https://doi.org/10.56085/isss.524

Caracterización de la microbiota de leche ultra alta temperatura (UAT, UHT) analizada en Bogotá

Characterization of the microbiota of ultra-high temperatura (UHT) milk scrutinized in Bogotá

Caracterização da microbiota no leite ultra-alta temperatura (UAT) analisada em Bogotá

Sandra Lucía Castañeda-Carrasquilla[1]

Resumen

En los últimos años, las leches ultra alta temperatura (UAT, o UHT por sus siglas en inglés) —definidas en el Decreto 616 de 2006— analizadas en el Laboratorio de Salud Pública de Bogotá han venido presentando resultados *no satisfactorios* respecto a la *prueba de esterilidad comercial*, debido a que se han detectado microorganismos productores de esporas altamente resistentes a los tratamientos de ultrapasteurización (HHRS). A escala mundial, se informa como principal causa de esta clase de contaminación al *Bacillus sporothermodurans.* Con este estudio se determinó si las leches UAT de distribución en Bogotá presentan la misma contaminación detectada por bacterias HHRS del género *Bacillus*, y principalmente *B. sporothermodurans*. Las muestras de leches UAT que ingresaron al Laboratorio de Salud Pública de Bogotá se utilizaron para análisis microbiológico, como parte de la *vigilancia rutinaria* realizada por el Hospital de Fontibón durante 2010 y 2011. Como resultado de la prueba de esterilidad comercial aplicada a las leches UAT se recuperaron 36 cepas de muestras analizadas durante 2010-2011, a las que se les realizó la identificación bioquímica con el test BCL de Biomerieux, en el equipo Vitek ®2 Systems. Los microorganismos recuperados morfológicamente correspondieron a bacilos grampositivos, pertenecientes al género *Bacillus*, así: *Bacillus smitii*, 66,67 %; *Bacillus sphaericus/fusiformis*, 8,33 %; *Bacillus choshinensis* y *Geobacillus stearothermophilus*, 8,33 %. Esto permite concluir que no toda la contaminación de las leches UAT (UHT) analizadas en Bogotá se debe a una sola especie de *Bacillus*; por tanto, no se debe enfocar únicamente en *B. sporothermodurans* como contaminante único de leches higienizadas a escala nacional.

Palabras clave: bacilos grampositivos, leche (ultra alta temperatura UAT [UHT]), *Bacillus sp.*, *Bacillus sporothermodurans*.

Abstract

In recent years, ultra-high temperature milk categories (enforced by Decree 616 of 2006 and scrutinized by Public Health Laboratory of Bogota) have reported unsatisfactory

1 Bacterióloga, especialista en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Secretaría Distrital de Salud, Laboratorio de Salud Pública Bogotá, Colombia.

results regarding a commercial sterility test because of highly heat-resistant spores –HHRS– produced by microorganisms. Globally, *Bacillus sporothermodurans* has reported as the main cause of this kind of pollution. This study established whether these delivery milks in Bogota have the same pollution detected by HHRS bacteria of the genus *Bacillus* and mainly *B. sporothermodurans*. For this purpose, we used microbiological samples as a portion of the repetitive surveillance performed by the Hospital de Fontibon during 2010 and 2011, division of Environment and Consumer Surveillance. Because of the commercial sterility test, 36 sample strains were recovered and biochemically identified using Biomerieux BCL test, supported by Vitek ®2 Systems. The morphologically recovered microorganisms were Gram-positive bacilli belonging to Bacillus type, as follows: *Bacillus smitii* 66,67 %, *Bacillus sphaericus/ fusiformis* 8,33 %, *Bacillus choshinensis* and *Geobacillus sterarothermophilus* 8,33 %. This lets us to conclude that not all of the pollution is due to single species of Bacillus and should not focus only on *B. sporothermodurans* as a single contaminant of domestic sanitized milks.

Keywords: gram-positive bacilli, ultra-high temperature –UHT– milk, *Bacillus sp*, *Bacillus sporothermodurans*.

