



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo Fin de Máster en Calidad, Seguridad y Tecnología de los Alimentos

Detección de esporos de clostridios butíricos en leche de vaca y oveja mediante  
PCR a tiempo real y métodos microbiológicos

Detection of spores of butyric clostridia in cow and ewe milk by real time PCR  
and microbiological methods

Autor/es

M<sup>a</sup> Cristina Díaz Muro

Director/es

M<sup>a</sup> Lourdes Sánchez Paniagua  
Miriam Esteban Pellejero

Facultad de Veterinaria

2019/2020

---

# ÍNDICE

<b>RESUMEN / ABSTRACT</b> .....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
1.1. El defecto de la hinchazón tardía en los quesos .....	2
1.2. Clostridios butíricos causantes de la hinchazón tardía.....	3
1.3. Vías de contaminación de la leche con clostridios butíricos.....	5
1.4. Prevención de la hinchazón tardía.....	7
1.4.1 Prevención en las explotaciones ganaderas .....	7
1.4.2 Reducción de esporos butíricos mediante tratamientos físicos .....	7
1.4.3 Reducción de esporos butíricos mediante aditivos.....	8
1.5. Métodos de detección, cuantificación e identificación de clostridios butíricos .	10
1.5.1 Técnicas microbiológicas .....	11
1.5.2 Técnicas inmunológicas.....	13
1.5.3 Técnicas moleculares.....	14
1.6. Métodos de extracción de DNA de esporos butíricos .....	17
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	19
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	19
3.1. Obtención de esporos de clostridios butíricos a partir de células vegetativas. ..	19
3.1.1. Cultivo de células vegetativas de <i>C. tyrobutyricum</i> .....	19
3.1.2. Esporulación de células vegetativas y obtención de esporos.....	20
3.2. Muestras de leche procedentes de Asociaciones Interprofesionales lecheras ....	21
3.3. Extracción y cuantificación del DNA de los esporos de clostridios butíricos ...	22
3.3.1. Tratamiento de las muestras de leche con subtilisina .....	22
3.3.2. Extracción y purificación del DNA con el método King Fisher Duo.....	22
3.3.3. Cuantificación de las muestras con PCR a tiempo real. ....	24
3.4. Análisis microbiológico de leches crudas .....	25

3.5.	Aislamiento y análisis de colonias de clostridios butíricos por PCR.....	26
3.5.1.	PCR múltiple de especies.....	26
3.5.2.	Visualización de los productos de PCR en gel de agarosa .....	27
3.5.3.	Identificación de especies mediante secuenciación del gen 16S rDNA bacteriano .....	28
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>29</b>
4.1.	Evaluación del método King Fisher Duo para la extracción de DNA de esporos de clostridios butíricos.....	29
4.2.	Análisis de muestras de leche cruda de vaca y oveja.....	32
4.2.1.	Análisis mediante PCR a tiempo real .....	33
4.2.2.	Análisis mediante cultivo microbiológico .....	34
4.3.	Identificación de especies de clostridios butíricos presentes en las muestras....	36
4.3.1.	Análisis e identificación de colonias por PCR múltiple .....	36
4.3.2.	Identificación de especies mediante secuenciación del gen 16S rDNA bacteriano .....	37
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>41</b>
<b>6.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>42</b>

## **ANEXOS**

## RESUMEN / ABSTRACT

La germinación de esporos del género *Clostridium*, principalmente *C. tyrobutyricum*, es la responsable de la fermentación butírica o defecto de hinchazón tardía, que se produce durante la etapa de maduración de los quesos, provocando alteraciones en su sabor, olor y textura y generando grandes pérdidas económicas en la industria quesera. Actualmente, no existe un método rápido de detección y cuantificación de estos esporos que permita decidir el uso de la leche en la cadena de producción. El objetivo principal de este Trabajo Fin de Máster ha sido desarrollar un método rápido de detección y cuantificación de esporos butíricos en leche cruda combinando la extracción y purificación del DNA de los esporos, mediante un sistema que utiliza partículas magnéticas (King Fisher Duo), y la cuantificación con PCR a tiempo real (qPCR). Para comprobar la aplicabilidad del nuevo método se han analizado muestras de leche cruda de vaca y oveja, sospechosas de contaminación con clostridios butíricos, cuyos resultados se han comparado con los obtenidos por cultivo microbiológico. Además, este cultivo se ha empleado para la identificación a nivel de especie de los microorganismos causantes de la fermentación butírica, con el objetivo de comprobar si se trata de contaminación por *C. tyrobutyricum* o existen otras especies implicadas en la producción del defecto de hinchazón tardía. Para ello se ha realizado PCR múltiple y secuenciación del gen 16S rDNA bacteriano.

The germination of spores from the genus *Clostridium*, mainly *C. tyrobutyricum*, is responsible for the butyric fermentation or late blowing defect, produced during the ripening stage of cheese, causing alterations in the taste, flavour and texture, and generating large economic losses in the cheese industry. Currently, there is no rapid method of detection and quantification of these spores that allow to determine the use of milk in the production chain. The main aim of this Master's Thesis has been to develop a fast method for butyric spore detection and quantification in raw milk, by combining the extraction and purification of DNA from spores by a system that uses magnetic particles (King Fisher Duo) and quantification by real time PCR (qPCR). To verify the applicability of the new method, cow and ewe milk samples, suspicious of butyric clostridia contamination, have been analyzed, whose results have been compared with those obtained by microbiological culture. In addition, this culture has been used for the identification at the species level of the microorganisms that cause butyric fermentation, in order to verify whether the contamination is due to *C. tyrobutyricum* or there are other species involved in the late blowing defect development. For this purpose, multiplex PCR and bacterial 16S rDNA gene sequencing have been performed.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. El defecto de la hinchazón tardía en los quesos**

La fermentación butírica es responsable del defecto de hinchazón tardía en los quesos, causada por el crecimiento de bacterias del género *Clostridium*, capaces de fermentar el lactato produciendo ácido butírico, ácido acético, dióxido de carbono e hidrógeno. Esta es una de las principales causas del deterioro de los quesos durante su etapa de maduración, que produce graves defectos de textura, olor y sabor, con el consiguiente impacto económico en la industria quesera (Garde et al., 2011).

Los esporos de los clostridios butíricos, provenientes de la leche utilizada como materia prima para la fabricación de los quesos, son los responsables de la fermentación butírica. En general, la leche no proporciona condiciones óptimas para la germinación de los esporos de los clostridios, permaneciendo inactivos en este medio. Debido a que su presencia en la leche no constituye un riesgo para la salud, esta puede usarse para la producción de la mayoría de los productos lácteos (Brändle, Domig y Kneifel, 2016). Estos esporos, que sobreviven al tratamiento de pasteurización de la leche y algunos incluso a la esterilización (Driehuis, 2013), permanecen latentes durante el proceso de elaboración de los quesos, y es en la etapa de maduración cuando se transforman en células vegetativas al encontrar las condiciones adecuadas de germinación: ausencia de oxígeno, alta humedad, concentración de sal inferior al 5% (Pigato, Andrighetto y Lombardi, 2012) y pH elevado.

La aparición de la hinchazón tardía en los quesos depende del número de esporos iniciales presentes en la leche cruda que, generalmente, suele ser bajo. En algunos estudios se han encontrado valores que varían de 0,04 a 100 esporos/mL en leche de vaca (Brändle, Domig y Kneifel, 2016; Driehuis, Hoolwerf y Rademaker, 2016) y de 0,36 a 240 esporos/mL en leche de oveja (Garde et al., 2011; Turchi et al., 2016). Sin embargo, algunos autores han indicado que cantidades tan pequeñas como 50 esporos/L (López-Enríquez, Rodríguez-Lázaro y Hernández, 2007) son suficientes para que se pueda producir este defecto.

Los quesos más susceptibles de ser afectados por la hinchazón tardía son los de pasta dura y semidura, como el Emmental, Gouda, Gruyère, Eddam, Grana Padano y Provolone (Nescier et al., 2015), que son elaborados con leche de vaca, aunque también se ha observado en quesos elaborados con leche de oveja, como el queso Manchego (Garde et al., 2011). La formación de gas en el interior de los quesos da lugar, como se muestra en la Figura 1, a agujeros irregulares, rajaduras y/o grietas que en muchas ocasiones pueden llegar al exterior del queso, debido a que la matriz no puede soportar la presión ejercida por la gran cantidad de gas

formado. Estos defectos de la estructura van acompañados, muchas veces, de un sabor y olor desagradables provocados por los ácidos producidos.



**Figura 1.** Ejemplos de defectos producidos por la fermentación butírica. (1): Méndez Dónega, 2011; (2) y (3): Martín, 2014.

Aparte del impacto negativo que tiene la hinchazón tardía debido al deterioro de las características sensoriales del queso y al rechazo del consumidor, las grietas formadas también pueden interferir en el proceso de loncheado o corte del queso previo a su venta. Todo esto da lugar a que los quesos afectados por este defecto, aunque no presentan un problema de seguridad alimentaria, no puedan ser comercializados, lo que genera importantes pérdidas económicas para las industrias queseras, pudiendo ser mayores en el caso de quesos de Denominación de Origen Protegida, a pesar de que en muchos casos, estos quesos son destinados a la producción de derivados como el queso fundido o rallado (Gómez Torres, 2017).

## **1.2. Clostridios butíricos causantes de la hinchazón tardía**

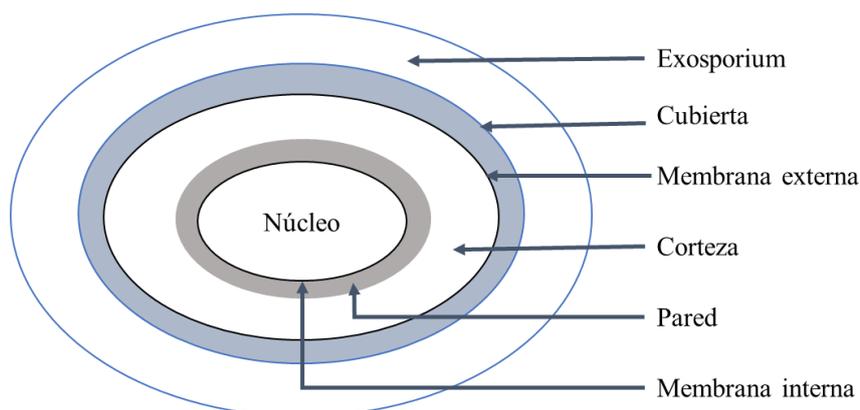
*Clostridium tyrobutyricum* es considerada la principal especie causante del defecto de hinchazón tardía en los quesos. Esta bacteria es Gram-positiva, anaerobia y formadora de esporos. *C. tyrobutyricum* recibió su nombre debido al hecho de haber sido aislada por primera vez de queso y a asociarse con la producción de ácido butírico (*tyros* en griego significa queso) (Wiedmann et al., 1999). Como describen Pahlow et al. (2003), su relativa tolerancia al ácido combinada con su capacidad de fermentar el lactato, hace que contrarreste el ácido láctico que se produce en las fermentaciones del ensilaje y en muchos quesos. La fermentación llevada a cabo por *C. tyrobutyricum* puede describirse como:



Se ha demostrado que otras especies de clostridios como *C. sporogenes*, *C. beijerinckii*, *C. butyricum* y *C. perfringens* pueden contribuir significativamente a la aparición del defecto de hinchazón tardía (Cocolin et al., 2004; Klijn et al., 1995; Le Bourhis et al., 2007; Reindl et al., 2014), pero todavía no está clara la extensión de la contribución de cada especie en el deterioro de la calidad de los quesos, ni si otras especies están involucradas también en este problema (Driehuis, 2013). En algunos estudios, el número de esporos de

clostridios butíricos cuantificado en quesos con hinchazón tardía osciló entre 25 y  $1,1 \times 10^5$  esporos/g en quesos de leche de vaca (Dasgupta y Hull, 1989; Le Bourhis et al., 2005) y entre 0,36 y  $2,4 \times 10^3$  esporos/g en quesos de leche de oveja (Garde et al., 2011; Le Bourhis et al., 2005). Matteuzzi et al. (1977) identificaron, en quesos Grana Padano con hinchazón tardía, el 47,5% de los esporos aislados como *C. tyrobutyricum*, el 45% como *C. sporogenes* y el 7,5% como *C. butyricum*. En quesos de la Denominación de Origen Queso Manchego con hinchazón, se identificaron el 78,9%, 10,3%, 9,0% y 1,8% de los esporos aislados como *C. sporogenes*, *C. beijerinckii*, *C. tyrobutyricum* y *C. butyricum*, respectivamente (Garde et al., 2011).

Cuando las células de los clostridios butíricos se encuentran con algún tipo de estrés ambiental, como puede ser la falta de nutrientes, forman una estructura inactiva denominada endosporo (que llamaremos espora en este trabajo). Los esporos de los clostridios butíricos pueden sobrevivir en este estado latente durante muchos años, y para ello, han desarrollado diversos mecanismos para protegerse de factores externos. Estos mecanismos también les sirven para evitar ser destruidos por los procedimientos de desinfección y esterilización, lo cual les convierte en un problema en la industria alimentaria. La resistencia y longevidad de los esporos están relacionadas con su estructura y composición, muy diferente a la de las células vegetativas, ya que incluye varias envueltas y muchos constituyentes que son únicos de los esporos. Como puede verse en la Figura 2, desde la parte más externa a la más interna, la estructura del espora consta de exosporium, cubierta, membrana externa, corteza, pared, membrana interna y, finalmente, el núcleo (Leggett et al., 2012).

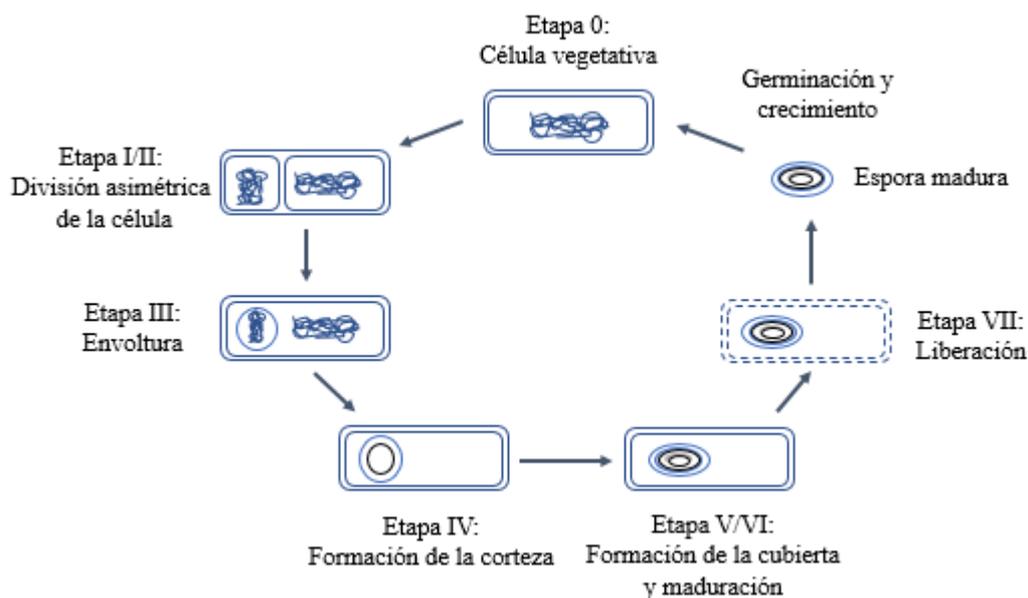


**Figura 2.** Esquema de la estructura de un espora. Adaptado de Leggett et al. (2012)

El proceso de formación de esporos, o esporulación, es una estrategia de los clostridios butíricos para sobrevivir a las condiciones ambientales adversas, mediante la cual las bacterias cesan el crecimiento vegetativo y forman un espora en el interior del citoplasma de la célula

madre. Estos esporos son metabólicamente inactivos y extremadamente más resistentes que las células vegetativas de su misma especie en condiciones de estrés ambiental, como el calor, la salinidad, la acidez, la radiación, la falta de oxígeno y/o de agua, la baja disponibilidad de nutrientes, la congelación y descongelación, la presencia de solventes orgánicos y agentes oxidantes, así como la radiación UV (Gómez Torres, 2017).

El proceso de esporulación se divide clásicamente en siete etapas, que se pueden ver resumidas en la Figura 3.



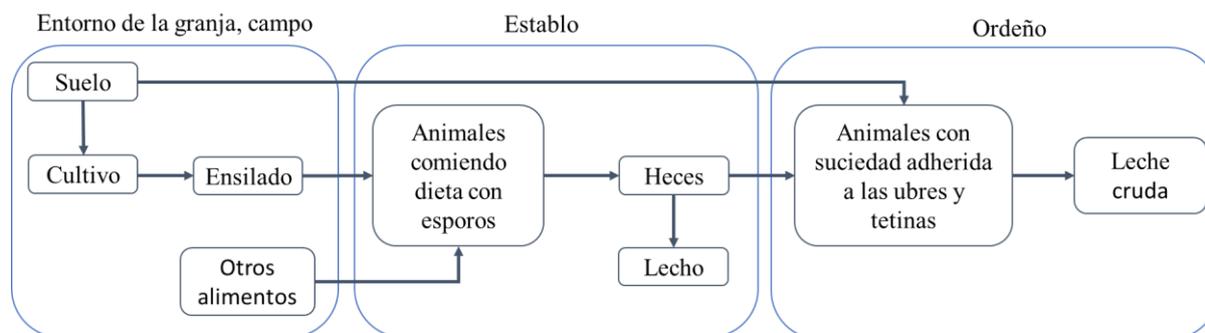
**Figura 3.** Principales etapas en el proceso de esporulación bacteriana y cambios morfológicos que tienen lugar en ella. Adaptado de Leggett et al. (2012).

### 1.3. Vías de contaminación de la leche con clostridios butíricos

La seguridad y la calidad de la leche y los productos lácteos dependen de la calidad de la leche cruda producida en las granjas lecheras, la calidad del resto de ingredientes y de las condiciones de procesado, distribución y almacenamiento. Por lo tanto, la producción de leche en las granjas lecheras debe cumplir con las demandas y los criterios establecidos con respecto a la salud animal, la calidad del alimento y la higiene del ordeño (Driehuis, 2013).

Debido a su gran ubicuidad, las fuentes importantes de esporos de clostridios butíricos en las granjas lecheras son el suelo, el ensilado, las heces y los materiales del lecho de los animales. La ruta principal de contaminación de la leche con esporos butíricos se muestra en la Figura 4, donde se indican dos rutas o vías de contaminación superpuestas. La primera vía de contaminación comienza con la alimentación. Los esporos presentes en los ensilados pasan a través del tracto gastrointestinal de los animales productores de leche y se acumulan en las heces. Las heces y los materiales del lecho contaminan las ubres de estos animales con tierra y

esporos adheridos, suciedad que es eliminada sólo parcialmente en la operación de limpieza del pezón que se realiza antes del ordeño de los animales, pudiendo transferirse así los esporos a la leche durante el ordeño. La segunda vía de contaminación comienza en el suelo, que puede contaminar el exterior de las ubres durante el pastoreo de los animales y como en la primera vía, los esporos se transmiten a la leche durante el ordeño (Vissers, 2007).



**Figura 4.** Ruta de contaminación de la leche con esporos de clostridios butíricos. Adaptado de Driehuis (2013).

Vissers et al. (2006) desarrollaron un modelo predictivo de la contaminación de la leche cruda por esporos de bacterias del ácido butírico a partir del alimento o de otras fuentes en el entorno de la granja como, por ejemplo, el suelo, basándose en el esquema representado en la Figura 4. Este modelo se usó para evaluar las variables más importantes e identificar estrategias efectivas para controlar los niveles de esporos de bacterias butíricas en la leche de los tanques de las granjas. Se concluyó que la variación en la concentración de esporos en el ensilado era, con diferencia, la variable significativamente más importante, incluso más que la eficiencia en la limpieza de los pezones y la higiene del establo.

