake, M., Bolge, G., Palombo, E. A., Yeager, T. R., & Datta, N. (2016). Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions, seasonality and their ... *International Dairy Journal*, 57(July), 80–90. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.02.042>
- Walstra, P., Jenness, R., & Badings, H. (1984). *Dairy Chemistry and Physics*. (J. W. and Sons, Ed.). New York: Wiley. Retrieved from <http://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/78232>

- Walstra, P., Wouters, J., & Geurts, T. (2006). *Dairy Science and Technology. Facilities* (Vol. 4). <https://doi.org/9780824727635>
- Wolk, D., Olson, D., & Tenover, F. (2012). Verification of Qualitative Real-time PCR Methods. *Cepheid*, 5(1), 1–7. Retrieved from <http://www.ahsoman.com/documents/catalogue/12.pdf>
- Zhang, F. (2012). *Quantitative detection of the spoilage bacteria pseudomonas spp . And photobacterium phosphoreum in fish by real-time pcr*. United Nations University. Retrieved from <http://www.unuftp.is/static/fellows/document/fuyun12prf.pdf>

5.1 Anexos

Resultados de los análisis estadísticos realizados en el programa de Infostat

Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP	AIC	BIC
LOG10 <i>Pseudomonas spp.</i> (ufc..	8	0.20	0.00	5.95	31.16	31.47

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	E.E.	LI (95%)	LS (95%)	T	p-valor	CpMallows	VIF
const	29.44	136.47	-321.37	380.25	0.22	0.8377		
Alcohol positivo (%)	-0.54	3.52	-9.58	8.51	-0.15	0.8846	1.02	2468.53
Alcohol positivo (%)^2	2.9E-03	0.02	-0.05	0.06	0.13	0.9011	1.02	2468.53

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2.05	2	1.03	0.61	0.5813
Alcohol positivo (%)	2.02	1	2.02	1.19	0.3243
Alcohol positivo (%)^2	0.03	1	0.03	0.02	0.9011
Error	8.47	5	1.69		
Total	10.52	7			

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2.05	2	1.03	0.61	0.5813
Alcohol positivo (%)	2.05	2	1.03	0.61	0.5813
Error	8.47	5	1.69		
Total	10.52	7			

Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP	AIC	BIC
LOG10 Grupo B. cereus (ufc..	8	0.54	0.46	1.07	22.48	22.72

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	E.E.	LI (95%)	LS (95%)	T	p-valor	CpMallows	VIF
const	13.26	3.37	5.02	21.50	3.94	0.0076		
Alcohol positivo (%)	-0.11	0.04	-0.22	-0.01	-2.66	0.0377	7.06	1.00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4.32	1	4.32	7.06	0.0377
Alcohol positivo (%)	4.32	1	4.32	7.06	0.0377
Error	3.68	6	0.61		
Total	8.00	7			

Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP	AIC	BIC
LOG10 Psicrotróficas totales..	8	0.28	0.00	5.82	30.67	30.98

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	E.E.	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor	CpMallows	VIF
const	20.64	132.35	-319.57	360.85	0.16	0.8822		
Alcohol positivo (%)	-0.27	3.41	-9.04	8.50	-0.08	0.9399	1.01	2468.53
Alcohol positivo (%)^2	1.1E-03	0.02	-0.06	0.06	0.05	0.9611	1.00	2468.53

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3.07	2	1.53	0.96	0.4428
Alcohol positivo (%)	3.06	1	3.06	1.92	0.2242
Alcohol positivo (%)^2	4.2E-03	1	4.2E-03	2.6E-03	0.9611
Error	7.96	5	1.59		
Total	11.03	7			

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3.07	2	1.53	0.96	0.4428
Alcohol positivo (%)	3.07	2	1.53	0.96	0.4428
Error	7.96	5	1.59		
Total	11.03	7			

Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP	AIC	BIC
LOG10 Otras (ufc)	8	0.30	0.01	5.88	30.74	31.06

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	E.E.	LI (95%)	LS (95%)	T	p-valor	CpMallows	VIF
const	19.15	132.98	-322.69	361.00	0.14	0.8911		
Alcohol positivo (%)	-0.23	3.43	-9.05	8.59	-0.07	0.9491	1.00	2468.53
Alcohol positivo(%)^2	8.3E-04	0.02	-0.06	0.06	0.04	0.9712	1.00	2468.53

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3.37	2	1.68	1.05	0.4169
Alcohol positivo (%)	3.37	1	3.37	2.09	0.2076
Alcohol positivo (%)^2	2.3E-03	1	2.3E-03	1.4E-03	0.9712
Error	8.04	5	1.61		
Total	11.41	7			

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3.37	2	1.68	1.05	0.4169
Alcohol positivo (%)	3.37	2	1.68	1.05	0.4169
Error	8.04	5	1.61		
Total	11.41	7			

Prueba T para muestras Independientes

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	p-valor
UHT	LOG10 grupo B. cereus (ufc..	{B. cereus}	{Negativo}	5	3	0.0434

Prueba T para muestras Independientes

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	p-valor
CATALcohol positivo (%)	LOG10 grupo B. cereus (ufc..	{B. cereus}	{Negativo}	4	4	0.4709