Resumo

Nos últimos anos, as categorias de leite ultra-alta temperatura (UAT) — definidas no Decreto 616 de 2006 e analisados no Laboratório de Saúde Pública de Bogotá — têm vindo apresentando resultados não satisfatórios respeito à prova de esterilidade comercial, isso devido a que se têm afetado microrganismos produtores de esporas altamente resistentes aos tratamentos de ultra- pasteurização (HHRS). Mundialmente reporta-se como principal causa deste tipo de contaminação ao *Bacillus sporothermodurans*. Com este estudo determinou-se se esses leites de distribuição em Bogotá apresentam a mesma contaminação detectada por bactérias HHRS do gênero Bacillus e principalmente o *B. sporothermodurans*. Para tal fim, utilizaram-se amostras de análise microbiológico como parte da vigilância costumeira realizada pelo Hospital de Fontibón durante 2010 y 2011 na área de Vigilância do Ambiente e Consumo. Resultados da prova de esterilidade comercial foram recuperadas 36 cepas de amostras nas quais, a seguir, foram realizada a identificação bioquímica com o teste BCL de Biomerieux na equipe Vitek ®2 Systems. Os microrganismos recuperados morfologicamente corresponderam a bacilos Gram positivos, pertencentes ao gênero Bacillus, deste jeito: *Bacillus smitii* 66.67 %, *Bacillus sphaericus/ fusiformis* 8.33 %, *Bacillus choshinencis* e *Geobacillus sterarothermophilus* 8.33 %. O anterior permite concluir que não toda a contaminação é devida a uma só espécie de bacilos e não deve se enfocar unicamente em *B. sporothermodurans* como contaminante único nacional dos leites higienizados.

Palavras chave: bacilos Gram positivos, leite ultra-alta temperatura (UAT), *Bacillus sp, Bacillus sporothermodurans*.

Introducción

En Colombia, el Decreto 616 de 2006, por el cual "Se expide el Reglamento Técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercialice, expenda, importe o exporte en el país". Luego, en el Título II, Capítulo, I define: "Leche ultra-alta-temperatura UAT (UHT) leche larga vida", como:

> El producto obtenido mediante proceso térmico en flujo continuo, aplicado a la leche cruda o termizada, a una temperatura entre 135 °C a 150 °C y tiempos entre 2 y 4 segundos, de tal forma que se compruebe la destrucción eficaz de las esporas bacterianas resistentes al calor, seguido inmediatamente de enfriamiento a temperatura ambiente y envasado aséptico en recipientes estériles con barreras a la luz y al oxígeno, cerrados herméticamente para su posterior almacenamiento, con el fin de que se asegure la esterilidad comercial sin alterar de manera esencial ni su valor nutritivo ni sus características fisicoquímicas y organolépticas, la cual puede ser comercializada a temperatura ambiente (1).

En Colombia se comercializan leches higienizadas de acuerdo con su contenido de grasa y su procesamiento. En el Capítulo V, artículo 15 del Decreto 616 de 2006, en el que se define la clasificación de las leches de acuerdo con su proceso de fabricación, estas pueden ser pasteurizadas, ultrapasteurizadas, ultra alta temperatura (UAT), leche larga vida, esterilizada, en polvo y deslactosada (1). En el artículo 19 del mismo documento se establecen los requisitos microbiológicos de la leche líquida.

Se define que la leche líquida ultra alta temperatura (UAT), leche larga vida, debe cumplir con los siguientes requisitos microbiológicos: en la prueba de esterilidad comercial, "Después de incubar durante 10 días no presentar crecimiento microbiano a 55 °C y 35 °C" (1).

El Laboratorio de Salud Pública de Bogotá, como parte de los procesos de Inspección, Vigilancia y Control, procesó un total de 330 muestras de leches UAT en el 2010; para el 2011 se analizaron 289 muestras de la misma clasificación, según procesamiento, para un total de 619 leches por este periodo de dos años. De estas, 265 muestras no cumplieron el requisito de prueba de esterilidad comercial "satisfactoria"; es decir, el 42.81 % tuvieron concepto de "no satisfactoria", y la causa fue el "crecimiento aerobio y anaerobio Positivo a 35 °C" (Sistema de Información del Laboratorio de Salud Pública [SILASP]).