El ensilaje es una técnica de preservación de forraje que se logra por medio de una fermentación láctica espontánea bajo condiciones anaerobias. Las bacterias ácido lácticas fermentan los carbohidratos hidrosolubles del forraje produciendo ácido láctico y, en menor cantidad, ácido acético. Al generarse estos ácidos, el pH del material ensilado baja a un nivel de entre 3,8 y 5,0, pH que inhibe la presencia de los microorganismos que inducen la putrefacción. Este material fresco se almacena compactado y cubierto para excluir el aire. En este proceso, los clostridios butíricos pueden sobrevivir como esporos (Oude Elferink et al., 2000). El principal efecto de la conservación por el ensilaje es la acidificación, que es más o menos intensa dependiendo de la anaerobiosis (que promueve la fermentación por las bacterias ácido-lácticas), la capacidad tamponante y la materia seca del cultivo. La incorporación de suelo contaminado al ensilaje aumenta su capacidad tamponante, retrasando el proceso de acidificación y favoreciendo la esporulación y crecimiento de clostridios

butíricos, produciéndose así una fermentación secundaria mediante la cual el ácido láctico se convierte en ácido butírico (Dunière et al., 2013).

#### **1.4. Prevención de la hinchazón tardía**

Con el objetivo de prevenir el defecto de la hinchazón tardía, el primer lugar donde se pueden tomar medidas para minimizar el contenido de esporos en la leche cruda son las explotaciones ganaderas. Además, en las queserías se pueden aplicar tratamientos físicos a la leche y a los quesos contaminados, o bien se pueden emplear aditivos que actúan como inhibidores frente a *Clostridium*.

##### **1.4.1 Prevención en las explotaciones ganaderas**

Como se ha mencionado anteriormente, la principal fuente de contaminación de la leche a nivel de las explotaciones ganaderas es el ensilado, por lo que el uso de unas buenas prácticas en su fabricación es la medida más importante para reducir la contaminación de la leche por esporos de clostridios butíricos. Estas buenas prácticas de fabricación incluyen utilizar cultivos de calidad, evitar la presencia de suelo en los forrajes empleados para el ensilado, generar una rápida anaerobiosis, promover la acidificación y evitar la entrada de aire durante el almacenamiento (Doyle et al., 2015; Dunière et al., 2013). También es común el uso directo de aditivos, como nitrito de sodio en combinación con hexamina, para prevenir el crecimiento de clostridios (Dunière et al., 2013). Otras medidas a tener en cuenta para obtener una buena calidad microbiológica de la leche son un buen diseño de las instalaciones y la aplicación de unas buenas prácticas de higiene en las explotaciones como pueden ser la limpieza de los establos, los equipos y salas de ordeño así como de las ubres de los animales antes del ordeño (Villar y Fernández, 1995). Algunos métodos de limpieza de las ubres incluyen el tratamiento con soluciones, espumas o toallas húmedas con desinfectantes que, aunque no eliminan totalmente la contaminación, la reducen considerablemente (Driehuis, 2013).

##### **1.4.2 Reducción de esporos butíricos mediante tratamientos físicos**

Los esporos butíricos tienen una elevada resistencia a los tratamientos de pasteurización, y aunque los tratamientos de esterilización pueden ser eficaces frente a los esporos, no son aplicables a las leches utilizadas para la fabricación de quesos por el efecto negativo de la alta temperatura sobre la coagulación de las caseínas (Skeie, 2010). Por ello, se han aplicado algunos métodos no térmicos para la eliminación de los esporos de la leche, entre los que destacan la microfiltración y la bactofugación.

En el proceso de microfiltración, la leche se hace pasar por una membrana con un tamaño de poro de 1,4  $\mu\text{m}$  de diámetro aplicando una presión alta. Este método se limita a la eliminación de esporos de la leche desnatada ya que, debido al tamaño del poro del filtro, no solo retiene las bacterias y los esporos sino también los glóbulos de grasa que tienen un tamaño de entre 1-10  $\mu\text{m}$  (Brändle, Domig y Kneifel, 2016). Según Villar y Fernández (1995) en la membrana quedan retenidos al menos el 99,5% de los esporos y bacterias presentes en la leche.

El proceso de bactofugación es el más utilizado para la eliminación de esporos de la leche y consiste en la centrifugación a elevada velocidad, aproximadamente 10.000 x g, quedando los esporos sedimentados debido a la diferencia de densidades entre estos y la leche. Simultáneamente, algunos de los ingredientes de la leche, en particular una parte de las proteínas, se pierden en el sedimento durante la bactofugación. Esta pérdida se puede minimizar esterilizando el sedimento con un tratamiento UHT y agregándolo de nuevo a la leche. Con esta técnica se pueden eliminar hasta el 98,7% de los esporos presentes en la leche (Brändle, Domig y Kneifel, 2016).

Las altas presiones hidrostáticas, probablemente el tratamiento no térmico de alimentos más desarrollado hasta hoy, se han comenzado a estudiar como una técnica para inhibir la germinación de los esporos butíricos. Así, en un estudio realizado en queso de oveja de pasta semidura (Ávila et al., 2016), la aplicación de un ciclo de alta presión  $\geq 300$  MPa durante 10 min a 14 °C a los 7 días de la fabricación, durante el proceso de maduración de los quesos, causó la inactivación de las células vegetativas de *C. tyrobutyricum* germinadas durante los primeros días de la maduración, impidiendo la fermentación butírica sin afectar a su calidad sensorial, aunque no se destruyeron los esporos.

### **1.4.3 Reducción de esporos butíricos mediante aditivos**

Los tratamientos físicos de microfiltración y bactofugación mencionados no eliminan al 100% los esporos butíricos de la leche, por lo que sigue existiendo la posibilidad de que se produzca el defecto de hinchazón tardía en los quesos, especialmente si la carga inicial de esporos en la leche es elevada. Para aumentar su efecto, estas técnicas se suelen emplear en combinación con aditivos como nitratos, lisozima o bacteriocinas (Brändle, Domig y Kneifel, 2016; Waes y Heddeghem, 1990). Esta combinación permite que estos aditivos se puedan emplear en menores cantidades, ya que hay que tener en cuenta que el tipo de aditivo y la concentración máxima permitida en la leche y el queso se encuentran regulados por la legislación europea (Reglamento (UE) n° 1129/2011).

El nitrato se añade a la leche como  $\text{KNO}_3$  (E252) o  $\text{NaNO}_3$  (E251), a una dosis máxima permitida en la leche de 150 mg/L (Reglamento (UE) n° 1129/2011). Durante la maduración del queso, el nitrato es reducido a nitrito por la enzima xantina-oxidasa de la leche, así como por algunas bacterias nitrato reductoras presentes en el queso (bacterias coliformes y lactobacilos). El nitrito es el compuesto que inhibe realmente el desarrollo de *Clostridium* en el queso, mediante un mecanismo que no está totalmente claro. Se ha propuesto que los nitritos impiden el aumento de tamaño del espora y su división en la última fase de la germinación, y también inhiben la actividad de algunas enzimas necesarias para la supervivencia de las células vegetativas. En algunos países su aplicación no está permitida ya que la Agencia de Seguridad Alimentaria Europea (EFSA 2010) recomendó minimizar su uso como aditivo alimentario, debido a que el nitrito puede reaccionar con aminos secundarios del queso formando nitrosaminas, que son potencialmente cancerígenas (Gómez Torres, 2017). Sin embargo, más recientemente, se ha reevaluado el efecto de estos compuestos, y la EFSA (2017) ha confirmado que los niveles actuales permitidos para nitratos y nitritos en los alimentos son suficientemente seguros para los consumidores.

Hoy en día existe una creciente demanda, por parte de los consumidores, de alimentos sin aditivos químicos. En este sentido, una estrategia alternativa para prevenir el defecto de hinchazón tardía es el uso de antimicrobianos naturales de origen animal, como la lisozima, o de origen microbiano, como las bacteriocinas (Gómez Torres, 2017). Aunque esta estrategia es más costosa que la bacto-fugación y menos efectiva que los nitratos (Brändle, Domig y Kneifel, 2016), la lisozima (E1105), que se obtiene de la clara de huevo de gallina, se utiliza cada vez más para prevenir la fermentación butírica. Esta enzima, que se agrega a la leche según el principio *quantum satis* (Reglamento (UE) n° 1129/2011) se une a las caseínas de la leche, quedando así retenida en la cuajada, donde es capaz de hidrolizar los enlaces glicosídicos  $\beta$  (1→4) de los polisacáridos de la pared celular de las células vegetativas de *Clostridium*, una vez que los esporos germinan. La lisozima también actúa inhibiendo el aumento de tamaño del espora en la última fase de la germinación. El problema del empleo de la lisozima como inhibidor de *Clostridium* es que puede plantear riesgos en personas alérgicas al huevo, aunque no está totalmente demostrado (EFSA, 2005; Iaconelli et al., 2008), y por ello, su uso está prohibido en algunas variedades de queso con Denominación de Origen Protegida (Gómez Torres, 2017).

La nisina (E234), producida por algunas cepas de *Lactococcus lactis*, es la bacteriocina mejor conocida y autorizada como conservante por la legislación europea a una dosis máxima de 12,5 mg/L (Reglamento (UE) n° 1129/2011). Los productores de quesos

pueden adicionar la nisina directamente a la leche o hacer uso de cultivos iniciadores productores de nisina. La nisina actúa formando poros en la membrana de las células vegetativas e inhibe el aumento del tamaño del esporo en la última fase de la germinación (Gómez Torres, 2017). Se están investigando otros tipos de bacteriocinas, como la reuterina procedente de *Lactobacillus reuteri* (Ávila et al., 2014) o la lacticina 3147 producida por *Lactococcus lactis* IFPL 3593 (Martínez-Cuesta et al., 2010). Sin embargo, los cultivos iniciadores productores de bacteriocinas no inhiben sólo los microorganismos patógenos y alterantes, sino que también inhiben a los propios cultivos iniciadores y de maduración, que son esenciales para la producción del queso. Por ello, se necesitan más estudios para poder incorporar estas bacteriocinas en la elaboración de los quesos, con el objetivo de evitar el crecimiento de los clostridios butíricos (Brändle, Domig y Kneifel, 2016).

En el estudio realizado por Ávila et al. (2014) se comparó el efecto inhibitorio de reuterina, nisina, lisozima y nitrato frente a células vegetativas y esporos de diferentes especies de *Clostridium*. En general, *C. sporogenes* y *C. beijerinckii* parecieron ser más resistentes a los antimicrobianos ensayados que *C. tyrobutyricum* y *C. butyricum*. La reuterina y la nisina, compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias lácticas, mostraron un espectro anticlostridial más amplio, inhibiendo el crecimiento de células vegetativas y esporos de todas las especies y cepas de *Clostridium* utilizadas, al menos a una de las concentraciones ensayadas. El nitrato sódico y, especialmente, la lisozima, tuvieron un efecto inhibitorio más limitado, siendo más efectivos contra las cepas de *C. tyrobutyricum*. Por estas razones, se concluyó que la reuterina y la nisina son las mejores candidatas para controlar el crecimiento de *Clostridium* y prevenir el defecto de la hinchazón tardía, aunque son necesarios más estudios para validar esta hipótesis, ya que la actividad antimicrobiana de estos compuestos depende de las propiedades físico-químicas particulares de cada queso.

### **1.5. Métodos de detección, cuantificación e identificación de clostridios butíricos**

La detección de bacterias butíricas en la leche es un gran desafío para los microbiólogos, debido al bajo número de esporos capaces de causar el defecto de la hinchazón tardía en el queso, por lo que se requiere un método de detección muy sensible. Se han realizado múltiples investigaciones para desarrollar métodos de cultivo adecuados para conseguir una buena sensibilidad en su detección. Sin embargo, los resultados siguen siendo bastante insatisfactorios, siendo los métodos existentes extremadamente lentos e inexactos. Además, aunque las técnicas moleculares más modernas son más rápidas, en comparación con los métodos de cultivos convencionales, aún son demasiado caras para su aplicación rutinaria. En general, la detección de la presencia de microorganismos en los alimentos es más fácil que

la cuantificación de los niveles de contaminación. Sin embargo, el objetivo principal para un control eficiente de la presencia de clostridios butíricos es el recuento de esporos en la leche destinada a la fabricación de queso, a pesar de que se encuentren en un nivel extremadamente bajo (Brändle, Domig y Kneifel, 2016). Así, podrá decidirse el destino de la leche en la industria, ya que una leche con una elevada contaminación butírica no debería ser utilizada en la elaboración de quesos de maduración larga.

### **1.5.1 Técnicas microbiológicas**

El método más utilizado para la detección de los clostridios butíricos en la leche es el cultivo en medio líquido y la interpretación por medio del procedimiento del “Número Más Probable” (NMP o MPN, del inglés *Most Probable Number*), basado en detectar la formación de gas en réplicas de un cierto número de tubos inoculados con diluciones seriadas de la muestra. Se han desarrollado varios métodos, que difieren principalmente en la composición y los procedimientos de los medios selectivos. Aunque no existe un método estándar internacional los enfoques básicos son muy similares. Los medios para lograr una selectividad suficiente para el crecimiento de los clostridios butíricos se caracterizan por la presencia de lactato como fuente de carbono disponible y un ajuste del pH del caldo a niveles similares a los de los quesos duros y semiduros (pH 5,4–5,5). Dependiendo del método, el tratamiento térmico de la muestra de leche previo al cultivo para la inactivación de las células vegetativas varía entre 75 °C y 80 °C durante un tiempo de 5 a 10 min, y los tiempos de incubación varían entre 3 y 7 días a 37 °C. La anaerobiosis se logra sellando los tubos con una capa de parafina o agar, que se desplaza con la formación de gas indicando el resultado positivo (Reindl et al., 2014). La estimación de la concentración de las bacterias se obtiene del patrón de la formación de gas en las diluciones seriadas y el uso de una tabla probabilística (Brändle, Domig y Kneifel, 2016; Reindl et al., 2014; Villar y Fernández, 1995).

Los inconvenientes que presenta el NMP son el prolongado tiempo de incubación de las muestras (7 días) y la laboriosidad e imprecisión inherentes al método, ya que pueden aparecer tanto falsos positivos debido a microorganismos resistentes al tratamiento térmico previo, como falsos negativos si el tiempo de incubación no ha sido suficiente para que se produzca la germinación. Se debe tener en cuenta que este método solo permite una estimación del número de esporos dentro de ciertos límites de confianza y, por lo tanto, no refleja el número real de esporos presentes en las muestras (Bergère y Sivelä, 1990). Además, tampoco permite identificar las especies de los clostridios butíricos causantes de la formación de gas.

Los recuentos en placa con el medio de cultivo RCM (*Reinforced Clostridial Medium*) también han sido utilizados como método de detección de clostridios butíricos. Jonsson (1990) realizó una modificación de estos métodos no selectivos con la adición de D-cicloserina para inhibir el crecimiento de bacilos facultativos anaerobios como *Bacillus* spp, y rojo neutro para la diferenciación de las colonias del género *Clostridium* que adquieren un color amarillo y son fluorescentes bajo luz ultravioleta en este medio. Los inconvenientes de este método son su baja sensibilidad y la necesidad de largos tiempos de incubación para el crecimiento de las colonias.

Bourgeois et al. (1984) propusieron un proceso más rápido como alternativa al NMP basado en la filtración de la leche a través de una membrana con una porosidad de 0,8  $\mu\text{m}$ , cultivando posteriormente el filtro en un medio selectivo en anaerobiosis a 37 °C. Este método tuvo diversas modificaciones. En una de ellas, se realizaba un tratamiento de la leche con tripsina y un surfactante para facilitar la filtración a través de la membrana y el filtro se transfería a un medio con agar RCM, D-cicloserina y el colorante ácido fucsina para la diferenciación de las colonias. Otra modificación fue la introducción de cloruro de calcio para mejorar la germinación de los esporos de *C. tyrobutyricum* (Brändle, Domig y Kneifel, 2016; Reindl et al., 2014). Reindl et al., 2014 desarrollaron una técnica de filtración con membranas, optimizada al incluir un paso de tratamiento ultrasónico durante la incubación con enzimas proteolíticas y detergentes. Las colonias que crecen después de la incubación anaeróbica a 37 °C durante 72 h, son de color rosado-rojo oscuro, convexas, redondeadas y con un diámetro de 1 a 3 mm. El método de filtración por membrana, cuyo riesgo de obtener falsos negativos es menor que en el método del NMP, tiene la desventaja de que no se puede utilizar cuando las muestras de leche han sido previamente congeladas, porque la floculación de las caseínas de la leche puede obstaculizar el proceso de filtración (Brändle, Domig y Kneifel, 2016).

Brändle et al. (2018) desarrollaron un método semiautomático basado en la técnica NMP realizando diluciones seriadas en un medio selectivo mejorado conteniendo un indicador de color para la identificación de las diluciones positivas, en lugar de medir la producción de gas como en el NMP. El dispositivo empleado, provisto con un software, realiza el cálculo automático de la concentración de esporos presentes en las muestras de leche. Con esta técnica consiguieron detectar y cuantificar los esporos butíricos reduciendo el tiempo de incubación de las muestras de leche a 48 h y obteniendo un límite de detección de 75 esporos/L.

Todos los métodos microbiológicos mencionados anteriormente poseen el inconveniente de que los resultados obtenidos difieren, en muchos casos, cuando los distintos métodos se aplican a una misma muestra de leche. El método de filtración, por ejemplo, es capaz de detectar un número de esporos entre 5 y 10 veces más bajo que el método del NMP, debido a que los procedimientos NMP se basan en una estimación probabilística y pueden ser detectados otros microorganismos productores de gas distintos de *C. tyrobutyricum* (Brändle, Domig y Kneifel, 2016).

### 1.5.2 Técnicas inmunológicas

Los inmunoensayos se basan en el uso de anticuerpos como elementos de detección gracias a su capacidad para unirse específicamente a moléculas complejas. Debido a su alta especificidad, sensibilidad y versatilidad, estos métodos se han vuelto muy populares en el campo de la Ciencia de los alimentos. En particular, la técnica *ELISA* es muy utilizada para la detección de alérgenos, es de fácil realización y permite la detección tanto cualitativa como cuantitativa de moléculas diana específicas. Además, estas técnicas son relativamente asequibles y producen resultados rápidos (Diaz-Amigo, 2010). La razón por la que estas técnicas no se pueden aplicar a la detección y cuantificación de clostridios butíricos es que el límite de detección es demasiado alto,  $10^3$ - $10^4$  células/mL, teniendo en cuenta que 50 esporos/L pueden causar defectos de hinchazón tardía en el queso (Brändle, Domig y Kneifel, 2016).

Como alternativa a los anticuerpos, Lavilla et al. (2009) produjeron péptidos específicos para la unión a esporos de *C. tyrobutyricum* que, en comparación con los anticuerpos, mostraron una mejor unión a los esporos. Posteriormente, dichos autores sugirieron la utilización de estos péptidos como una etapa de enriquecimiento mediante la separación biomagnética (Lavilla et al., 2012). En este método de separación, que podría ser combinado con métodos moleculares o inmunológicos posteriores, el recubrimiento de partículas paramagnéticas con ligandos específicos permite la separación de esporos de clostridios butíricos en matrices líquidas.

En otro estudio, Lavilla et al. (2010) investigaron el uso de la citometría de flujo combinada con el uso de anticuerpos policlonales específicos frente a *C. tyrobutyricum* marcados con fluorocromos (isotiocianato de fluoresceína y Alexa Fluor 488). Esta técnica permitió detectar esporos de *C. tyrobutyricum* en leche de vaca en 2 h, con un límite de detección de  $10^3$  esporos/100 mL de leche.

### 1.5.3 Técnicas moleculares

Debido a que los métodos microbiológicos son laboriosos, requieren mucho tiempo y no siempre son fiables, la aplicación de técnicas moleculares, basadas en el análisis de DNA, ha resultado ser una alternativa prometedora en la microbiología de los alimentos para superar estas desventajas. Concretamente, la reacción en cadena de la polimerasa o *Polymerase Chain Reaction* (PCR en inglés) se ha convertido en la técnica molecular más utilizada, puesto que permite obtener resultados en tiempos más cortos, y presenta excelentes límites de detección, elevada especificidad y un gran potencial para la automatización (Rodríguez-Lázaro et al., 2007).

La PCR fue desarrollada por el bioquímico Kary Banks Mullis en el año 1983 (Mullis et al., 1986). El método, que se realiza *in vitro*, consiste en la sucesión de ciclos repetitivos de desnaturalización, hibridación y extensión de un fragmento de DNA, denominado molde, proceso que es catalizado por una enzima DNA polimerasa termoestable. Este procedimiento realiza, con cada ciclo, una duplicación del fragmento del DNA molde, definido por las posiciones de los extremos 5' de los dos cebadores o *primers*, que son secuencias de oligonucleótidos que hibridan en las cadenas complementarias del DNA de la muestra. Este proceso, que se lleva a cabo durante 35-40 ciclos, hace que el fragmento de DNA aumente su concentración exponencialmente de forma muy específica.

La PCR convencional y otras variantes han sido ampliamente utilizadas para la detección de clostridios butíricos. Una variante es la PCR anidada, en inglés *nested PCR*, que consta de dos reacciones consecutivas, en las cuales el amplicón obtenido con un primer par de cebadores de la primera reacción sirve de molde para los *primers* de la segunda reacción, obteniéndose así un amplicón más corto y muy específico. Con esta técnica se han obtenido, por ejemplo, límites de detección para *C. tyrobutyricum* de 3-30 esporos/100 mL en leche cruda (Herman, De Block y Waes, 1995) y de 20-750 ufc/g en queso (Herman, De Block y Van Renterghem, 1997).

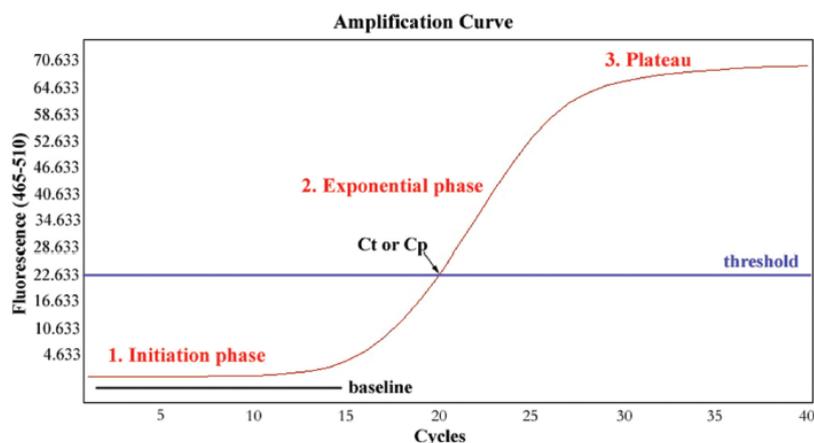
El principal inconveniente de los protocolos mencionados, teniendo en cuenta la existencia de diferentes especies de clostridios implicadas en el defecto de hinchazón tardía en quesos, es que son específicos para una sola especie. Cremonesi et al. (2012) superaron esta desventaja con el desarrollo de una PCR múltiple (*Multiplex PCR* en inglés), combinando varios *primers* específicos en un único ensayo de PCR para la detección simultánea de *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *C. sporogenes* y *C. tyrobutyricum*, en leche cruda, quesos y ensilados con un límite de detección de 10<sup>2</sup> ufc/mL.

Los métodos de PCR descritos tienen el inconveniente de que es necesaria la detección del producto de la amplificación mediante electroforesis en gel y tinción con una molécula fluorescente para la posterior observación bajo luz ultravioleta (Singh et al., 2014). Por lo tanto, se pueden sacar conclusiones sobre la ausencia o presencia de cierta(s) especie(s), pero no se proporciona información sobre la concentración inicial de DNA en la muestra analizada.

La PCR a tiempo real, en inglés *Real Time* PCR o *quantitative* PCR (qPCR), es una técnica molecular alternativa que ofrece importantes ventajas para la identificación y cuantificación de agentes bacterianos directamente en alimentos y resuelve algunas desventajas importantes de los métodos convencionales de PCR (Rodríguez-Lázaro et al., 2007). Permite una detección cuantitativa específica y rápida con una selectividad mejorada, y reduce el riesgo de contaminación cruzada y el tiempo de análisis, ya que no se requiere un procesamiento posterior al desarrollo de la PCR.

En la qPCR se realiza un seguimiento en tiempo real de la síntesis de nuevas moléculas del fragmento de DNA o amplicón, durante el desarrollo de la PCR, mediante el uso de fluorescencia, y no solo al final de la reacción (como ocurre en la PCR convencional). En este sentido, se han desarrollado diferentes estrategias de producción y detección de la fluorescencia como pueden ser los agentes intercalantes y las sondas específicas marcadas con fluorocromos. El agente intercalante más utilizado es el SYBR Green I, fluorocromo que produce fluorescencia cuando se intercala en la doble hélice de DNA, por lo que la intensidad de la señal de fluorescencia depende de la cantidad de DNA presente en la reacción. La principal desventaja de este método es que no es específico, ya que el fluoróforo se une a todos los fragmentos de DNA de doble hélice formados durante la reacción de PCR, es decir, productos de PCR no específicos y dímeros de *primers*, cuando se producen. Un ejemplo de sondas específicas marcadas con oligonucleótidos fluorescentes, son las sondas de hidrólisis o TaqMan, formadas por un fluoróforo unido covalentemente al extremo 5' de un oligonucleótido y un desactivador de fluorescencia llamado *quencher* en el extremo 3', que inhibe la señal fluorescente mientras están próximos el uno al otro. A medida que la polimerasa sintetiza la cadena en sentido 5'-3' (usando como molde la hebra en sentido 3'-5') la actividad exonucleasa de la enzima degrada la sonda TaqMan ya hibridada al DNA, lo que hace que se separe el fluoróforo permitiendo la emisión de fluorescencia al romper la proximidad de este con el *quencher*. La fluorescencia detectada es directamente proporcional a la cantidad de fluoróforo liberado y, por lo tanto, a la cantidad de DNA de interés presente en el producto de la PCR (Arya et al., 2005; Rodríguez-Lázaro y Hernández, 2013).

Los resultados de la qPCR se plasman en curvas de amplificación como se muestra en la Figura 5, que pueden usarse para cuantificar las cantidades iniciales de las moléculas de DNA molde con alta precisión, en un amplio rango de concentraciones.



**Figura 5.** Fases de una curva de amplificación por qPCR. Rojo: amplificación de una muestra positiva. Azul: umbral. Negro: ciclos basales (Rodríguez-Lázaro y Hernández, 2013).

En la fase de iniciación, la fluorescencia emitida no se distingue de la línea base por no haber suficiente DNA replicado. Durante la fase de amplificación la fluorescencia aumenta de forma exponencial llegando a un punto que se vuelve medible llamado punto de cruce, ciclo umbral o *threshold cycle* (Ct). En la última fase, o fase meseta, deja de observarse el aumento de la fluorescencia debido al agotamiento de los reactivos.

Por lo tanto, mediante el uso de diluciones en serie de cantidades conocidas de DNA, se puede trazar una curva estándar de concentración logarítmica frente a Ct y calcular la concentración de DNA de la muestra desconocida interpolando el valor Ct obtenido en la qPCR para dicha muestra (Arya et al., 2005, Singh et al., 2014). El coeficiente de correlación  $R^2$  obtenido en la regresión lineal se utiliza para determinar la linealidad del ensayo de qPCR. Además, con la curva estándar se puede calcular también la eficiencia de la reacción, que viene dada por la ecuación:

$$E = 10^{-1/\text{pendiente}} - 1.$$

Si la eficiencia es del 100%, es decir, a partir de una molécula de DNA molde se obtienen dos por la acción de la DNA polimerasa en cada ciclo, entonces la pendiente de la curva es  $-3.3219$  (Rodríguez-Lázaro y Hernández, 2013).

Cuando se usa el SYBR Green I como agente intercalante, la presencia de cualquier fragmento de doble hebra de DNA formado genera fluorescencia, por lo que la especificidad de este ensayo se puede ver enormemente disminuida debido a la amplificación de productos de PCR inespecíficos y dímeros de *primers*. Por tanto, es conveniente hacer una verificación

de los productos obtenidos, que se puede lograr trazando una curva de fluorescencia en función de la temperatura, llamada *melt curve*. Como ya se ha mencionado, el SYBR Green I sólo se une a las hebras de doble hélice, las cuales se desnaturalizan con el aumento de la temperatura, lo que produce una disminución de la fluorescencia. La temperatura a la cual el 50% del DNA es monocatenario se denomina temperatura de *melting* ( $T_m$ ), que es característica de cada amplicón, por lo que nos permite distinguir si el producto de qPCR obtenido es el que nos interesa o si se trata de un producto inespecífico o un dímero de los *primers* (Arya et al., 2005, Rodríguez-Lázaro y Hernández, 2013).

La qPCR se ha utilizado para la detección y cuantificación de esporos de *Clostridium* en muestras de leche contaminadas artificialmente. López-Enríquez, Rodríguez-Lázaro y Hernández (2007) detectaron *C. tyrobutyricum* en leche cruda y UHT con un límite de detección de 25 esporos/25 mL utilizando *primers* específicos del gen de la flagelina (*fla*). Bassi et al. (2013) fueron capaces de detectar *C. tyrobutyricum* en leche con un límite de detección de 14 ufc/mL mediante TaqMan® Real Time-PCR utilizando *primers* específicos dirigidos al gen de la fosfotransacetilasa (*pta*), aunque solamente analizaron 10 muestras de leche cruda contaminadas naturalmente. Más recientemente, también mediante TaqMan®-Real Time-PCR, se ha logrado la cuantificación simultánea de *C. beijerinckii* (gen *nifH*), *C. sporogenes* (gen *gerAA*) y *C. tyrobutyricum* (gen *enr*) en leche cruda con límites de detección de entre 2-300 ufc/50 mL, dependiendo de las especies (Morandi et al., 2015).

### **1.6. Métodos de extracción de DNA de esporos butíricos**

Uno de los principales problemas relacionados con el análisis molecular de microorganismos presentes en matrices alimentarias es el aislamiento de suficiente DNA de buena calidad. Algunos métodos incluyen aislamiento en cultivo y enriquecimiento del DNA de los cultivos puros. Sin embargo, si un microorganismo no es cultivable, el DNA debe ser extraído directamente de la muestra del alimento. Además, en el caso de los clostridios butíricos, debido a la baja concentración de esporos presentes en las muestras, otra limitación es la obtención de un concentrado de esporos que pueda ser procesado, para lo cual se hace necesaria la aplicación de algún tratamiento previo a la muestra del alimento. El hecho de que los clostridios butíricos causan el problema de la hinchazón cuando están en la leche en forma de esporos, que son precisamente los que se quieren detectar, hace que el proceso de extracción de DNA sea aún más complicado, debido a su resistencia al estrés químico y mecánico (Brändle, Domig y Kneifel, 2016). Por ello, se han desarrollado diferentes métodos de concentración y de ruptura de esporos butíricos, entre los que se encuentran tratamientos enzimáticos, mecánicos y térmicos.

En el trabajo mencionado anteriormente, Bassi et al. (2013) desarrollaron un método para la extracción de DNA tanto de células vegetativas como de esporos de *C. tyrobutyricum* en alimentación animal, heces, leche y queso curado para el análisis mediante qPCR, combinando el tratamiento enzimático con lisozima y la ruptura mecánica mediante agitación con microesferas (*bead beating*) de zirconita y cerámica. En dicho estudio, el tratamiento previo realizado a la leche para conseguir la concentración de los esporos se realizó mediante centrifugación de las muestras y eliminación del sobrenadante.

En el estudio realizado por Esteban et al. (2020) se compararon diferentes métodos de extracción de DNA de esporos de *C. tyrobutyricum* en leche. Los métodos que dieron los mejores resultados fueron el calentamiento con microondas y la ruptura mediante *bead beating*. Además, las muestras de leche fueron tratadas con subtilisina, una proteasa no específica, diluida en un tampón conteniendo un detergente, en un paso previo a la centrifugación para la concentración de los esporos. Este tratamiento supuso un enfoque novedoso demostrando que dicho tratamiento era más eficiente en la recuperación de los esporos de las muestras que la sola centrifugación (Bassi et al., 2013; Morandi et al., 2015), ya que la proteasa y el detergente favorecen que los esporos se liberen de la grasa y de las proteínas lácteas y precipiten. Además, es más sencillo que otros tratamientos descritos anteriormente consistentes en un gran número de etapas (López-Enríquez, Rodríguez-Lázaro y Hernández, 2007).

Estos métodos de extracción descritos por Esteban et al. (2020) que se completaron con una purificación posterior del DNA obtenido antes de su análisis por qPCR, suponen un gran avance en la cuantificación de los clostridios butíricos, reduciendo el tiempo de análisis debido a la posibilidad de la extracción del DNA directamente de las muestras. Aun así, se debe mejorar la metodología para una mayor eficiencia y rapidez en la detección y cuantificación de los esporos butíricos. Para ello, en el presente trabajo se ha evaluado un protocolo que permite la extracción y purificación del DNA de esporos de clostridios butíricos en leche cruda, utilizando el equipo *King Fisher Duo System* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.), instrumento semiautomatizado que utiliza la tecnología de la separación magnética de partículas para el aislamiento de biomoléculas incluyendo DNA, RNA, proteínas o células. Además, este trabajo pretende ser el primer estudio de análisis de clostridios butíricos mediante qPCR realizando un amplio muestreo de leches crudas sospechosas de estar contaminadas con clostridios butíricos.

## **2. OBJETIVOS**

El objetivo general de este trabajo ha sido desarrollar un método rápido de detección y cuantificación de esporos de clostridios butíricos en leche cruda de vaca y oveja basado en la técnica de PCR a tiempo real (qPCR).

Para ello se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

1- Evaluación de un método de extracción y purificación de DNA de esporos de *C. tyrobutyricum* presentes en leche, basado en la utilización de partículas magnéticas.

2- Optimización de los parámetros de la qPCR para la detección de esporos de *C. tyrobutyricum* en leche.

3- Análisis de muestras de leche cruda de vaca y oveja sospechosas de contaminación con esporos butíricos mediante qPCR y métodos microbiológicos.

4. Identificación de las especies de clostridios butíricos presentes en las muestras.

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. Obtención de esporos de clostridios butíricos a partir de células vegetativas.**

#### ***3.1.1. Cultivo de células vegetativas de *C. tyrobutyricum****

Las células vegetativas utilizadas en este trabajo se obtuvieron del cultivo de las cepas de *C. tyrobutyricum* CECT 4012 procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España) y de *C. tyrobutyricum* UZ01 (Universidad de Zaragoza), que había sido aislada previamente por el grupo de investigación de una leche cruda de vaca procedente de la Asociación Interprofesional Lechera de Aragón, AILA (Movera, España). El cultivo de la cepa CECT 4012 se realizó en campana de flujo laminar PV-30/70 (Telstar Industrial, Terrasa, España) y para ello se inoculó una crioperla del criovial en 9 mL de caldo de cultivo *Reinforced Clostridial Medium* (RCM) (Scharlab, Barcelona, España) en un tubo de ensayo previamente esterilizado. Se añadió una capa de parafina (Panreac, Barcelona, España) de aproximadamente 1,5 cm de espesor para generar las condiciones de anaerobiosis. El cultivo se mantuvo como mínimo durante 48 h a 37 °C en una estufa bacteriológica Incubat (Selecta, Barcelona, España), hasta observar la aparición de turbidez, formación de gas, desplazamiento de la parafina y aparición de olor a ácido butírico producido por el crecimiento de los clostridios.

### 3.1.2. Esporulación de células vegetativas y obtención de esporos

El proceso de esporulación de las dos cepas de *C. tyrobutyricum* se llevó a cabo siguiendo un procedimiento que combinaba los métodos de Lavilla (2008) y Bassi, Cappa y Coconcelli (2013). Se tomaron 9 mL del precultivo de 48 h, obtenido como se ha descrito, y se introdujeron en un dispositivo de esporulación, que consistía en una membrana de diálisis de celulosa Cellu Sep<sup>®</sup> de 12-14 kDa de punto de corte (Scienova GmbH, Jena, Alemania) introducida en una botella de vidrio de 500 mL conteniendo el medio de cultivo glucosa-triptona-extracto de levadura (TGE), previamente esterilizados. La botella se cerró y se introdujo en una jarra de anaerobiosis Gaspak<sup>™</sup> de 2,5 L (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) junto con un sobre generador de anaerobiosis AnaeroGen<sup>™</sup> de 2,5 L (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) y se mantuvo durante un mes a 37 °C en estufa bacteriológica.

Una vez pasado el tiempo de esporulación se traspasó el contenido de la membrana de diálisis a un tubo de 50 mL estéril. Se tomaron 10 µL de la suspensión para verificar al microscopio la presencia de esporos y proceder a su aislamiento. El resto de la suspensión se centrifugó en centrífuga Megafuge 1.0R Heraeus (Kendro, Langensfeld, Alemania) a 4.000 x g, durante 10 min a 4 °C y se lavó dos veces con tampón fosfato salino (PBS) estéril compuesto por KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM, NaCl 140 mM y KCl 2,7 mM, pH 7,4, descartando el sobrenadante.