El "Crecimiento aerobio y anaerobio positivo a 35 °C" en el resultado de la prueba de esterilidad comercial aparece como la principal causa de no cumplimiento en las leches higienizadas. Esto, debido a la presencia de esporas resistentes a los procesos de ultrapasteurización (HHRS), como microorganismos del género Bacillus. Los problemas de no esterilidad en las leches ultra alta temperatura (UAT) son causados por recontaminación después del tratamiento de calentamiento (2).

Cuando se verifica la esterilidad de los productos a través de mediciones de potenciales de óxido-reducción, con equipos de monitoreo de crecimiento bacteriano, estas no se detectan hasta niveles mayores a 10 5 ufc/mL; las esporas no producen alteraciones de estabilidad ni de calidad sensorial de la leche, no se ve afectado el pH y rara vez producen deterioro del producto (3).

El grupo de bacterias mesófilas aerobias esporoformadoras extremadamente resistentes a los procesos de altas temperaturas han sido detectados en muchos países de Europa y fuera de ella; algunos de estos esporoformadores pertenecen al género Bacillus, y se han clasificado como una nueva especie *B. sporothermodurans*; su principal característica es la de producir esporas resistentes a los ultracalentamientos (HHRS) (4,5). Aunque las células vegetativas del *B. sporothermodurans* no son patógenas y no causan deterioro visible, ni de sabor en los productos UAT, esta es considerada indeseable (5-7) y por ello no permite el cumplimiento de los requisitos legales establecidos; así, "Después de incubar durante 10 días no debe presentar crecimiento microbiano a 35 °C y 55 °C".

Con esta valoración de las leches UAT que se comercializaron entre el 2010 y el 2011 en Bogotá se pretendió determinar si la contaminación detectada era causada por bacterias HHRS del género Bacillus, y en especial por *B. sporothermodurans*.

Materiales y métodos

Población de estudio

Para el desarrollo del estudio se utilizaron las mues-

tras de leches ultra alta temperatura (UAT) que ingresaron al Laboratorio de Salud Pública para análisis microbiológico, como parte de la vigilancia realizada a los expendios y distribuidores de leches a cargo del Hospital de Fontibón, durante 2010 y 2011. De las 265 muestras de leches que no cumplieron, se conservaron alícuotas de 204 muestras, cuya causa de no cumplimiento fue "Cultivo positivo aerobio y anaerobio a 35 °C", y a partir de estas se realizó la recuperación de las cepas y posterior identificación.

Obtención de cepas de leches UAT

Las cepas de las muestras de leches ultra alta temperatura (UAT) en estudio se recuperaron después de realizar una preincubación del producto durante 10 días a 35 °C. Posteriormente se tomaron dos alícuotas de la muestra, así: una alícuota de 100 uL, que se sembró en superficie en Agar infusión cerebro corazón (BHI, por sus siglas en inglés *brain heart infusion*) y una segunda alícuota de 1 mL, que se inoculó en 10 mL de caldo cerebro corazón (2,5). Las placas y tubos sembrados se llevaron a incubar únicamente en condiciones de aerobiosis a 35 ºC +/- 2 ºC por 72 horas (8).

Pasado el periodo de incubación, se observó crecimiento de colonias pequeñas, puntiformes, transparentes y difíciles de ver sobre las placas de Agar BHI; por otro lado, se realizó una siembra de los tubos incubados con caldo BHI a placas de Agar BHI, y nuevamente se llevaron a incubar en condiciones de aerobiosis a 35 ºC +/-2 ºC por 72 horas. Luego se realizó inspección visual diaria del crecimiento en las placas de Agar BHI (8).

Caracterización fenotípica de las cepas

De los cultivos obtenidos en las placas de Agar BHI se realizó coloración de gram y prueba de catalasa. Se verificó que la morfología de las cepas aisladas correspondiera a bacilos grampositivos o gramvariables. Una vez confirmada la pureza de los cultivos y la morfología, se procedió a la identificación bioquímica, con el test BCL de Biomerieux, en el equipo Vitek ®2 Systems (9). Las tarjetas usadas pueden identificar *Bacillus sporothermodurans* y otros géneros de bacilos relacionados con procesos en industria de alimentos (10).