Para liberar los esporos de las células vegetativas fue necesario realizar una etapa de lisis enzimática. La suspensión de esporos, tras el lavado, se llevó a 100 mL con PBS estéril y se le añadió una solución de lisozima (Sigma-Aldrich, Madrid, España) para alcanzar una concentración final de 0,4 mg/mL, incubando la mezcla 24 h a 45 °C en estufa bacteriológica. Tras las 24 h de incubación, se traspasó la suspensión bacteriana a un tubo de 50 mL para su centrifugación a 4.000 x g, durante 15 min a 4 °C con el objetivo de eliminar los restos de lisozima y membranas celulares. Se descartó el sobrenadante y a continuación se realizaron dos lavados con PBS. El precipitado obtenido, conteniendo los esporos, se resuspendió en 2 mL de PBS. Con el objetivo de separar los restos celulares de los esporos se realizó un gradiente de Percoll<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich). Para ello se prepararon diferentes soluciones de Percoll<sup>®</sup>: 1,13, 1,10, 1,09, 1,07 y 1,05 g/mL de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$V_0 = V * (p - 0,1 * p_{10} - 0,9) / (p_0 - 1)$$

$V_0$  = volumen de Percoll<sup>®</sup> puro (mL)

$V$  = volumen de solución que se va a preparar (mL)

$p$  = densidad que se quiere preparar (g/mL)

$p_{10}$  = densidad del agua (1 g/mL)

$p_0$  = densidad del Percoll<sup>®</sup> puro (1,13 g/mL) a 20 °C

Una vez realizadas las diluciones se añadieron 8 mL de cada una de ellas, de la más densa a la menos densa, en un tubo de 50 mL. Este proceso se realizó lentamente para evitar que se mezclasen las diferentes soluciones. Se añadieron en la parte superior los 2 mL del lisado de esporos y células vegetativas, y el tubo se centrifugó a 4.000 x g, durante 45 min a 4 °C, sedimentando los esporos en el fondo del tubo y quedando los restos celulares retenidos en las diferentes capas del gradiente. Se descartó el sobrenadante y el precipitado obtenido se traspasó a un microvial donde se lavó 3 veces con 500 µL de PBS estéril realizando centrifugaciones de 10 min a 13.000 x g en una microcentrífuga Biofuge Pico (Heraeus, Hanau, Alemania). Finalmente, los esporos se resuspendieron en 200 µL de PBS estéril y se contaron en cámara de Thoma en un microscopio ECLIPSE E400 (Nikon, Tokio, Japón). Los esporos se conservaron a -20 °C hasta su utilización en los diferentes ensayos. La fórmula utilizada para calcular el número de esporos/mL a partir de la cámara de Thoma es la siguiente:

$$\text{N}^\circ \text{ esporos/mL} = [(\text{n}^\circ \text{ esporos contados}) / (0,25 \cdot 10^{-6} \cdot \text{n}^\circ \text{ cuadrados contados})] \cdot \text{dilución}$$

### **3.2. Muestras de leche procedentes de Asociaciones Interprofesionales lecheras**

Las muestras de leche que fueron analizadas, sospechosas de contaminación con clostridios butíricos, fueron cedidas por dos laboratorios:

- Asociación Interprofesional Lechera de Aragón, AILA (Movera, España) que suministró leches crudas de vaca.
- Instituto Lactológico de Lekunberri, ILL (Lekunberri, España) que suministró leches crudas de oveja.

Todas las muestras, que contenían como conservante azidiol, se conservaron hasta su análisis a 4 °C o -20 °C y fueron codificadas con las letras A (Aragón) o L (Lekunberri) seguida de la fecha en la que fueron recibidas (año/mes/día) y un número correlativo desde el 1 hasta el número total de muestras recibidas cada día. (AXXYYZZ-w, LXXYYZZ-w).

Inicialmente, las muestras fueron tratadas en un baño termostático a 90 °C durante 10 min para inactivar las células vegetativas presentes. A continuación, se tomaron diferentes alícuotas en microviales de 2 mL y se almacenaron a -20 °C hasta su posterior análisis. En muchos de los casos el análisis de las muestras se realizó el mismo día de su llegada al laboratorio y el volumen de muestra remanente se congeló a -20 °C por si era necesario repetir algún análisis.

### **3.3. Extracción y cuantificación del DNA de los esporos de clostridios butíricos**

Con el objetivo de evaluar la utilización del método King Fisher Duo para la extracción de DNA de los esporos de clostridios butíricos, se analizaron muestras de leche cruda de vaca (previamente analizada para comprobar la ausencia de contaminación butírica) contaminadas artificialmente con esporos butíricos de *C. tyrobutyricum* CECT 4012 y *C. tyrobutyricum* UZ01. Estos se añadieron en concentraciones de  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$  esporos/mL, para la realización de la recta de calibrado de la qPCR. El volumen final utilizado fue de 1 mL para cada una de las suspensiones de esporos. Además, se realizó la calibración en leche UHT añadiendo las mismas cantidades de esporos en un volumen final de 175  $\mu$ L (cantidad máxima de los viales de *bead beating* empleados) para cada una de las suspensiones, sin realizar el tratamiento con subtilisina aplicado a la leche cruda como se describe en el apartado 3.3.1.

#### **3.3.1. Tratamiento de las muestras de leche con subtilisina**

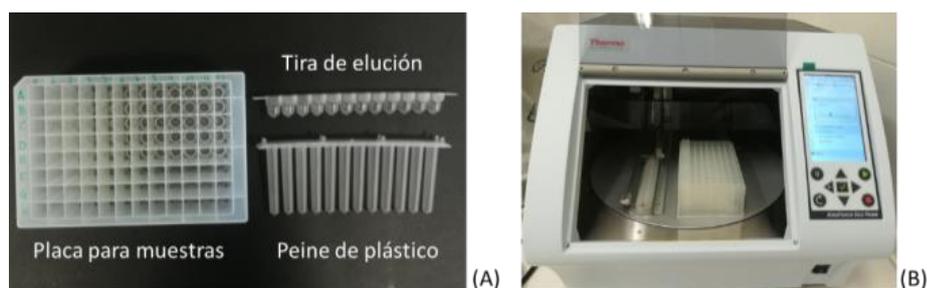
Después de adicionar los esporos a la leche cruda los microviales se agitaron durante 30 min a temperatura ambiente en un rotatubos Movil-Rod (Selecta) y a continuación se trataron con subtilisina. La subtilisina es una proteasa no específica que degrada las proteínas de la leche y se utiliza en los laboratorios interprofesionales para el tratamiento de las leches en el recuento de bacterias totales con el equipo BactoScan (Foss, Hilleroed, Dinamarca) en los análisis rutinarios para el control de calidad de las leches. Para la digestión de la leche, la subtilisina se diluyó con el tampón suministrado por el fabricante en una proporción 1:28 (v/v) y a continuación se añadió a las muestras en una proporción 1:1 (v/v). La mezcla se incubó en un baño termostático (Selecta) a 60 °C durante 30 min, se centrifugó a 13.000 x g durante 30 min, se descartó el sobrenadante y finalmente, el precipitado de esporos obtenido se resuspendió en 100  $\mu$ L de PBS estéril.

#### **3.3.2. Extracción y purificación del DNA con el método King Fisher Duo**

Esta etapa se realizó con el MagMax total nucleic acid isolation kit (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para cada muestra se preparó un tubo de *bead beating* que contiene bolas de zirconita, al que se añadió una solución formada por 232  $\mu$ L de Lysis/binding Solution Concentrate y 3  $\mu$ L de Carrier NA. A estos tubos se les añadieron los 100  $\mu$ L de la suspensión obtenida en el procedimiento anterior o 175  $\mu$ L en el caso de la leche UHT, se agitaron en un agitador Precellys 24 (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Francia) durante 1 min a 6.500 x g produciéndose así la ruptura de

los esporos con las bolas de zirconita. El extracto obtenido se mantuvo en hielo hasta su centrifugación durante 3 min a 13.000 x g, justo antes de continuar con la siguiente etapa.

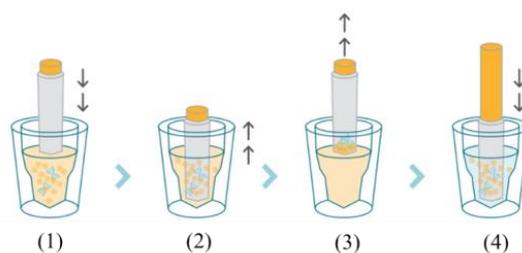
A continuación, se procedió a preparar la placa que se procesará en el equipo automático King Fisher Duo (Figura 6). Esta placa consta de 8 filas con 12 pocillos cada una, con lo que se pudieron analizar 12 muestras en cada placa de análisis. En la fila A se colocaron 115  $\mu$ L del sobrenadante anterior junto con 65  $\mu$ L de isopropanol y 20  $\mu$ L de Bead Mix formada por 10  $\mu$ L de micropartículas magnéticas que se unen al DNA y 10  $\mu$ L de Lysis Binding Enhancer provisto por el kit. En las filas B y C se colocaron 150  $\mu$ L de Wash Solution 1 para el primer y segundo lavado, respectivamente. En las filas D y E se colocaron 150  $\mu$ L de Wash Solution 2 para los dos lavados posteriores. Las filas F y G se dejaron vacías y en la fila H se colocó el peine de plástico. Además, se colocaron 90  $\mu$ L de Elution Buffer en la tira de elución, que consta igualmente de 12 pocillos, uno para cada muestra. Finalmente, se introdujeron la placa y la tira de elución en la posición correspondiente del equipo King Fisher Duo y se ejecutó el programa MagMax pathogen que tuvo una duración de 27 min.



**Figura 6.** (A) Accesorios y (B) equipo King Fisher Duo empleado para la extracción y purificación del DNA de esporos de clostridios butíricos en muestras de leche cruda de vaca y oveja.

En el proceso de extracción y purificación de DNA con el sistema King Fisher Duo (Figura 7), en primer lugar, las partículas magnéticas se mezclan con la muestra. Luego las varillas magnéticas del equipo se sumergen en la solución y recogen, en la parte inferior del peine, las partículas magnéticas unidas al DNA, que son transferidas a los pocillos de las filas siguientes donde son tratadas con las soluciones de lavado correspondientes. Finalmente, el DNA es depositado en el tampón contenido en la tira de elución.

Una vez terminado el ciclo de extracción y purificación del DNA se llevó el contenido de la tira de elución a microviales de 1,5 mL y se procedió a la centrifugación durante 3 min a 13.000 x g con el fin de eliminar posibles restos de partículas magnéticas. El sobrenadante se traspasó a otro microvial y se utilizó para la realización de la qPCR.



**Figura 7.** Esquema de funcionamiento del sistema King Fisher Duo empleado para la extracción y purificación del DNA de esporos de clostridios butíricos. (1): Las partículas magnéticas son mezcladas con el DNA de la muestra mediante el peine de plástico (cilindro de color gris) y las varillas magnéticas del equipo (cilindro de color naranja). (2) y (3): El DNA unido a las partículas magnéticas es recogido en la punta del peine de plástico. (4): El DNA y las partículas magnéticas son depositadas en el siguiente pocillo de la placa para su lavado. Thermo Fisher Scientific (2019).

### 3.3.3. Cuantificación de las muestras con PCR a tiempo real.

La qPCR se llevó a cabo en el termociclador StepOne™ Real-Time PCR System de Applied Biosystems™ (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) en placas de 48 pocillos MicroAmp™ Fast Optical de Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific). La mezcla de reacción, para cada muestra, estaba compuesta por 12,5 µL de Master Mix SYBR® Green PowerUp, 4,5 µL de agua libre de DNasa/RNasa y 1,5 µL de cada *primer CTfla F (forward)* 10 µM y *CTfla R (reverse)* 10 µM (todos los reactivos de Thermo Fisher Scientific). Estos *primers* empleados fueron los correspondientes al gen de la flagelina, *CTfla*, de *C. tyrobutyricum* cuyas secuencias descritas en el estudio de López-Enríquez, Rodríguez-Lázaro y Hernández (2007) se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Secuencia de *primers* para *C. tyrobutyricum*.

<i>Primer</i>	Tipo	Secuencia
<b>CTfla F</b>	Forward	5'-CAGTTACAATTACGAGAACACATGGA-3'
<b>CTfla R</b>	Reverse	5'-TGTACCACCAACTAAAGCAACATCA-3'

A estos 20 µL de mezcla de reacción se les añadieron 5 µL del DNA extraído de las muestras según el procedimiento anterior, 5 µL de agua libre de DNasa/RNasa para el control negativo y 5 µL de una solución de DNA de células vegetativas de *C. tyrobutyricum* CECT 4012 como control positivo, siendo así el volumen final en cada pocillo de 25 µL. La placa se centrifugó en una centrífuga Jouan (Izasa, Barcelona, España) durante 1 min a 2.000 x g. Todas las muestras, así como los controles, fueron amplificadas por duplicado siguiendo el siguiente programa de amplificación: una etapa inicial que activa la enzima uracilo-DNA-glicosilasa (UNG), una segunda etapa de desnaturalización y después 45 ciclos de amplificación, con una desnaturalización, hibridación y polimerización, tal y como se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Condiciones de la qPCR para amplificación del gen *CTfla* de *C. tyrobutyricum* (López-Enríquez, Rodríguez-Lázaro y Hernández, 2007).

N° de ciclos	Activación		Desnaturalización		Hibridación		Polimerización	
	T(°C)	Tiempo (min)	T (°C)	Tiempo	T (°C)	Tiempo (min)	T(°C)	Tiempo (min)
1	50	2	-	-	-	-	-	-
1	-	-	95	10 min	-	-	-	-
45	-	-	95	15 s	60	1	60	1

El valor del *threshold cycle* (Ct) se obtuvo de la curva de amplificación y fue inversamente proporcional al número de copias de DNA. Después de los 45 ciclos de amplificación, comenzó el proceso de *melt curve*, que proporcionó la Tm, temperatura a la que el 50% de las moléculas de DNA se desnaturalizan. Cada fragmento amplificado tiene una Tm característica, que depende sobre todo de su longitud y de la composición de sus bases (Costa, 2004) y sirve para ratificar que el amplicón que se ha producido es el previsto. Con los valores de Ct se obtuvieron las rectas de calibrado, permitiendo calcular la eficiencia de la qPCR. Además, se calculó el límite de detección de la qPCR, definido como la concentración más baja a la cual el 95% de las muestras positivas son detectadas (Bustin et al., 2009).

Una vez realizados los ensayos con las muestras contaminadas artificialmente y después de comprobar que este método era adecuado para el objetivo del estudio, se procedió a analizar las leches crudas de vaca y oveja sospechosas de estar contaminadas con esporos butíricos, comenzando con el tratamiento de las muestras (V = 1 mL) con subtilisina, como se ha descrito en el apartado 3.3.1.

### **3.4. Análisis microbiológico de leches crudas**

En este estudio se pretendió corroborar mediante cultivo microbiológico el resultado de la qPCR. Además, se aprovechó el cultivo para identificar, a nivel de especie, los clostridios butíricos presentes en las muestras de leche cruda con el fin de observar si la contaminación se debía principalmente a *C. tyrobutyricum* o había otras especies implicadas. Para ello, se realizó PCR múltiple utilizando *primers* específicos para las especies: *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. sporogenes* y *C. beijerinckii*, ya que, según la literatura, estas son las especies de clostridios que más habitualmente producen la fermentación butírica.

En primer lugar, se hizo un precultivo de las muestras en tubos de ensayo con 9 mL de medio RCM estéril al que se añadieron 0,5 mL de la leche tratada térmicamente, como se ha descrito anteriormente. A cada tubo se le añadió una capa de parafina líquida de aproximadamente 1,5 cm de espesor para generar anaerobiosis y se incubó al menos durante

48 h a 37 °C en estufa bacteriológica, hasta observar la aparición de turbidez y en algunas muestras, la aparición de gas, desplazamiento de parafina y olor a ácido butírico.

Después de este tiempo, se hizo una siembra a partir del contenido de los tubos de precultivo en medio sólido. Se sembraron 100 µL mediante siembra en superficie con asa de Digrafsky y a su vez se hizo otra siembra por agotamiento en placas de Petri previamente preparadas con medio agar RCM, suplementado con D-cicloserina (Thermo Fisher Scientific) a una concentración de 200 µg/mL para las muestras de leche de vaca y 100 µg/mL para las muestras de leche de oveja, y rojo neutro (Sigma-Aldrich) a una concentración de 50 µg/mL (Jonsson, 1990). La D-cicloserina es un antibiótico que se utiliza para inhibir el crecimiento de otras bacterias anaerobias facultativas que pudieran estar presentes en la leche como *Bacillus* spp. El rojo neutro es un indicador de pH que vira a amarillo con la disminución de pH debida a la producción de ácido. Estas soluciones fueron esterilizadas previamente mediante filtros de 0,22 µm (Merk KGaA). Todas las placas se incubaron en jarras de anaerobiosis Gaspak™ de 2,5 L en las que se introdujo un sobre generador de anaerobiosis durante 4-5 días a 37 °C.

Una vez pasado el tiempo de incubación se observaron las colonias que habían crecido en el medio selectivo. Las colonias de las bacterias butíricas que crecen en el medio sólido con RCM, D-cicloserina y rojo neutro, son de color amarillo, y cuando se exponen bajo luz ultravioleta son fluorescentes.

### **3.5. Aislamiento y análisis de colonias de clostridios butíricos por PCR.**

Se seleccionaron tres colonias amarillas fluorescentes de cada una de las muestras y se pusieron en un microvial con 50 µL de PBS estéril para su resuspensión. La mezcla se calentó a 100 °C durante 15 min con el fin de producir la ruptura de las células para la extracción del DNA (Ribeiro Junior et al., 2016), y posteriormente se introdujeron durante 5 min a -20 °C. A continuación, los restos celulares se centrifugaron 5 min a 10.000 x g y el sobrenadante obtenido se utilizó para la realización de la PCR.

#### **3.5.1. PCR múltiple de especies**

La PCR se llevó a cabo en el termociclador DNA Engine Peltier (Laboratorios Bio Rad, Alcobendas, España). La mezcla de reacción, para cada muestra, estaba compuesta por 12,5 µL de Máster Mix 2X, 0,5 µL de *primer forward* de cada una de las especies (*C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. sporogenes* y *C. beijerinckii*), 0,5 µL de *primer reverse* de cada una de las especies y 6,5 µL de agua libre de DNasa/RNasa (todos los reactivos de Thermo Fisher Scientific). Las secuencias y concentraciones de los *primers* se indican en la

Tabla 3. Se utilizaron 2  $\mu$ L del sobrenadante de cada muestra obtenido, como se ha indicado en el punto anterior, 2  $\mu$ L de agua libre de DNasa/RNasa para el control negativo y 2  $\mu$ L de una suspensión de esporos de *C. tyrobutyricum* a una concentración de  $10^6$  esporos/100  $\mu$ L tratados con microondas durante 15 min a 600 W, como control positivo.

**Tabla 3.** Secuencias y concentraciones de los *primers* utilizados en la PCR múltiple y genes de amplificación: *colA*, colagenasa; *nifH*, proteína de hierro de la nitrogenasa; *hydA*, hidrogenasa; *enr*, 2-enolato reductasa (Cremonesi et al., 2012).

<i>Primer</i>	gen	Secuencia (5'-3')	Concentración ( $\mu$ M)	Tamaño esperado (bp)
<b>CI-SPOR-F3031</b> <b>CI-SPOR-R3579</b>	<i>colA</i>	TTGGGATTTTGGGGATAACA TCCGTATCGTGTGTCGCTTG	30	549
<b>CI-BEIJ-F363</b> <b>CI-BEIJ-R820</b>	<i>nifH</i>	TGACACGATTTTTCATTCTCCA TCCATTGCCTTAATGACAGGT	20	448
<b>CI-BUTY-F1329</b> <b>CI-BUTY-R1640</b>	<i>hydA</i>	ATGGGTTAGGCAAGCAGAAA GCTGGATCTGCCTTCTCATC	15	312
<b>CI-TYRO-F1253</b> <b>CI-TYRO-R1462</b>	<i>enr</i>	TGGTGTTCCACAAGAAGCTG GCAGCTGGATTACTGCACA	15	210

El programa de amplificación utilizado en el termociclador fue el descrito por Cremonesi et al. (2012) y constaba de una etapa inicial de desnaturalización, seguida de 30 ciclos de amplificación y una etapa final de extensión, cuyas condiciones se describen en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Condiciones de la PCR múltiple.

N° de ciclos	Desnaturalización		Hibridación		Polimerización		Extensión	
	T (°C)	Tiempo (min)	T (°C)	Tiempo (min)	T (°C)	Tiempo (min)	T (°C)	Tiempo (min)
<b>1</b>	94	2	-	-	-	-	-	-
<b>30</b>	94	1	56	1	72	1	-	-
<b>1</b>	-	-	-	-	-	-	72	5

### 3.5.2. Visualización de los productos de PCR en gel de agarosa

Los productos amplificados en la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%. La formación del gel se realizó diluyendo 3 g de agarosa en 100 mL de tampón tris-borato-EDTA (TBE) 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM; pH 8,3). Posteriormente se añadieron 8  $\mu$ L de SYBR<sup>®</sup> Safe (Thermo Fisher Scientific) y se dejó solidificar en el soporte de electroforesis por un tiempo mínimo de 30 min. Como marcador de pesos moleculares se utilizó PCR 100 bp DNA Low Ladder (Sigma-Aldrich) y como tampón de carga azul de bromofenol 0,25% (p/v), xileno cianol FF 0,25% (p/v) y glicerol 15% (p/v) en agua estéril. Para preparar las muestras, 10  $\mu$ L de DNA amplificado de

cada muestra se mezclaron con 2  $\mu\text{L}$  de tampón de carga, y 5  $\mu\text{L}$  del marcador de pesos moleculares se mezclaron con 5  $\mu\text{L}$  de agua libre de DNasa/RNasa y 2  $\mu\text{L}$  de tampón de carga.

El gel se colocó en la cubeta de electroforesis Sub-Cell GT (Laboratorios Bio-Rad), la cual se llenó con TBE 1X y se procedió a cargar 10  $\mu\text{L}$  de las muestras y del marcador de pesos moleculares preparados como se ha indicado. El sistema se sometió a un voltaje de 85 V durante 45 min. La visualización de las bandas de DNA se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta UVP BioDoc-It Imaging Systems (Analytik Jena, Jena, Alemania).

### 3.5.3. Identificación de especies mediante secuenciación del gen 16S rDNA bacteriano

Para la identificación de especies mediante secuenciación del gen del ribosoma 16S en primer lugar se realizó la PCR en el termociclador DNA Engine Peltier. Se mezclaron 2  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de cada muestra, obtenido tal y como se describe en el apartado 3.5, con 23  $\mu\text{L}$  de mezcla de reacción que contenía 12,5  $\mu\text{L}$  de Máster Mix 2X, 1,5  $\mu\text{L}$  del *primer* P1 10  $\mu\text{M}$ , 1,5  $\mu\text{L}$  del *primer* P6 10  $\mu\text{M}$  (Thermo Fisher Scientific) y 7,5  $\mu\text{L}$  de agua libre de DNasa/RNasa. Los *primers* que se emplearon fueron los descritos por Guerrieri et al. (2020) (Tabla 5) y el programa de amplificación de la PCR fue el descrito en el apartado anterior para la PCR múltiple (Tabla 4) con una temperatura de hibridación de 55  $^{\circ}\text{C}$ .

**Tabla 5.** *Primers* utilizados para la secuenciación del gen 16S rDNA.

<i>Primer</i>	Tipo	Secuencia
<b>P1</b>	Forward	5'-GCGGCGTGCCCTAATACATGC-3'
<b>P6</b>	Reverse	5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3'

A continuación, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, se verificaron los productos de la reacción, procediendo del mismo modo que en el apartado 3.5.2. El producto de PCR sobrante se envió al Servicio General de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Zaragoza donde se realizó secuenciación de Sanger y separación de los fragmentos obtenidos mediante electroforesis capilar. Una vez recibida la secuencia de nucleótidos se visualizó con el software Chromas 2.6.6 (disponible en <https://technelysium.com.au/wp/chromas/>, Julio 2020) y se obtuvo la identificación de las especies en *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST, disponible en <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Julio 2020) del Centro Nacional de Información para Biotecnología de EE.UU. (NCBI) que identifica similitudes de secuencias de nucleótidos con bases de datos.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

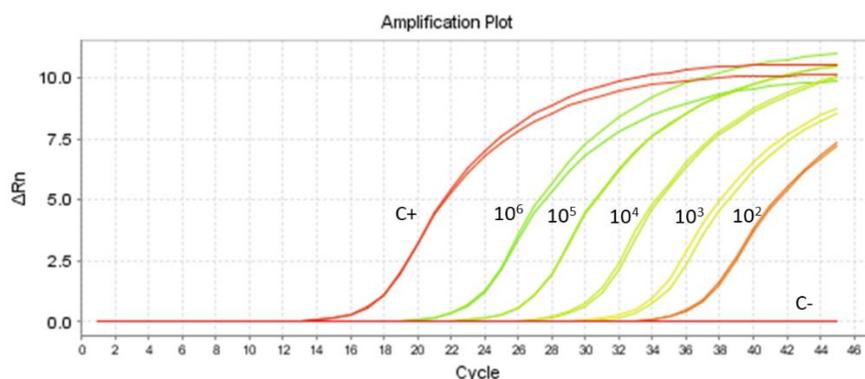
### 4.1. Evaluación del método King Fisher Duo para la extracción de DNA de esporos de clostridios butíricos

Como ya se ha mencionado, mediante el uso de diluciones en serie de cantidades conocidas de DNA de esporos se puede trazar una curva estándar de concentración logarítmica frente a la Ct obtenida en la qPCR. En este estudio, para evaluar la utilización del método King Fisher Duo en la extracción de DNA de los esporos de clostridios butíricos, se realizaron diferentes rectas de calibrado procesando muestras de leche cruda de vaca contaminadas artificialmente con esporos de las cepas de *C. tyrobutyricum* CECT 4012 y *C. tyrobutyricum* UZ01 añadidos en concentraciones de  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$  esporos/mL y tratadas con subtilisina mediante el protocolo descrito. Además, se realizó otro calibrado con muestras de leche UHT con las mismas cantidades de esporos sin el tratamiento con subtilisina. Después de la extracción y purificación del DNA de los esporos con el método King Fisher Duo de las muestras contaminadas, todas ellas se analizaron mediante qPCR utilizando los *primers* CT*fla*. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Resultados de qPCR obtenidos para las rectas de calibrado del análisis de esporos de las cepas CECT 4012 y UZ01 de *C. tyrobutyricum* en leche UHT y leche cruda contaminadas artificialmente. Los valores corresponden a la media de duplicados de dos experimentos independientes para leche UHT sin tratar con subtilisina (n=4) y tres experimentos independientes para leche cruda tratada con subtilisina (n=6).

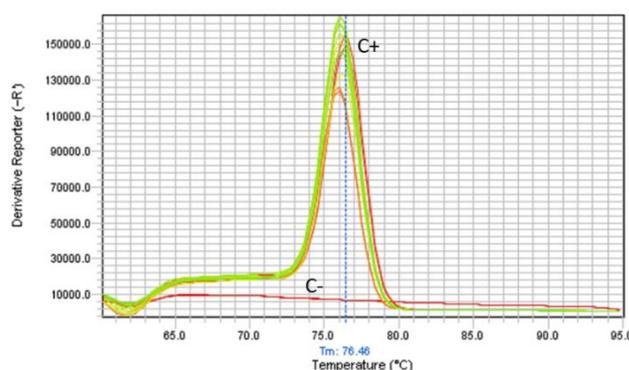
Leche	log número de esporos/mL	Ct	DS	% amplificación	Límite de detección (esporos/mL)	Ecuación de la recta	R <sup>2</sup>	Eficiencia qPCR (%)
UHT sin tratar con subtilisina. Cepa CECT4012	1	38,85	-	25,00	10 <sup>4</sup>	y=-3,9047x+50,589	0,9989	80,34
	2	37,58	0,77	75,00				
	3	36,65	0,46	75,00				
	4	34,89	0,54	100,00				
	5	31,22	0,34	100,00				
	6	27,09	0,76	100,00				
Cruda tratada con subtilisina. Cepa CECT4012	1	37,23	-	16,67	10 <sup>4</sup>	y=-3,4987x+47,501	1	93,12
	2	37,77	1,12	33,33				
	3	36,98	0,77	83,33				
	4	33,52	0,18	100,00				
	5	30,04	0,16	100,00				
	6	26,48	0,13	100,00				
Cruda tratada con subtilisina. Cepa UZ01	1	34,32	3,38	66,67	10 <sup>2</sup>	y=-3,4081x+41,042	0,9989	96,53
	2	34,08	1,37	100,00				
	3	31,08	2,06	100,00				
	4	27,40	1,84	100,00				
	5	23,82	1,74	100,00				
	6	20,67	2,07	100,00				

Como se puede observar, el valor de Ct disminuyó con el aumento de la concentración de esporos adicionada a las muestras y se produjo amplificación mediante qPCR para todas las concentraciones de esporos en al menos una de las repeticiones realizadas. En la Figura 8 se representa la gráfica de amplificación de una recta de calibrado.



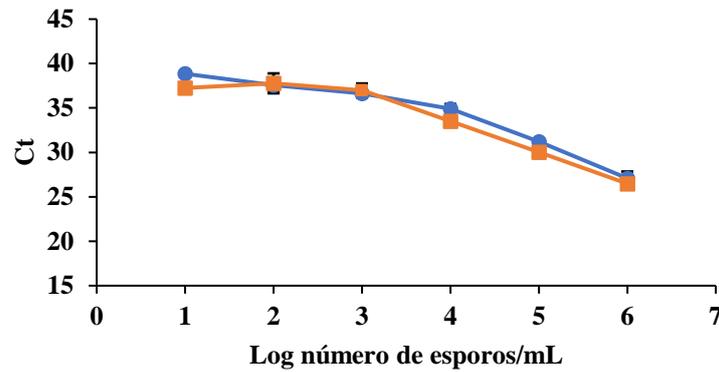
**Figura 8:** Gráfica de amplificación de qPCR de una calibración con *C. tyrobutyricum* UZ01 en leche cruda tratada con subtilisina. Las curvas corresponden a las amplificaciones de las leches con las diferentes cantidades de esporos/mL adicionadas ( $10^6$ - $10^2$ ), el control negativo (C-) y el control positivo (C+), analizadas por duplicado.

También se obtuvieron las *melt curves* en todas las qPCR realizadas en las calibraciones, con el objetivo de comprobar que para todas las muestras se obtenía un único pico coincidente con el correspondiente al control positivo, asegurando así que el fragmento amplificado tuviera un tamaño igual al del amplicón deseado y que no se hubieran formado dímeros de los *primers*. En la Figura 9 observamos que se obtuvo una  $T_m$  de 76,46 °C para la amplificación de la calibración de *C. tyrobutyricum* UZ01 representada en la Figura 8.



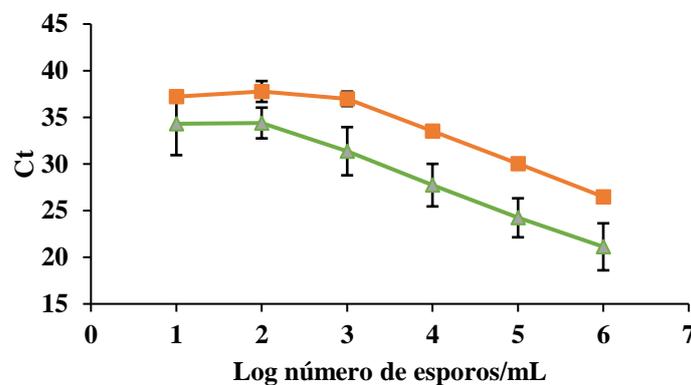
**Figura 9.** *Melt curve* de la qPCR obtenida de la calibración con *C. tyrobutyricum* UZ01 en leche cruda tratada con subtilisina. Línea roja inferior: control negativo (C-). Línea roja superior: control positivo (C+). Resto de líneas: muestras con diferentes concentraciones  $10^2$ - $10^6$  esporos/mL.

Si se comparan los datos de  $C_t$  obtenidos para la recta de calibrado de la leche UHT sin tratar con subtilisina y la leche cruda tratada con subtilisina (Figura 10) ambas curvas parecen ser equivalentes. En cambio, la eficiencia de la qPCR obtenida en la leche UHT (80,34%) es menor que la obtenida para la leche cruda tratada con subtilisina (93,12%). Esto nos indica que el tratamiento con subtilisina es eficaz para recuperar los esporos contenidos en la leche y necesario para obtener una mejor eficiencia de la qPCR, sugiriendo que la matriz de la leche podría interferir en la detección.



**Figura 10.** Rectas de calibrado para la amplificación por qPCR de los esporos de la cepa de *C. tyrobutyricum* CECT 4012. Los valores representados corresponden con la media de duplicados de dos experimentos independientes para (●) leche UHT sin tratar con subtilisina (n=4) y tres experimentos independientes para (■) leche cruda tratada con subtilisina (n=6). Las barras de error corresponden con las desviaciones estándar.

Una vez comprobado que el tratamiento con subtilisina era eficaz para la recuperación de los esporos de la cepa tipo *C. tyrobutyricum* CECT 4012, se procedió a la realización de la recta de calibrado con la cepa *C. tyrobutyricum* UZ01 aislada de una leche cruda de vaca, con el fin de trabajar en condiciones más cercanas a las reales. En la Figura 11 se puede ver que la cepa UZ01 amplifica a ciclos considerablemente más bajos que la cepa tipo CECT 4012.



**Figura 11.** Rectas de calibrado de amplificación de los esporos de las cepas de *C. tyrobutyricum* CECT 4012 (■) y UZ01 (▲) en leche cruda tratadas con subtilisina. Los valores representados corresponden con la media de duplicados de tres experimentos independientes (n=6). Las barras de error corresponden con las desviaciones estándar.

Como se puede observar en la Tabla 6, el porcentaje de amplificación de las concentraciones inferiores,  $10^1$  y  $10^2$  esporos/mL, es mayor en la cepa UZ01 que en la cepa tipo CECT 4012. También se puede observar en la Figura 11, que el rango lineal obtenido para la cepa UZ01 es más amplio ( $10^2$ - $10^6$  esporos/mL) que el obtenido para la cepa tipo CECT 4012 ( $10^3$ - $10^6$  esporos/mL). Las rectas de calibrado para ambas cepas se han calculado a partir de los valores situados en el rango lineal de esta gráfica y se pueden ver en la Tabla 6. Para la cepa UZ01 se ha obtenido una mejor eficiencia en la qPCR (96,53%) que para la cepa tipo CECT 4012 (93,12%) además de un límite de detección más bajo, siendo  $10^2$  esporos/mL

para la cepa UZ01 y  $10^4$  esporos/mL para la cepa tipo CECT 4012. Todo ello nos sugiere que la cepa salvaje UZ01 es más fácil de detectar y cuantificar que la cepa tipo CECT 4012, siendo este resultado favorable, ya que es una cepa posiblemente más próxima a los esporos presentes en la naturaleza.

Teniendo en cuenta los buenos resultados obtenidos en la calibración del sistema King Fisher Duo para la cepa de *C. tyrobutyricum* UZ01, podría llevarse a cabo la detección y cuantificación de los esporos butíricos directamente en leche cruda con la combinación del tratamiento con subtilisina, el sistema de aislamiento del DNA por el método del King Fisher Duo y la qPCR en un tiempo inferior a 10 h con un límite de detección de 100 esporos/mL. López-Enríquez, Rodríguez-Lázaro y Hernández (2007) obtuvieron una mayor sensibilidad en la detección de *C. tyrobutyricum* CECT4011 utilizando los *primers* CT*fla*, puesto que los valores de Ct obtenidos fueron inferiores a los obtenidos en el presente estudio. Sin embargo, su método de extracción y purificación del DNA de los esporos butíricos es más laborioso y por tanto más complicado de implantarse en el análisis rutinario de leches crudas sospechosas de contaminación butírica. Por el contrario, Bassi et al. (2013) no fueron capaces de detectar el fragmento del gen *fla* en las cepas salvajes de *C. tyrobutyricum* aisladas de quesos Grana Padano y Parmigiano Reggiano, con el método de *bead beating* para la extracción del DNA. Sin embargo, estos autores fueron capaces de detectar el fragmento del gen *pta* en dichas cepas con un límite de detección de 14 ufc/mL, teniendo en cuenta que en este trabajo se analizó una mezcla de esporos y células vegetativas.

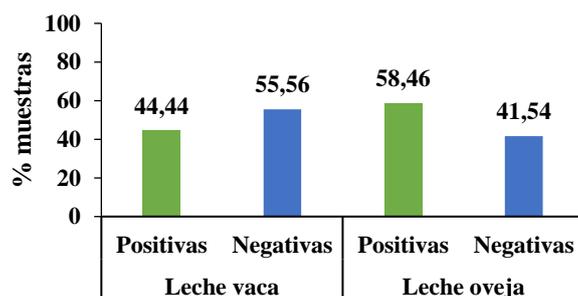
El método semiautomático desarrollado por Brändle et al. (2018) basado en la técnica NMP, a pesar de ser más rápido y menos laborioso que los métodos microbiológicos convencionales y presentar un límite de detección (75 esporos/L) inferior al obtenido en el presente estudio, sigue teniendo la desventaja del mayor tiempo necesario para la obtención de los resultados (48 h) en comparación con el desarrollado en este trabajo.

#### **4.2. Análisis de muestras de leche cruda de vaca y oveja**

Para comprobar la aplicabilidad del método desarrollado, se analizaron muestras de leche cruda de vaca (n = 45) y oveja (n = 65), procedentes de Asociaciones Interprofesionales Lecheras, sospechosas de contaminación con clostridios butíricos o que habían dado resultado positivo al ser analizadas por la técnica del NMP en el laboratorio interprofesional de procedencia.

#### 4.2.1. Análisis mediante PCR a tiempo real

Las muestras de leche cruda sospechosas de contaminación con clostridios butíricos, tratadas previamente con subtilisina para facilitar la extracción y concentración de los esporos de la matriz de la leche, fueron procesadas siguiendo el protocolo del método King Fisher Duo y posteriormente analizadas mediante qPCR utilizando los *primers* CT*fla*. Los resultados de amplificación obtenidos para las diferentes muestras se incluyen en los Anexos I y II y se pueden ver representados en la Figura 12. De las muestras de leche cruda de vaca analizadas, el 44,44% amplificó en qPCR y el 55,56% no amplificó. En cambio, en las muestras de leche cruda de oveja se produjo amplificación en el 58,46% y no hubo amplificación en el 41,54% de las muestras. Para la obtención de estos datos se tuvo en cuenta que 4 muestras (8,89%) de leche de vaca y 6 muestras (9,2%) de leche de oveja habían dado falso positivo bien porque la T<sub>m</sub> obtenida en la *melt curve* no se correspondía con la de la muestra control o bien porque habían amplificado a ciclos muy altos, Ct >40 (Bustin et al., 2009), por lo que se las consideró negativas.



**Figura 12.** Resultados de amplificación de la qPCR de muestras de leche cruda de vaca y oveja sospechosas de contaminación con clostridios butíricos procedentes de laboratorios de asociaciones interprofesionales lecheras.