Resultados

De las 204 muestras de leches ultra alta temperatura (UAT) con concepto microbiológico "no cumple" conservadas durante 2010 y 2011 se recuperaron tan solo 36 cepas (tabla 1), correspondientes al 17,62 %. Las bacterias esporoformadoras que fueron aisladas de las leches no estériles mostraban colonias pequeñas puntiformes de 0,1 mm de diámetro, cremosas, de incoloras a color blanco y/o *beige*. Los microorganismos morfológicamente correspondieron a bacilos por tinción grampositivos, agrupados en filamentos, con reacción de catalasa positiva.

Tabla 1. Identificación bacteriana de cepas recuperadas de leches ultra alta temperatura (UAT) 2010-2011

Microorganismo identificado*	Total de cepas N	Porcentaje**
Geobacillus (Bacillus) stearothermophillus	3	8.33
Brevibacillus choshinensis	3	8.33
Bacillus smitii	24	66.67
Bacillus sphaericus/Bacillus fusiformis	3	8.33
No identificado	3	8.33

* Resultados obtenidos de identificación bioquímica con el test BCL de Biomerieux en el equipo Vitek ®2 Systems (9).
** El porcentaje fue calculado sobre las 36 cepas recuperadas.
Fuente: Elaboración propia.

Todos los microorganismos identificados por medio de la metodología test BCL de Biomerieux en el equipo Vitek ®2 Systems pertenecieron al género *Bacillus*. La especie más identificada fue *B. smitii*, con un 66,67 % del total de las muestras recuperadas. Ninguna de las cepas recuperadas se identificó como *Bacillus sporothermodurans*.

Discusión

Los programas de inspección, vigilancia y control aplicados en el área de factores de riesgo del ambiente y consumo tienen como objetivo garantizar la salubridad y calidad microbiológica de alimentos, por la determinación de su conformidad con valores de referencia o normas microbiológicas.

La finalidad que cumplen los valores cuantitativos o normas microbiológicas consiste en permitir que sean evaluados o juzgados los datos obtenidos en el análisis de las muestras representativas extraídas de una

muestra de alimentos. Más concretamente, los resultados sirven para decidir si el producto ha sido, o no, fabricado, almacenado y enviado sin incumplimiento alguno, respecto a las buenas prácticas de manufactura, ideadas de tal manera que lleguen al consumidor en un estado inocuo y conforme (10).

La principal causa de contaminación informada en leches UAT son los microorganismos del género *Bacillus spp.*, principalmente *B. sporothermodurans*; está definido que sus células vegetativas no son patógenas y no causan deterioro visible, ni de sabor en los productos UAT, pero la presencia de estas es considerada indeseable (5) y no permite el cumplimiento de los requisitos legales establecidos (1).

Las leches envasadas en recipientes estériles UAT de las cuales se recuperaron las cepas fueron indiscriminadamente muestras que presentaron resultado "no satisfactorio" para la prueba de esterilidad comercial, la cual fue realizada en el Laboratorio de Salud Pública, en el área de microbiología de alimentos, durante 2010 y 2011.

Las bacterias esporoformadoras fueron aisladas de las leches UAT con cultivo positivo a 35 °C en condiciones de aerobias, y correspondieron a recuentos de 10^5 UFC/mL.

El microorganismo que más se identificó fue el *Bacillus smitii*, en un 66,67 % de los casos, lo que sugiere que la principal contaminación de las leches UAT se debe a especies de Bacillus, seguido por *Geobacillus* (*Bacillus*) *stearothermophillus* en un 8,33 %. No se identificó ninguna cepa como *Bacillus sporothermodurans*, a través del test BCL de Biomerieux en el equipo Vitek ®2 Systems.

Los microorganismos identificados se encuentran referenciados como contaminantes ambientales (10); para mitigar la presencia de estos se debe hacer énfasis en las buenas prácticas de ordeño y recepción de leche antes de ser tratadas en las plantas de higienización; igualmente, representan un problema de calidad para el producto terminado, teniendo en cuenta que estos microorganismos son saprófitos no afectarían la inocuidad final.