Para realizar el cálculo de la concentración de esporos butíricos presentes en las muestras de leche cruda con resultado positivo en qPCR se extrapolaron los valores de Ct en la recta de calibrado obtenida para la cepa *C. tyrobutyricum* UZ01. En las muestras de leche de vaca se obtuvieron valores entre 1,15 y 213,49 esporos/mL. Estos valores fueron inferiores al límite de detección ( $<10^2$  esporos/mL) en el 85% de las muestras positivas en qPCR y sólo el 15% pudieron ser cuantificadas al encontrarse el valor de Ct en el rango lineal de la recta de calibrado, con un resultado promedio de  $202,86 \pm 11,63$  esporos/mL. De manera similar, en las muestras de leche de oveja se obtuvieron valores entre 2,26 y 552,75 esporos/mL siendo valores  $<10^2$  esporos/mL en el 92,11% de las muestras con qPCR positiva y el 7,89% pudo ser cuantificada con un resultado promedio de  $313,22 \pm 210,48$  esporos/mL. Estos resultados demuestran que, en general, la concentración de esporos butíricos en las muestras de leche analizadas es baja. Bassi et al. (2013) encontraron concentraciones de entre  $10^2$ - $10^3$

esporos/mL en el único estudio conocido hasta la fecha, en el que se realiza análisis de *C. tyrobutyricum* por qPCR de muestras reales de leche cruda de vaca susceptibles de estar contaminadas con esporos butíricos. Además, nuestros resultados son comparables a los obtenidos por algunos autores mediante la técnica del NMP. Driehuis, Hoolwerf y Rademaker (2016) detectaron valores entre 0,04 y 25 esporos/mL en leche de vaca y Garde et al. (2011) y Turchi et al. (2016) entre 0,36 y 240 esporos/mL en leche de oveja. Las diferencias encontradas entre los valores de contaminación en la leche de vaca y de oveja podrían deberse, como se menciona en algunos estudios (Salmerón et al., 2002; Turchi et al., 2016), al mayor número de cabezas de ganado por rebaño debido al menor rendimiento lechero que tienen en comparación con las vacas, y mayor dificultad de seguir unas buenas prácticas higiénicas durante el ordeño de las ovejas. Además, el uso de pastos cercados en granjas de producción semi-extensiva, favorecen la propagación y concentración de esporos, especialmente cuando el lecho de los animales no es manipulado adecuadamente.

Las muestras de leche cruda de oveja habían sido analizadas en el laboratorio interprofesional de procedencia por la técnica del NMP y todas ellas habían resultado positivas. Entonces, se puede decir que la coincidencia entre esta técnica y la qPCR realizada con los *primers CTfla* de *C. tyrobutyricum* es del 58,46%. Se deduce así que el 58,46% de la contaminación en este tipo de leche es debida a la presencia de *C. tyrobutyricum* y el 41,54% de la contaminación es debida a otras especies de *Clostridium* o incluso a otros microorganismos formadores de gas que puedan crecer en el medio selectivo utilizado para la realización del análisis por la técnica del NMP (Brändle, Domig y Kneifel, 2016).

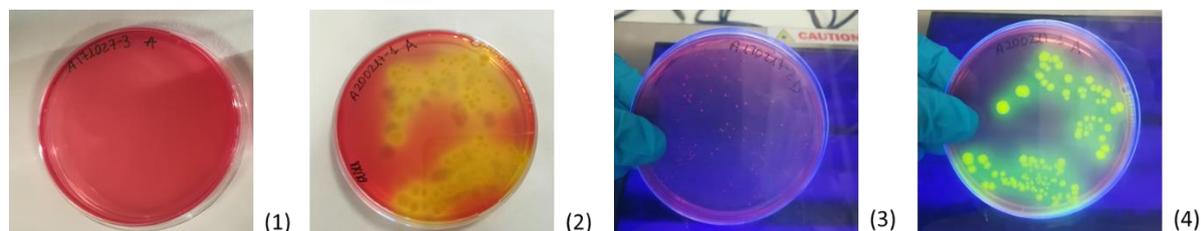
#### 4.2.2. Análisis mediante cultivo microbiológico

Para el análisis microbiológico de las muestras se realizó en primer lugar un precultivo en medio líquido RCM, obteniéndose diferentes resultados en cuanto a la producción de turbidez, gas y olor a ácido butírico (Anexo I y II). Un ejemplo de este precultivo se muestra en la Figura 13.



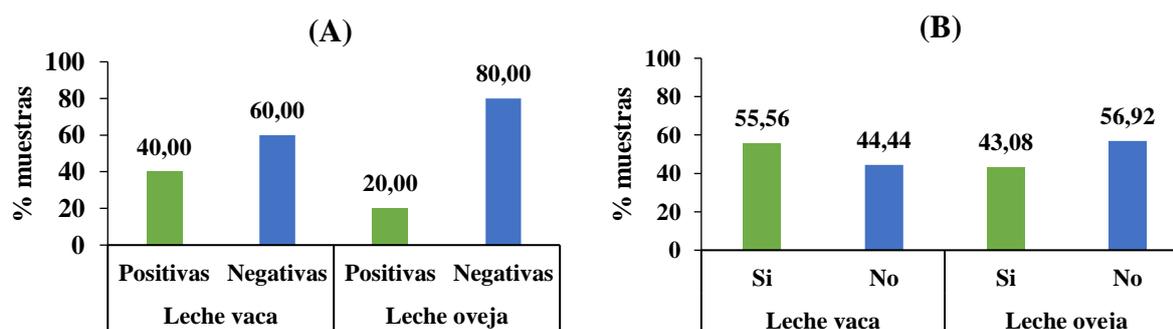
**Figura 13.** Pre-enriquecimiento de muestras de leche cruda de vaca en medio RCM, donde se puede observar la turbidez del medio, producción de gas y desplazamiento de la parafina en algunas de ellas.

En segundo lugar, y siguiendo el método descrito por Jonsson (1990), después de la etapa de pre-enriquecimiento, las leches se cultivaron en medio agar RCM suplementado con D-cicloserina para inhibir el crecimiento de otras bacterias como *Bacillus* spp., y rojo neutro para la diferenciación de las colonias de *Clostridium*, que toman color amarillo y producen fluorescencia cuando son expuestas bajo luz UV (Anexo I y II). En la Figura 14 se pueden observar algunos ejemplos del crecimiento de estas colonias.



**Figura 14.** Cultivo de muestras de leche cruda de vaca en agar RCM suplementado con rojo neutro y D-cicloserina. (1) muestra negativa; (2) muestra positiva; (3) muestra negativa bajo luz UV y (4) muestra positiva bajo luz UV.

De las muestras de leche de vaca analizadas, el 40,00% resultaron positivas y el 60,00% resultaron negativas en cultivo microbiológico. Cuando se analizaron las muestras de leche de oveja, los porcentajes fueron diferentes, siendo el 20,00% positivas y el 80,00% negativas, Figura 15A. Las muestras de leche de oveja habían sido analizadas por la técnica del NMP en el laboratorio interprofesional de procedencia y todas ellas habían resultado positivas por lo que parece que los clostridios butíricos presentes en leche de oveja tienen dificultad de crecimiento en el medio sólido específico utilizado en este estudio.



**Figura 15.** (A) Resultados de cultivo en agar RCM suplementado con rojo neutro y D-cicloserina y (B) resultados de coincidencia entre el cultivo microbiológico y la qPCR de muestras de leche cruda de vaca y oveja sospechosas de contaminación con clostridios butíricos.

En la Figura 15B se puede observar que se obtuvo el mismo resultado en cultivo microbiológico y en qPCR en el 55,56% de las muestras de leche cruda de vaca analizadas y no se obtuvo el mismo resultado en el 44,44% de las muestras. Sin embargo, en las muestras de leche cruda de oveja se obtuvo coincidencia en el 43,08% de las muestras y no se obtuvo coincidencia en el 56,92%, lo cual se debió, como se ha comentado anteriormente, a la

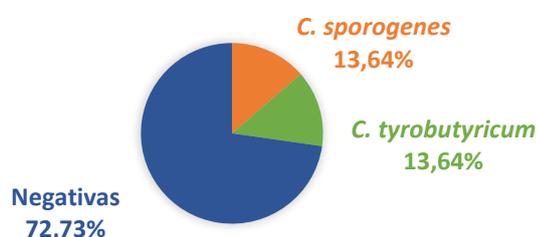
dificultad de crecimiento de clostridios butíricos presentes en leche de oveja en el medio sólido empleado, probablemente por la presencia de algún inhibidor natural.

#### 4.3. Identificación de especies de clostridios butíricos presentes en las muestras

##### 4.3.1. Análisis e identificación de colonias por PCR múltiple

Con el fin de comprobar si las colonias obtenidas en el cultivo microbiológico correspondían con *C. tyrobutyricum*, considerada normalmente la principal especie causante del defecto de hinchazón tardía en quesos, o por el contrario existían otras especies implicadas en esta contaminación (como *C. butyricum*, *C. sporogenes* y *C. beijerinckii*) se realizó una PCR múltiple (Cremonesi et al., 2012) y los productos obtenidos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa.

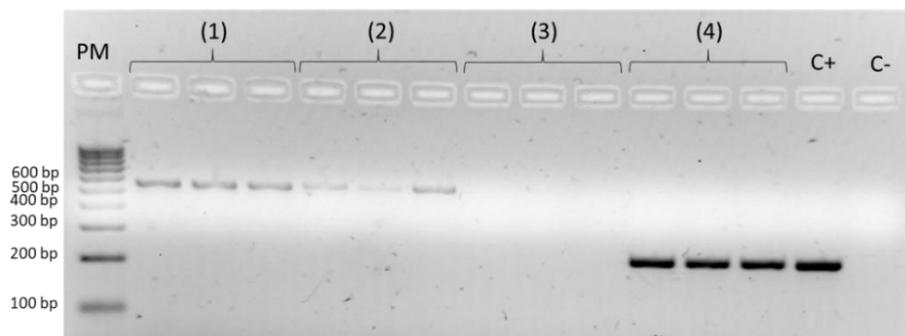
Se analizaron 22 muestras de leche cruda de vaca que habían resultado positivas en el análisis mediante cultivo microbiológico. De todas ellas, solamente 6 fueron identificadas en el gel de agarosa, correspondiendo tres de ellas con *C. tyrobutyricum* (13,64%) y otras tres con *C. sporogenes* (13,64%), mientras que en el 72,73% de las muestras no se obtuvo correspondencia con ninguna de las especies de clostridios butíricos analizadas (Figura 16). Además, en ninguna de las muestras de leche cruda de oveja se obtuvo coincidencia con alguna de las especies analizadas en la PCR múltiple. Esto podría indicar, como ya se ha mencionado, que existen otras especies diferentes a *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. sporogenes* y *C. beijerinckii* capaces de producir la contaminación butírica, además de la dificultad de aislar *C. tyrobutyricum* en las muestras, que, según los datos obtenidos en qPCR, debería estar presente en el 44,44% de las muestras de leche de vaca y en el 58,46% de las muestras de leche de oveja. Esto nos sugiere que, si hay coexistencia de varias especies en la leche, pudiera germinar una antes que las demás e imponerse sobre las otras especies en el cultivo específico.



**Figura 16.** Resultados de la PCR múltiple de las colonias obtenidas en cultivo microbiológico RCM agar con rojo neutro y D-cicloserina de las muestras de leche cruda de vaca contaminadas con clostridios butíricos.

En la imagen de la Figura 17 se muestra la electroforesis de los productos de amplificación de varias colonias analizadas. Como se puede observar, el control positivo

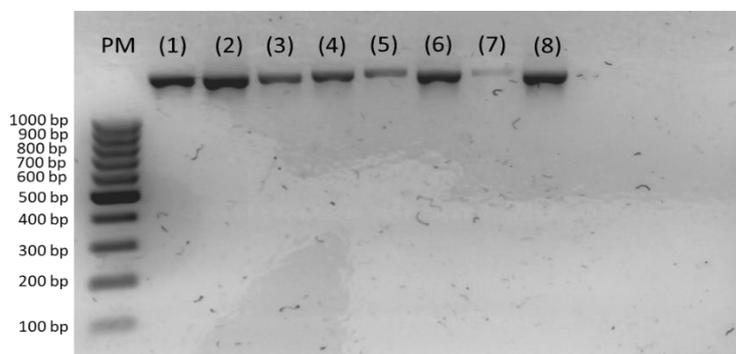
corresponde con el tamaño esperado para el amplicón de *C. tyrobutyricum* (210 bp). Para las muestras (1) y (2) se obtuvieron bandas fluorescentes correspondientes al tamaño del amplicón de *C. sporogenes* (549 bp), la muestra (3) dio resultado negativo, y la muestra (4) se correspondió con un tamaño igual a la muestra control (210 bp) correspondiente a *C. tyrobutyricum*.



**Figura 17.** Electroforesis de los productos de amplificación de PCR múltiple de muestras de leche de vaca sospechosas de contaminación con clostridios butíricos. PM: marcador de pesos moleculares; (1) a (4) muestras: A171116-11, A171116-12, A171215-4 y A190717-2; C+: control positivo de *C. tyrobutyricum*; C-: control negativo.

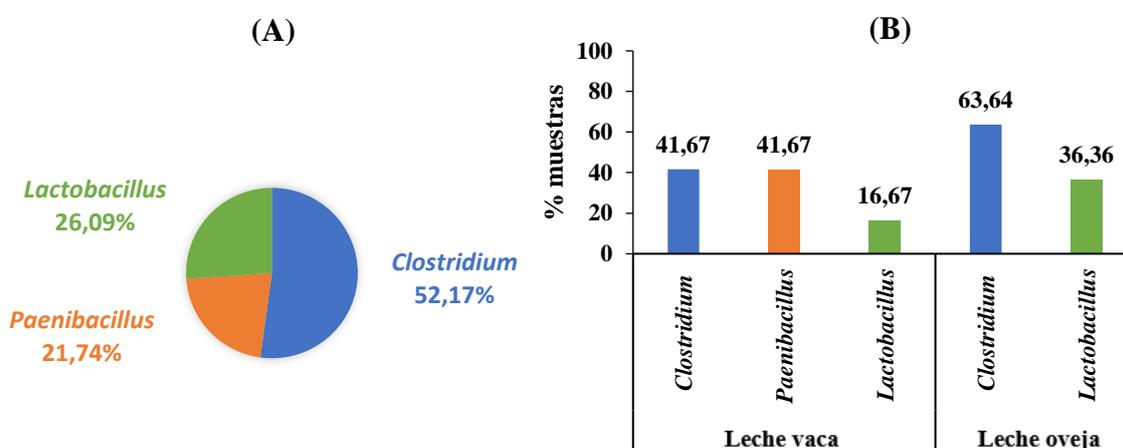
#### 4.3.2. Identificación de especies mediante secuenciación del gen 16S rDNA bacteriano

Debido a la dificultad encontrada en la identificación de especies mediante PCR múltiple, se realizó secuenciación del amplicón del gen del ribosoma 16S para aquellas muestras que fueron positivas en el cultivo microbiológico pero negativas en la PCR múltiple de las especies incluidas. En la Figura 18 se muestra la imagen de un gel de agarosa en el que se analizaron 8 muestras donde se observan los productos de amplificación de la PCR. El fragmento de DNA obtenido tiene alrededor de 1100 pares de bases necesarias para la secuenciación.



**Figura 18.** Electroforesis de los productos de amplificación de la PCR de muestras de leche de vaca y oveja para la secuenciación del gen 16S rDNA bacteriano. PM: marcador de pesos moleculares; (1) a (8) muestras: A200618-1, L200612-8, L200612-16, L200612-17, L200612-19, L200612-20, L200612-22 y L200612-23.

Los resultados de la secuenciación se recogen en el ANEXO III. De las 24 muestras que fueron secuenciadas, una no pudo ser identificada, posiblemente debido a la baja cantidad de DNA amplificado, como queda reflejado en la menor intensidad de la banda correspondiente a la muestra 7 en la electroforesis de la Figura 18. De las 23 muestras que sí fueron identificadas, el 52,17% (12 muestras) resultaron estar contaminadas con microorganismos pertenecientes al género *Clostridium*, el 21,74% al género *Paenibacillus* y el 26,09% al género *Lactobacillus* (Figura 19A). En las muestras de leche de vaca se ha encontrado contaminación debida a los tres géneros: 41,67% *Clostridium*, 41,67% *Paenibacillus* y 16,67% *Lactobacillus*. En cambio, en las muestras de leche de oveja el 63,64% de la contaminación identificada fue debida al género *Clostridium* y el 36,36% al género *Lactobacillus*, (Figura 19B). Estos resultados contrastan con los obtenidos por Brändle et al. (2018) que mediante esta técnica identificaron como *Clostridium* el 95,7% de las colonias aisladas, el 2,4% como otros microorganismos formadores de esporos (*Bacillus* y *Paenibacillus*) y el 1,9% como microorganismos no formadores de esporos. Estas diferencias podrían deberse, como comentan dichos autores, al uso de un medio de cultivo selectivo mejorado (AmpMedia666) que favorece el crecimiento de *Clostridium* frente a otros microorganismos.



**Figura 19.** Resultados de secuenciación del ribosoma 16S en n=23 muestras de leche cruda de vaca y oveja con resultado positivo en cultivo microbiológico. (A) Géneros de los microorganismos secuenciados y (B) distribución de géneros en las muestras de leche cruda de vaca (n=12) y oveja (n=11).

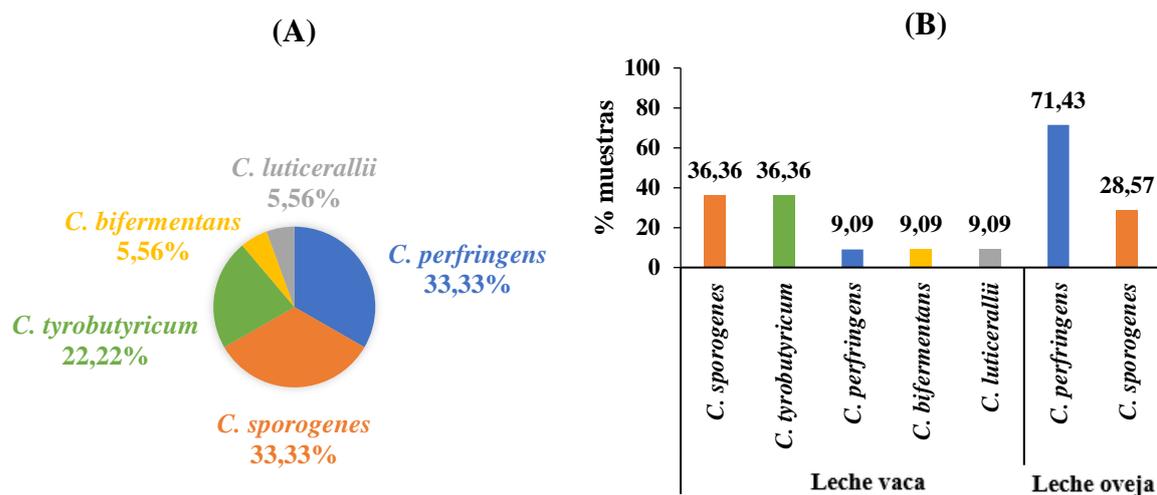
Las especies de *Paenibacillus* identificadas fueron *P. thermophilus* (bacteria Gram positiva, aerobia estricta y formadora de esporos) y *P. macerans* (bacteria variable Gram positiva/Gram negativa, anaerobia facultativa y formadora de esporos), las cuales ya habían sido encontradas en diferentes matrices relacionadas con el entorno de las granjas lecheras, como tierra, ensilados de maíz y otros alimentos, heces y leche (Borreani et al., 2019). Reindt

et al. (2014) detectaron la presencia de *P. barengoltzi* y *P. macerans* entre las colonias aisladas de muestras de leche de cabra analizadas en su estudio y Driehuis, Hoolwerf y Rademaker (2016) contabilizaron un 36% de sus muestras contaminadas con bacterias pertenecientes al género *Paenibacillus*.

Entre las especies del género *Lactobacillus* detectadas se encuentran *L. casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus* (bacterias Gram positivas, heterofermentativas facultativas no formadoras de esporos). Son pertenecientes al grupo *L. casei* y pueden ser aisladas principalmente de leche y productos lácteos, además del tracto gastrointestinal y heces de humanos y animales (Gobbetti y Minervini, 2014). Estas bacterias no formadoras de esporos no han sido inactivadas mediante el tratamiento térmico aplicado a las muestras antes de su análisis, como ya observaron Salmerón et al. (2002).

Debido a que hemos identificado *Paenibacillus* y *Lactobacillus* en algunas muestras consideradas como positivas de contaminación con bacterias butíricas, debería buscarse una alternativa al medio sólido empleado en este estudio (RCM suplementado con rojo neutro y D-cicloserina), ya que se ha demostrado que no es específico para el cultivo de esporos butíricos causantes de hinchazón tardía. Además, se ha visto que los esporos de las muestras de leche de oveja han tenido dificultad de crecimiento en este medio.

Considerando los dos métodos utilizados en este estudio para la identificación de las bacterias butíricas, PCR múltiple y secuenciación del gen 16S rDNA bacteriano, se ha encontrado que, dentro del género *Clostridium*, las especies presentes en las leches crudas de ambas especies corresponden a *C. perfringens* (33,33%), *C. sporogenes* (33,33%), *C. tyrobutyricum* (22,22%), *C. bifermentans* (5,56%) y *C. luticerallii* (5,56%), (Figura 20A). Además, se puede observar una mayor variabilidad de especies en la leche de vaca: *C. sporogenes* (36,36%), *C. tyrobutyricum* (36,36%), *C. perfringens* (9,09%), *C. bifermentans* (9,09%) y *C. luticerallii* (9,09%) en contraste con el predominio de *C. perfringens* (71,43%) y *C. sporogenes* (28,57%) en las muestras de leche de oveja (Figura 20B).



**Figura 20.** Resultados de identificación de especies de *Clostridium* realizadas mediante PCR múltiple y secuenciación del gen 16S rDNA bacteriano. **(A)** Especies de *Clostridium* identificadas en n=18 muestras de leche cruda de vaca y oveja y **(B)** distribución de las especies en las muestras de leche cruda de vaca (n=11) y oveja (n=7).

Estos resultados, aunque podrían completarse con el análisis de más muestras para confirmar la tendencia encontrada, demuestran la contribución de otras especies de *Clostridium* diferentes a las consideradas habitualmente como responsables de la contaminación de las muestras de leche objeto de estudio (*C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. sporogenes* y *C. beijerinckii*), tal y como habían demostrado otros autores. Por citar algunos, Turchi et al. (2016) y Chaturvedi y Shukla (2015) indicaron, respectivamente, que el 56% y el 40,63% de las muestras de leche con resultado positivo en cultivo estaban contaminadas con *C. perfringens*. En el estudio realizado por Reindt et al. (2014) en leche de cabra, el 5,3% de las colonias secuenciadas correspondieron a *C. perfringens* y el 7,6% a *C. bifementans*. Esta última especie también fue identificada entre las especies minoritarias encontradas por Bermúdez et al. (2016) en leche de vaca. Sin embargo, en la literatura consultada, no se han encontrado datos que respalden la contribución de *C. luticerallii* a la contaminación butírica, aunque sí se mencionan otras especies como *C. subterminale* y otros *Clostridium* spp (Brändle et al., 2018).

En las muestras de leche cruda de vaca analizadas en nuestro trabajo se puede observar mayor incidencia de *C. tyrobutyricum* (36,36%) y *C. sporogenes* (36,36%), como encontraron Bermúdez et al. (2016) y Brändle et al. (2018) que informaron, respectivamente, que el 58,3% y el 77,9% de las colonias aisladas en leche de vaca eran *C. tyrobutyricum* y el 16,7% y 10,9% *C. sporogenes*. En cambio, en las muestras de leche de oveja analizadas en nuestro estudio se ha encontrado una mayor incidencia de *C. perfringens* (71,43%) y *C. sporogenes* (28,57%). Estos resultados son en parte similares a los obtenidos en leche de oveja por Turchi

et al. (2016), que identificaron el 56% como *C. perfringens* y el 44% como *C. sporogenes*, y por Arias et al. (2013) y Garde et al. (2011) que identificaron, respectivamente, el 93,86% y el 78,9% de las colonias aisladas como *C. sporogenes*.

A pesar de su incapacidad de germinar y reproducirse en la leche, *C. perfringens* es capaz de producir gas a partir del metabolismo de los carbohidratos y puede tener un impacto en el recuento de clostridios productores de gas por el método NMP (Turchi et al., 2016). Esto quiere decir que, debido a la falta de datos que existen hasta el momento sobre el papel de *C. perfringens* en la hinchazón tardía de los quesos, esta especie no está considerada como productora de este defecto. Sin embargo, al generar gas en los medios de cultivo empleados para el análisis de las muestras de leche por el método NMP (y en el medio de cultivo empleado en el presente estudio) es posible que se sobreestime el número de esporos productores de fermentación butírica al analizar las muestras mediante métodos microbiológicos. Por tanto, harían falta más estudios para evaluar el grado de contribución de *C. perfringens* en el deterioro de los quesos por hinchazón tardía. Las intoxicaciones causadas por este patógeno están relacionadas principalmente con derivados cárnicos, aunque es necesario ingerir cantidades superiores a  $10^8$  células vegetativas de las cepas productoras de enterotoxina, que representan solo un pequeño porcentaje de las cepas (Bassi, Puglisi y Cocconcelli, 2015).

Una vez identificadas las principales especies de *Clostridium* implicadas en la contaminación butírica de las leches analizadas y con vistas a futuras investigaciones, sería interesante desarrollar una qPCR múltiple para la detección y cuantificación de *C. sporogenes*, *C. tyrobutyricum* y *C. perfringens*, de manera similar a la propuesta por Morandi et al. (2015) para la detección simultánea de *C. beijerinckii*, *C. sporogenes* y *C. tyrobutyricum*.

## **5. CONCLUSIONES**

Con los resultados obtenidos en este Trabajo Fin de Máster se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. Es posible realizar la detección y cuantificación de *C. tyrobutyricum* en leche cruda en un tiempo inferior a 10 h combinando el sistema semiautomático King Fisher Duo y la qPCR, con un límite de detección de  $10^2$  esporos/mL.
2. El tratamiento de las muestras de leche cruda con subtilisina es eficaz para la extracción de los esporos de los clostridios butíricos de la matriz de la leche y permite obtener una eficiencia óptima en la qPCR.

3. Los elevados valores de Ct obtenidos en la qPCR demuestran la baja contaminación de la leche cruda debida a *C. tyrobutyricum*.
4. El cultivo microbiológico que se ha utilizado en este estudio y que se emplea habitualmente para la determinación de contaminación butírica, no es suficientemente específico para el crecimiento de clostridios y sobreestima la contaminación en las muestras de leche cruda.
5. *C. perfringens* y *C. sporogenes* contribuyen, junto con *C. tyrobutyricum*, a la contaminación butírica de las muestras de leche cruda, en diferente proporción según la especie de la que procede la leche analizada en este estudio.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arias, C., Oliete, B., Seseña, S., Jimenez, L., Pérez-Guzmán, M.D. y Arias, R. (2013). Importance of on-farm management practices on lactate-fermenting *Clostridium* spp. spore contamination of Manchega ewe milk: Determination of risk factors and characterization of *Clostridium* population. *Small Ruminant Research*, 111(1-3), pp. 120-128. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.11.030>.
- Arya, M., Shergill, I.S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N. y Patel, H.R. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 5(2), pp. 209–219. DOI: <https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.209>.
- Ávila, M., Gómez-Torres, N., Delgado, D., Gaya, P. y Garde, S. (2016). Application of high pressure processing for controlling *Clostridium tyrobutyricum* and late blowing defect on semi-hard cheese. *Food Microbiology*, 60, pp. 165-173. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.07.008>.
- Ávila, M., Gómez-Torres, N., Hernández, M. y Garde, S. (2014). Inhibitory activity of reuterin, nisin, lysozyme and nitrite against vegetative cells and spores of dairy-related *Clostridium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 172, pp. 70-75. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.002>.
- Bassi, D., Cappa, F. y Cocconcelli, P.S. (2013). Array-based transcriptional analysis of *Clostridium sporogenes* UC9000 during germination, cell outgrowth and vegetative life. *Food Microbiology*, 33(1), pp.11-23. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.08.004>.
- Bassi, D., Fontana, C., Zucchelli, S., Gazzola, S. y Cocconcelli, P.S. (2013). TaqMan real time-quantitative PCR targeting the phosphotransacetylase gene for *Clostridium tyrobutyricum* quantification in animal feed, faeces, milk and cheese. *International Dairy Journal*, 33(1), pp. 75-82. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.06.008>.

- Bassi, D., Puglisi, E. y Cocconcelli, P.S. (2015). Understanding the bacterial communities of hard cheese with blowing defect. *Food Microbiology*, 52, pp.106-118.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2015.07.004>.
- Bergère, J.L. y Sivelä, S. (1990). Detection and enumeration of clostridial spores related to cheese quality - classical and new methods. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 251, pp. 18-23.
- Bermúdez, J., González, M.J., Olivera, J.A., Burgueño, J.A., Juliano, P., Fox, E.M. y Reginaldi, S.M. (2016). Seasonal occurrence and molecular diversity of clostridia species spores along cheesemaking streams of 5 commercial dairy plants. *Journal of Dairy Science*, 99(5), pp. 3358-3366. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10079>.
- Borreani, G., Ferrero, F., Nucera, D., Casale, M., Piano, S. y Tabacco, E. (2019). Dairy farm management practices and the risk of contamination of tank milk from *Clostridium* spp. and *Paenibacillus* spp. spores in silage, total mixed ration, dairy cow feces, and raw milk. *Journal of Dairy Science*, 102(9), pp.8273-8289.  
DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16462>.
- Bourgeois, C.M., Le Parc, O., Abgrall, B. y Cleret, J. (1984). Membrane Filtration of Milk for Counting Spores of *Clostridium tyrobutyricum*. *Journal of Dairy Science*, 67(11), pp. 2493-2499. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81605-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81605-7).
- Brändle, J., Domig, K.J. y Kneifel, W. (2016). Relevance and analysis of butyric acid producing clostridia in milk and cheese. *Food Control*, 67, pp. 96-113.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.038>.
- Brändle, J., Heinzle, L., Fraberger, V., Berta, J., Zitz, U., Schinkinger, M., Stocker, W., Kneifel, W. y Domig, K.J. (2018). Novel approach to enumerate clostridial endospores in milk. *Food Control*, 85, pp.318-316.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.10.017>.
- Bustin, S., Benes, V., Garson, J., Hellemans, J., Huggett, J., Mueller, R., Nolan, T., Shipley, G., Vandesompele, J. y Wittwer, C. (2009). The MIQE Guidelines: minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), pp. 611-622. DOI: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.
- Chaturvedi, A. y Shukla, S. (2015). Occurrence of clostridium species in different dairy products and its associated health risk. *International Journal of Recent Scientific Research*, 6(2), pp. 2827-2829.
- Cocolin, L., Innocente, N., Biasutti, M. y Comi, G. (2004). The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the

- alteration process. *International Journal of Food Microbiology*, 90(1), pp. 83-91.  
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00296-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00296-4).
- Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(5), pp.299-305.  
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(04\)73092-X](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(04)73092-X).
- Cremonesi, P., Vanoni, L., Silvetti, T., Morandi, S. y Brasca, M. (2012). Identification of *Clostridium beijerinckii*, *Cl. butyricum*, *Cl. sporogenes*, *Cl. tyrobutyricum* isolated from silage, raw milk and hard cheese by a multiplex PCR assay. *Journal of Dairy Research*, 79(3), pp. 318-323. DOI: <https://doi.org/10.1017/S002202991200026X>.
- Dasgupta, A.P. y Hull, R.R. (1989). Late blowing of swiss cheese: incidence of *Clostridium tyrobutyricum* in manufacturing milk. *Australian Journal of Dairy Technology*, 44(2), pp. 82-87.
- Diaz-Amigo, C. (2010). Antibody-Based Detection Methods: From Theory to Practice. En: Bert Popping, Carmen Diaz-Amigo y Katrin Hoenicke. (Eds.). *Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists*. Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons: pp. 221-245.
- Doyle, C.J., Gleeson, D., Jordan, K., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. y Cotter, P.D. (2015). Anaerobic spore-formers and their significance with respect to milk and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 197, pp. 77-87.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.022>.
- Driehuis, F. (2013). Silage and the safety and quality of dairy foods: a review. *Agricultural and Food Science*, 22(1), pp. 16-34. DOI: <https://doi.org/10.23986/afsci.6699>.
- Driehuis, F., Hoolwerf, J. y Rademaker, J.L.W. (2016). Concurrence of spores of *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium beijerinckii* and *Paenibacillus polymyxa* in silage, dairy cow faeces and raw milk. *International Dairy Journal*, 63, pp. 70-77.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.08.004>.
- Dunière, L., Sindou, J., Chaucheyras-Durand, F., Chevallier, I. y Thévenot-Sergentet, D. (2013). Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. *Animal Feed Science and Technology*, 182(1), pp. 1-15.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.04.006>.
- EFSA (2017). EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). Scientific Opinion on the re-evaluation of potassium nitrite (E 249) and sodium nitrite (E 250) as food additives. *EFSA Journal* 2017, 15(6):4786, pp. 157.  
DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4786>.

- EFSA (2010). EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS); Statement on nitrites in meat products. *EFSA Journal* 2010, 8(5):1538, pp. 12. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1538>.
- EFSA (2005). Opinion of the Scientific Panel on Dietetic products, nutrition and allergies [NDA] related to a notification from AMAFE on egg lysozyme used as additive in food pursuant to Article 6 paragraph 11 of Directive 2000/13/EC. *EFSA Journal* 2005, 3(3):186, pp. 5. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2005.186>.
- Esteban, M., Marcos, P., Horna, C., Galan-Malo, P., Mata, L., Perez, M.D., Calvo, M. y Sanchez, L. (2020). Evaluation of methods for DNA extraction from *Clostridium tyrobutyricum* spores and its detection by qPCR. *Journal of Microbiological Methods*, 169. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105818>.
- Garde, S., Arias, R., Gaya, P. y Nuñez, M. (2011). Occurrence of *Clostridium* spp. in ovine milk and Manchego cheese with late blowing defect: Identification and characterization of isolates. *International Dairy Journal*, 21(4), pp. 272-278. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.11.003>.
- Gobbetti, M. y Minervini, F. (2014). *Lactobacillus*. *Lactobacillus casei*. En: Batt, C.A. & M.L. Tortorello. (Eds.). *Encyclopedia of Food Microbiology* (2ªed). Oxford: Academic Press, pp. 432-438.
- Gómez Torres, N. (2017). *Control de Clostridium spp. y prevención de hinchazón tardía en queso mediante bacterias lácticas productoras de antimicrobianos, altas presiones y endolisinas fágicas*. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid.
- Guerrieri, M.C., Fanfoni, E., Fiorini, A., Trevisan, M. y Puglisi, E. (2020). Isolation and Screening of Extracellular PGPR from the Rhizosphere of Tomato Plants after Long-Term Reduced Tillage and Cover Crops. *Plants*, 9(5). DOI: <https://doi.org/10.3390/plants9050668>.
- Herman, L.M., De Block, J.H. y Waes, G.M. (1995). A direct PCR detection method for *Clostridium tyrobutyricum* spores in up to 100 milliliters of raw milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(12), pp. 4141-4146.
- Herman, L., De Block, J. y Van Renterghem, R. (1997). Isolation and detection of *Clostridium tyrobutyricum* cells in semi-soft and hard cheeses using the polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Research*, 64(2), pp. 311-314. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0022029996002063>.
- Iaconelli, A., Fiorentini, L., Bruschi, S., Rossi, F., Mingrone, G. y Piva, G. (2008). Absence of allergic reactions to egg white lysozyme additive in Grana Padano cheese. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(2), pp. 326-331.

DOI: <https://doi.org/10.1080/07315724.2008.10719707>.

Jonsson, A. (1990). Enumeration and Confirmation of *Clostridium tyrobutyricum* in Silages Using Neutral Red, D-Cycloserine, and Lactate Dehydrogenase Activity. *Journal of Dairy Science*, 73(3), pp. 719-725.

DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78725-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78725-5).

Klijn, N., Nieuwenhof, F.F., Hoolwerf, J.D., van der Waals, C B y Weerkamp, A.H. (1995). Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the causative agent of late blowing in cheese by species-specific PCR amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8), pp. 2919-2924.

Lavilla, M. (2008). *Desarrollo de un método inmunoquímico para la detección y cuantificación de esporos de Clostridium tyrobutyricum en leche*. Tesis doctoral, Universidad de Zaragoza.

Lavilla, M., Marzo, I., de Luis, R., Perez, M.D., Calvo, M. y Sánchez, L. (2010). Detection of *Clostridium tyrobutyricum* spores using polyclonal antibodies and flow cytometry. *Journal of Applied Microbiology*, 108(2), pp. 488-498.

DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04435.x>.

Lavilla, M., Moros, M., Puertas, S., Grazú, V., Pérez, M.D., Calvo, M., Fuente, J.M. y Sánchez, L. (2012). Specific peptides as alternative to antibody ligands for biomagnetic separation of *Clostridium tyrobutyricum* spores. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(10), pp. 3219-3226. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5621-z>.

Lavilla, M., De Luis, R., Pérez, M.D., Calvo, M. y Sánchez, L. (2009). Selection of high affine peptide ligands for detection of *Clostridium tyrobutyricum* spores. *Journal of Microbiological Methods*, 79(2), pp. 214-219.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.09.008>.

Le Bourhis, A.G., Dore, J., Carlier, J.P., Chamba, J.F., Popoff, M.R. y Tholozan, J.L. (2007). Contribution of *C. beijerinckii* and *C. sporogenes* in association with *C. tyrobutyricum* to the butyric fermentation in Emmental type cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 113(2), pp. 154-163.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.027>.

Le Bourhis, A., Saunier, K., Dore, J., Carlier, J., Chamba, J., Popoff, M. y Tholozan, J. (2005). Development and validation of PCR primers to assess the diversity of *Clostridium* spp. in cheese by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), pp. 29-38.

DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.29-38.2005>.

- Leggett, M.J., McDonnell, G., Denyer, S.P., Setlow, P. y Maillard, J.-. (2012). Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 113(3), pp. 485-498.  
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05336.x>.
- López-Enríquez, L., Rodríguez-Lázaro, D. y Hernández, M. (2007). Quantitative detection of *Clostridium tyrobutyricum* in milk by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(11), pp. 3747–3751. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.02642-06>.
- Martín, P. (2014). La hinchazón de los quesos. En: *Queso de oveja* [En línea] [Consultado: 2 junio, 2020] Disponible en: <https://quesodeoveja.org/la-hinchazon-en-los-quesos/>
- Martínez-Cuesta, M.C., Bengoechea, J., Bustos, I., Rodríguez, B., Requena, T. y Peláez, C. (2010). Control of late blowing in cheese by adding lacticin 3147-producing *Lactococcus lactis* IFPL 3593 to the starter. *International Dairy Journal*, 20(1), pp. 18-24.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.07.005>.
- Matteuzzi, D., Trovatelli, L.D., Biavati, B. y Zani, G. (1977). *Clostridia* from Grana Cheese. *Journal of Applied Bacteriology*, 43(3), pp. 375-382.  
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1977.tb00763.x>.
- Méndez Dónega, J. (2011). Los quesos y la tecnología: La pasteurización y otras hierbas (3). En: *Casi todo lácteo* [en línea] [Consultado: 2 junio, 2020]. Disponible en: [http://casitodolacteo.blogspot.com/2011/03/los-quesos-y-la-tecnologia-la\\_14.html](http://casitodolacteo.blogspot.com/2011/03/los-quesos-y-la-tecnologia-la_14.html).
- Morandi, S., Cremonesi, P., Silvetti, T., Castiglioni, B. y Brasca, M. (2015). Development of a triplex real-time PCR assay for the simultaneous detection of *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium sporogenes* and *Clostridium tyrobutyricum* in milk. *Anaerobe*, 34, pp. 44-49.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.005>.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. y Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51, pp. 263-273.  
DOI: <https://doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032>.
- Nescier, I., Ramos, E., De María, M., Bonzi, E., Bonvin, C. y Thomas, J. (2015). Vías de contaminación de la leche con esporas generadoras de gas butírico (*Clostridium*) a partir del silaje consumido por las vacas lecheras. *Fave. Sección Ciencias Agrarias*, 14(1), pp. 91-106. DOI: <https://doi.org/10.14409/fa.v14i1/2.5711>.
- Oude Elferink, S., Driehuis, F., Gottschal, J. y Spoelstra, S.F. (2000). Silage fermentation processes and their manipulation. En: L. 't Mannetje. (Eds.). *Silage Making in the Tropics with Particular Emphasis on Smallholders*. FAO (30 de noviembre de 2000), pp. 17-30.