Aunque la principal causa de la contaminación son los microorganismos del género Bacillus, las especies son variadas y pueden depender de la flora característica de cada hato, de la planta de tratamiento (contaminación postratamiento térmico) y/o de la distribución geográfica de cada especie (10). La información de la naturaleza y el origen de las esporas aerobias en leches es de fundamental importancia si se quiere reducir la contaminación y procurar el mejoramiento de la calidad bacteriológica de los productos lácteos, ya que la contaminación por esporas bacterianas puede ocurrir en cualquier parte de la granja (11) o pueden ser resultado de contaminación posterior al tratamiento térmico.

Los principales géneros ambientales aislados y reportados en productos del sector láteo son *Bacillus*, *Geobacillus* o *Paenibacillus* (12); esta referencia coincide con los resultados obtenidos en la evaluación realizada en el Laboratorio de Salud Pública de Bogotá, y con los informados por Gopal Nidhi *et al.* (13).

Los resultados nos sugieren que no toda la contaminación de las leches UAT se debe a una sola especie de *Bacillus spp.*, y que no se debe enfocar una sola especie, por ejemplo *B. sporothermodurans*, como único contaminante a escala nacional.

La rentabilidad y la reputación en la industria láctea van a depender de la calidad y la seguridad de los productos generados. La industria láctea debe enfocarse en controlar la formación de *biofilms*, ya que microorganismos como los encontrados de Bacillus y Geobacillus son capaces de resistir los procesos de pasteurización y sobrevivir a condiciones hostiles; y de esta manera, se podría permitir la colonización de otros que pueden ser patógenos. El éxito en la eliminación de *biofilms* es esencial para la contaminación de los subproductos (13).

Los gremios lecheros del país deben emprender el desarrollo de estrategias verdes para los procesos de limpieza y desinfección de equipos, por medio de la interacción de moléculas-bacteriófagos, de agentes bioterapéuticos y otros, para realizar control y eliminación de *biofilms*. También son útiles tratamientos ultrasónicos combinados con el calor y presión, o procesos con aplicaciones de peróxido de hidrógeno y agentes antimicrobianos, como nisina, lauricidina o reuterina (13).

Se propone realizar la caracterización más extensa de la carga de bacterias mesófilas de las leches UAT con concepto "no cumple" por causa de cultivo aerobio a

35 °C, para determinar si estas corresponden a *Bacillus sporothermodurans* (14) o a otras especies de Bacillus.

Se recomienda realizar la metodología de PCR para la confirmación de las especie de los bacilos esporoformadores aislados (3,6,7); y a su vez, aplicar la metodología MALDI-TOF MS para evaluar su capacidad en la identificación de especies del género Bacillus (14).

Conclusiones

Basados en los resultados obtenidos en el estudio, se puede concluir que la alta incidencia de resultados de "no esterilidad" en productos lácteos UAT es causada principalmente por esporas de *Bacillus smitii* que sobreviven durante el tratamiento de ultrapasteurización.

Una posible causa de supervivencia de estas esporas es que el tiempo de contacto en el tubo de calentamiento, en el equipo de ultrapasteurización, es tan corto que el tratamiento térmico en la leche para eliminar este tipo biota no alcanza a ser efectivo. Además, las endosporas, por ejemplo, de las especies de Bacillus ganan resistencia con condiciones adversas como esta (14).

En las leches UAT se logró caracterizar que las esporas aerobias y anaerobias mesófilas obtenidas de las leches higienizadas en este periodo correspondieron únicamente al género *Bacillus spp.* (ninguna de las cepas identificadas corresponde a microorganismos patógenos, solo a contaminantes ambientales que determinan la calidad de los productos).

Aunque no se conoce la causa de esta extrema resistencia de las esporas, se necesitan métodos de identificación bioquímica de estas especies que estén al alcance de las plantas procesadoras y laboratorios de control.

Es probable que en las plantas de tratamiento se deban evaluar las principales fuentes de contaminación, por medio de análisis de riesgos, la cinética contaminante de cada especie, o que se establezca un rango de temperatura y un tiempo de contacto para la inactivación de las esporas durante el tratamiento al que va a ser sometida, sin alterar las características físico-químicas y nutricionales.

Referencias

1. Presidencia de la República de Colombia. Decreto 616 de 2006, por el cual se expide el Reglamento Técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercialice, expenda, importe o exporte en el país. Bogotá: Diario Oficial 46196 del 28 de febrero de 2006.

2. Klijn N, Herman L, Langeveld L. Genotypical and phenotypical charaterization of *Bacillus sporothermodurans* strains, surviving UHT sterilisation. Int. Dairy J. 1997;7:421-8.

3. Scheldeman P, Herman L, Goris J. Polymerase chain reaction identification of *Bacillus sporothermodurans* from dairy sources. J App Microbiol. 2002;92:983-91.

4. Huemer I. Thermal death kinetics of spores of *Bacillus Sporothermodurans* Isolated from UHT milk. Int Dairy J. 1998;8:851-5.

5. Guillaume-Gentil O, Scheldeman P, Marugg J, Herman L, Joosten H, Hendrickx M. Genetic Heterogeneity in Bacillus sporothermodurans as Demonstrated by Ribotyping and Repetitive Extragenic Palindromic-PCR Fingerprinting. Appl Environ Microbiol. 2002;68(9):4216-24.

6. Pettersson B, Lembke F, Hammer P, Stackebrandt E, Priest FG. *Bacillus sporothermodurans*, a new spicies producing highly heat-resistant endospores. Int J Syst Bacteriol.1996;46(3):759-64.

7. Herman L. Identification and detection of *Bacillus sporothermodurans* spores in 1, 10, and 100 milliliters of raw milk by PCR. Appl Environ Microbiol. 1997;63(8):3139-43.

8. Vaerewijck M, De Vos P, Lebbe L, Scheldeman P, Hoste B, Heyndrickx M. Ocurrence of *Bacillus sporothermodurans* and other aerobic spore-forming species in feed concentrate for dairy cattle. J Appl Microbiol. 2001; 91(6):1074-84.

9. Cotrill E. Evaluation of the VITREK 2 BLC Card for the identification of Bacillus especies in a clinical diagnostic laboratory. Microbiology On The Edge, ASM HOBART 2011 [internet]. 2011 [citado

2012 feb. 2]. Disponible en: http://www.labonline.com.au/content/lab-business/article/microbiology-on-the-edge-635936994

10. Pincus D. Microbial identification using the Biomérieux vitek® 2 system Biomérieux, Inc. Hazelwood, MO, USA [internet]. S. f. [citado: 2015 dic. 5]. Disponible en: http://www.pda.org/bookstore

11. Van Heddeghem and Vlaemynck 1993 Van Heddeghem A, Vlaemynck G. *S*ources of contamination of milk with *Bacillus cereus* on the farm and in the factory. IDF Bulletin. 1993;275:19-22.

12. The Standards Unit, Microbiology Services, PHE. UK Standards for Microbiology Investigations Identification of Bacillus species. Bacteriology – Identification ID 9 Issue N.° 3, Issue date: 24.02.15 [internet]. 2015 [citado 2015 abr. 2]. Disponible en: https://www.gov.uk/government/publications/smi-id-9-identification-of-bacillus-species

13. Gopal N, Hill C, Ross PR, Beresford TP, Fenelon MA, Cotter PD. The prevalence and control of Bacillus and related spore-forming bacteria in the dairy industry. Front Microbial. 2015;6:1418.

14. Lücking G. Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing enviroments and product spoilange. Int J Microbiol. 2013;166:270-9.

Recibido para evaluación: 4 de julio de 2014
Aceptado para publicación: 6 diciembre de 2016

Correspondencia
Sandra Lucía Castañeda-Carrasquilla
Bacterióloga del Laboratorio de Salud Pública
Secretaría Distrital de Salud de Bogotá
scastaneda@saludcapital.gov.co