- Pahlow, G., Muck, R.E., Driehuis, F., Oude Elferink, S. J. W. H. y Spoelstra, S.F. (2003). Microbiology of ensiling. En: Dwayne R. Buxton Richard E. Muck Joseph H. Harrison. (Eds.). *Silage Science and Technology, Agronomy Monograph no. 42*. American Society of Agronomy, pp. 31-93.
- Pigato, S., Andrighetto, C. y Lombardi, A. (2012). Biodiversity of clostridia isolated from milk. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 63(3), pp. 171-178.
- Reglamento (UE) N° 1129/2011 de la Comisión de 11 de noviembre de 2011 por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión. Diario Oficial de la Unión Europea, L 295 de 12 de noviembre de 2011.
- Reindl, A., Dzieciol, M., Hein, I., Wagner, M. y Zangerl, P. (2014). Enumeration of *clostridia* in goat milk using an optimized membrane filtration technique. *Journal of Dairy Science*, 97(10), pp. 6036-6045. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8218>.
- Ribeiro Junior, J.C., Tamanini, R., Soares, B.F., Oliveira, A.M.d., Silva, F.d.G., Silva, F.F.d., Augusto, N.A., Beloti, V. y CNPq (2016). Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk. *Semina: Ciências Agrárias*, 37(5), pp. 3069-3078.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5p3069>.
- Rodríguez-Lázaro, D. y Hernández, M. (2013). Real-time PCR in Food Science: Introduction. *Current Issues in Molecular Biology*, 15, pp. 25-38.
- Rodríguez-Lázaro, D., Lombard, B., Smith, H., Rzezutka, A., D'Agostino, M., Helmuth, R., Schroeter, A., Malorny, B., Miko, A., Guerra-Roman, B., Davison, J., Kobilinsky, A., Hernandez, M., Bertheau, Y. y Cook, N. (2007). Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms. *Trends in Food Science & Technology*, 18(6), pp. 306-319.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.009>.
- Salmerón, J., de Vega, C., Pérez-Elortondo, F.J., Albisu, M. y Barrón, L.J.R. (2002). Effect of pasteurization and seasonal variations in the microflora of ewe's milk for cheesemaking. *Food Microbiology*, 19(2-3), pp. 167-174.  
DOI: <https://doi.org/10.1006/fmic.2001.0475>.
- Singh, J., Birbian, N., Sinha, S. y Goswami, A. (2014). A critical review on PCR, its types and applications. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 1(7), pp. 65–80.

- Skeie, S. (2010). Milk quality requirements for cheesemaking. En: Griffiths, M.W. (Eds.). *Improving the Safety and Quality of Milk*. Cambridge, Reino Unido: Woodhead Publishing: pp. 433-453.
- Thermo Fisher Scientific (2019). Automated sample preparation for DNA, RNA, protein, or cells. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/automated-purification-extraction/kingfisher-instruments.html> [Consultado: 15 julio, 2020].
- Turchi, B., Pero, S., Torracca, B., Fratini, F., Mancini, S., Galiero, A., Pedonese, F., Nuvoloni, R. y Cerri, D. (2016). Occurrence of *Clostridium* spp. in ewe's milk: enumeration and identification of isolates. *Dairy Science & Technology*, 95(5), pp. 693-701. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13594-016-0298-x>.
- Villar, A. y Fernández, B. (1995). La contaminación butírica de la leche. Causas y efectos sobre los quesos. *Hojas Divulgadoras. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación*, Disponible en: [https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd\\_1995\\_10.pdf](https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1995_10.pdf) [Consultado: 28 marzo, 2020].
- Vissers, M.M.M., Driehuis, F., Te Giffel, M.C., De Jong, P. y Lankveld, J.M.G. (2006). Improving Farm Management by Modeling the Contamination of Farm Tank Milk with Butyric Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science*, 89(3), pp. 850-858. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72148-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72148-8).
- Vissers, M. (2007). *Modeling to control spores in raw milk*. Tesis doctoral, Wageningen University, Wageningen, the Netherlands.
- Waes, G. y Heddeghem, A. (1990). Prevention of butyric acid fermentation by bacterial centrifugation of the cheese milk. *Bulletin of the International Dairy Federation. Brussels, Belgium*, 251, pp. 47-50.
- Wiedmann, M., Boor, K.J., Eisgruber, H. y Zaadhof, K. (1999). *Clostridium. Clostridium tyrobutyricum*. En: Robinson, R.K. (Eds.). *Encyclopedia of Food Microbiology*. (2ªed.) Oxford: Elsevier, pp. 451-458.

## ANEXOS

### Anexo I

**Tabla 7.** Resultados obtenidos en el análisis de las muestras de leche cruda de vaca sospechosas de contaminación con clostridios butíricos procedentes de la Asociación Interprofesional Lechera de Aragón (AILA). NA: no aplica; NR: no realizada.

Código muestra	Descripción precultivo	Cultivo	PCR especies	Amplificación qPCR (%)	Coincidencia qPCR-cultivo	Ct	Tm	n° esporos/mL
A170714-3	Turbidez	Negativa	NA	NR				
A170927-12	Turbidez	Positiva	Negativa	NR				
A170714-4	Turbidez	Positiva	Negativa	NR				
A171005-1	Turbidez y poco gas	Negativa	NA	NR				
A171020-4	Turbidez, gas y olor a butírico	Positiva	Negativa	NR				
A171027-2	Turbidez y poco gas	Positiva	Negativa	NR				
A171027-3	Turbidez	Negativa	NA	NR				
A190617-2	Turbidez y poco gas	Negativa	NA	NR				
A190627-2	Turbidez y poco gas	Negativa	NA	0	Si			
A190717-1	Turbidez	Negativa	NA	50	No	37,09	75,72	<100
A190717-2	Turbidez y olor a butírico	Positiva	<i>C. tyrobutyricum</i>	0	No			
A190717-3	Turbidez y poco gas	Negativa	NA	0	Si			
A190726-1	Turbidez, gas, parafina desplazada y olor a butírico	Positiva	<i>C. tyrobutyricum</i>	0	No			
A171116-11	Turbidez, gas, parafina desplazada y olor a butírico	Positiva	<i>C. sporogenes</i>	0	No			
A171116-12	Turbidez, gas, parafina desplazada y olor a butírico	Positiva	<i>C. sporogenes</i>	0	No			
A171211-10	Turbidez y poco gas	Negativa	NA	0	Si			
A171215-4	Turbidez y gas	Positiva	Negativa	0	No			
A170316-9	Turbidez y gas	Negativa	Negativa	0	Si			
A170316-10	Turbidez	Positiva	Negativa	100	Si	38,81	76,01	<100
A170316-11	Turbidez y gas	Negativa	NA	50	No	37,32	76,31	<100
A170316-12	Turbidez, gas y olor a butírico	Positiva	Negativa	50	Si	37,91	76,01	<100
A170316-13	Turbidez	Negativa	NA	0	Si	44,12	78,24	
A200127-1	Turbidez	Negativa	NA	50	No	37,97	76,01	<100
A170223-1	Turbidez y poco gas	Negativa	NA	0	Si			
A170223-2	Turbidez	Positiva	Negativa	0	No	44,35	81,24	
A170310-1	Turbidez, gas y ligero olor a butírico	Positiva	Negativa	0	No			
A170310-2	Turbidez	Negativa	NA	0	Si	40,83	76,02	
A170310-3	Turbidez, gas y olor a butírico	Positiva	<i>C. sporogenes</i>	0	No			
A170310-4	Turbidez y poco gas	Negativa	NA	0	Si			
A170217-1	Turbidez	Positiva	<i>C. tyrobutyricum</i>	100	Si	33,27	76,16	190,43
A170217-2	Turbidez	Negativa	NA	100	No	34,51	76,01	<100
A170217-3	Turbidez y gas	Positiva	Negativa	100	Si	34,81	75,86	<100
A200217-1	Turbidez, gas y parafina desplazada	Positiva	Negativa	100	Si	33,10	76,01	213,49
A200217-2	Turbidez, gas, parafina desplazada y olor a butírico	Positiva	Negativa	0	No	42,12	75,86	
A200217-3	Turbidez	Negativa	NA	0	Si			
A170217-4	Turbidez y poco gas	Negativa	NA	50	No	35,47	76,16	<100
A170217-5	Turbidez y poco gas	Negativa	NA	0	Si			
A170227-2	Turbidez y poco gas	Negativa	NA	0	Si			
A200226-1	Turbidez	Negativa	NA	0	Si			
A200226-2	Turbidez	Negativa	NA	0	Si			
A200226-3	Turbidez y poco gas	Negativa	NA	0	Si			
A200520-1	Turbidez y gas	Positiva	Negativa	100	Si	37,53	76,02	<100
A200520-2	Turbidez	Negativa	NA	100	No	38,15	75,87	<100
A200520-3	Turbidez, mucho gas y parafina desplazada	Positiva	Negativa	100	Si	37,25	75,87	<100

<b>Código muestra</b>	<b>Descripción precultivo</b>	<b>Cultivo</b>	<b>PCR especies</b>	<b>Amplificación qPCR (%)</b>	<b>Coincidencia qPCR-cultivo</b>	<b>Ct</b>	<b>Tm</b>	<b>n° esporos/mL</b>
<b>A200527-1</b>	Turbidez	Negativa	NA	100	No	37,35	75,87	<100
<b>A200527-2</b>	Turbidez y gas	Positiva	Negativa	100	Si	37,76	76,02	<100
<b>A200527-3</b>	Turbidez	Negativa	NA	100	No	37,79	76,02	<100
<b>A200618-1</b>	Turbidez, gas y parafina desplazada	Positiva	Negativa	100	Si	38,79	76,01	<100
<b>A200618-2</b>	Turbidez	Negativa	NA	100	No	38,76	76,01	<100
<b>A200618-3</b>	Turbidez	Negativa	NA	50	No	36,81	76,16	<100
<b>A200626-1</b>	Turbidez, gas y parafina desplazada	Negativa	NA	0	Si			
<b>A200626-2</b>	Turbidez	Negativa	NA	50	No	33,17	76,01	204,66
<b>A200626-3</b>	Turbidez	Negativa	NA	0	Si			

## Anexo II

**Tabla 8.** Resultados obtenidos en el análisis de las muestras de leche cruda de oveja sospechosas de contaminación con clostridios butíricos procedentes Instituto Lactológico de Lekunberri (ILL). NA: no aplica; NR: no realizada.

Código muestra	Descripción pre cultivo	Cultivo	PCR especies	Amplificación qPCR (%)	Coincidencia qPCR-cultivo	Ct	Tm	n° esporos/mL
L200304-1	Turbidez y bastante gas	Positiva	Negativa	50	Si	37,28	76,16	<100
L200304-2	Turbidez y gas	Negativa	NA	0	Si			
L200304-3	Turbidez y bastante gas	Negativa	NA	50	No	38,84	76,31	<100
L200304-4	Turbidez y gas	Negativa	NA	0	Si			
L200304-5	Turbidez y bastante gas	Negativa	NA	0	Si			
L200304-6	Turbidez y bastante gas	Negativa	NA	0	Si			
L200304-7	Turbidez y poco gas	Negativa	NA	0	Si	40,34	73,18	
L200304-8	Turbidez y bastante gas	Negativa	NA	50	No	39,36	76,01	<100
L200304-9	Turbidez y bastante gas	Positiva	Negativa	0	No	40,92	73,18	
L200304-10	Turbidez y poco gas	Negativa	NA	0	Si			
L200304-11	Turbidez y poco gas	Positiva	Negativa	0	No			
L200304-12	Turbidez	Negativa	NA	100	No	35,46	76,31	<100
L200304-13	Turbidez	Negativa	NA	100	No	36,63	76,16	<100
L200304-14	Turbidez	Negativa	NA	100	No	37,73	76,01	<100
L200304-15	Turbidez	Negativa	NA	100	No	36,67	76,16	<100
L200304-16	Turbidez	Negativa	NA	100	No	37,28	76,16	<100
L200304-17	Turbidez gas	Positiva	Negativa	100	Si	37,74	76,16	<100
L200304-18	Turbidez	Negativa	NA	100	No	36,86	76,16	<100
L200304-19	Turbidez	Negativa	NA	100	No	38,02	76,31	<100
L200304-20	Turbidez y poco gas	Positiva	Negativa	100	Si	36,70	76,31	<100
L200304-21	Turbidez	Negativa	NA	100	No	36,78	76,16	<100
L200304-22	Turbidez	Negativa	NA	100	No	37,84	76,16	<100
L200304-23	Turbidez	Negativa	NA	100	No	33,00	76,01	229,16
L200304-24	Turbidez	Negativa	NA	100	No	33,55	75,86	157,76
L200304-25	Turbidez y gas	Negativa	NA	0	Si			
L200304-26	Turbidez, mucho gas y parafina desplazada	Negativa	NA	0	Si			
L200304-27	Turbidez, gas y parafina desplazada	Negativa	NA	0	Si			
L200304-28	Turbidez, gas y parafina desplazada	Negativa	NA	0	Si	42,11	83,31	
L200304-29	Turbidez y poco gas	Negativa	NA	0	Si			
L200304-30	Turbidez	Negativa	NA	0	Si			
L200304-31	Turbidez	Negativa	NA	100	No	37,63	76,02	<100
L200304-32	Turbidez y poco gas	Negativa	NA	0	Si			
L200304-33	Turbidez y poco gas	Negativa	NA	100	No	38,40	75,87	<100
L200304-34	Turbidez	Negativa	NA	100	No	38,02	75,87	<100
L200304-35	Turbidez	Negativa	NA	100	No	37,62	76,02	<100
L200304-36	Turbidez	Negativa	NA	100	No	36,93	75,87	<100
L200304-37	Turbidez	Negativa	NA	100	No	39,83	75,87	<100
L200304-38	Turbidez	Negativa	NA	100	No	38,32	76,02	<100
L200304-39	Turbidez	Negativa	NA	100	No	37,30	76,02	<100
L200304-40	Turbidez	Negativa	NA	50	No	36,06	75,87	<100
L200304-41	Turbidez, gas y parafina desplazada	Positiva	Negativa	100	Si	37,56	75,87	<100
L200612-1	Turbidez	Negativa	NR	100	No	37,89	76,16	<100
L200612-2	Turbidez	Negativa	NR	100	No	38,29	76,01	<100
L200612-3	Turbidez, gas y parafina desplazada	Negativa	NR	100	No	38,92	76,01	<100
L200612-4	Turbidez	Negativa	NR	100	No	37,14	76,16	<100

Código muestra	Descripción precultivo	Cultivo	PCR especies	Amplificación qPCR (%)	Coincidencia qPCR-cultivo	Ct	Tm	n° esporos/mL
L200612-5	Turbidez	Negativa	NR	100	No	37,69	76,01	<100
L200612-6	Turbidez	Negativa	NR	100	No	38,78	76,01	<100
L200612-7	Turbidez	Negativa	NR	100	No	36,72	76,01	<100
L200612-8	Turbidez, gas y parafina desplazada	Positiva	NR	100	Si	38,46	76,16	<100
L200612-9	Turbidez	Negativa	NR	100	No	37,66	76,01	<100
L200612-10	Turbidez	Negativa	NR	0	Si			
L200612-11	Turbidez, gas y parafina desplazada	Negativa	NR	0	Si			
L200612-12	Turbidez	Negativa	NR	0	Si			
L200612-13	Turbidez	Negativa	NR	0	Si			
L200612-14	Turbidez	Negativa	NR	0	Si			
L200612-15	Turbidez	Negativa	NR	0	Si	44,31	76,31	
L200612-16	Turbidez, gas y parafina desplazada	Positiva	NR	50	Si	31,70	76,01	552,75
L200612-17	Turbidez	Positiva	NR	0	No			
L200612-18	Turbidez	Negativa	NR	0	Si	37,89	83,61	
L200612-19	Turbidez	Positiva	NR	100	Si	35,68	76,01	<100
L200612-20	Turbidez	Positiva	NR	0	No	42,11	78,55	
L200612-21	Turbidez	Negativa	NR	50	No	35,60	76,01	<100
L200612-22	Turbidez	Positiva	NR	0	No			
L200612-23	Turbidez	Positiva	NR	0	No			
L200612-24	Turbidez	Negativa	NR	0	Si			

### Anexo III

**Tabla 9.** Resultados obtenidos en la identificación de especies mediante secuenciación del gen 16S rDNA bacteriano.

Muestra	Bacteria	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
A171215-4	<i>Paenibacillus thermophilus</i>	1127	1127	93%	0	93,58%	NR_118419.1
A170316-12	<i>Clostridium perfringens</i>	1491	14813	98%	0	97,50%	LS483461.1
A200117-1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	1515	1515	97%	0	97,85%	MT545035.1
A200217-2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1493	1493	96%	0	97,61%	MT299621.1
L200304-1	<i>Clostridium perfringens</i>	1447	14348	98%	0	96,91%	LS483393.1
L200304-9	<i>Clostridium sporogenes</i>	1506	1506	98%	0	97,42%	DQ278864.1
L200304-17	<i>Clostridium perfringens</i>	1439	1439	98%	0	95,99%	MN326666.1
L200304-20	<i>Clostridium perfringens</i>	1461	1461	96%	0	97,77%	MN064652.1
A170310-1	<i>Paenibacillus</i>	1515	1515	96%	0	98,06%	LC167138.1
A171027-2	<i>Paenibacillus thermophilus</i>	1511	1511	95%	0	98,17%	NR_118419.1
A200520-3	<i>Clostridium luticerallii</i>	1400	1400	95%	0	96,28%	MT265070.1
A200527-2	<i>Paenibacillus macerans</i>	1262	1262	86%	0	95,07%	AM406669.1
L200304-41	<i>Clostridium perfringens</i>	1465	1465	95%	0	97,78%	MT158897.1
A170217-3	<i>Clostridium bifermentans</i>	1489	1489	92%	0	98,58%	KC525132.1
A170223-2	<i>Paenibacillus</i>	1101	1101	85%	0	91,85%	LC167138.1
A170310-3	<i>Clostridium sporogenes</i>	1524	13643	98%	0	98,07%	CP011663.1
A200618-1	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	1205	1205	76%	0	97,80%	MT269011.1
L200612-8	<i>Clostridium perfringens</i>	1210	1210	77%	0	97,54%	MT613499.1
L200612-16	<i>Clostridium sporogenes</i>	1216	1216	77%	0	98,10%	MT356160.1
L200612-17	<i>Lactobacillus paracasei</i>	1164	1164	75%	0	95,92%	MT473336.1
L200612-19	<i>Lactobacillus paracasei</i>	1225	1225	79%	0	96,12%	MT473336.1
L200612-20	<i>Lactobacillus paracasei</i>	937	937	63%	0	94,11%	MT473336.1
L200612-22	No identificada						
L200612-23	<i>Lactobacillus casei</i>	442	442	42%	2E-119	82,56%	MT473337.1