



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria



ÍNDICE

RESUMEN / ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Fermentación butírica.....	3
1.2 Principales vías de contaminación de la leche con clostridios butíricos.....	5
1.3 Métodos de detección, cuantificación e identificación de los clostridios butíricos.....	7
1.3.1 Técnicas microbiológicas	8
1.3.2 Técnicas inmunológicas	9
1.3.3 Técnicas de biología molecular	10
1.4 Métodos preventivos de la hinchazón tardía.....	14
1.5 Bioseparación magnética	17
2. OBJETIVOS	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1 Cultivo y esporulación de clostridios butíricos	19
3.1.1 Cultivo de células vegetativas	19
3.1.2 Métodos de esporulación	19
3.1.2.1 Esporulación en medio líquido.....	19
3.1.2.2 Esporulación en medio sólido	20
3.1.2.3 Obtención de los esporos.....	20
3.2 Extracción de DNA y PCR a tiempo real (qPCR)	21
3.2.1 Extracción de DNA de células vegetativas	21
3.2.2 Extracción de DNA de esporos butíricos presentes en PBS y leche	22
3.2.2.1 Tratamiento de los esporos en PBS	22
3.2.2.2 Tratamiento de las muestras de leche contaminada con esporos	23



3.2.2.3	Condiciones de la PCR a tiempo real (qPCR).....	24
3.2.2.4	Visualización de los productos de qPCR en gel de agarosa.....	25
3.3	Identificación de esporos butíricos mediante cultivo microbiológico.....	26
3.4	Bioseparación magnética de esporos butíricos en leche UHT.....	26
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
4.1	Optimización de la metodología.....	28
4.2	Análisis de muestras de leche cruda de vaca.....	32
4.2.1	Identificación de esporos butíricos en leches sospechosas mediante cultivo microbiológico.....	33
4.2.2	Detección de clostridios butíricos en leches sospechosas por qPCR.....	35
4.2.3	Visualización de los productos de amplificación mediante gel de agarosa.....	39
4.3	Estudio de la bioseparación magnética de esporos butíricos en leche UHT ...	40
5.	CONCLUSIONES.....	42
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
ANEXOS		

RESUMEN / ABSTRACT

El defecto de la hinchazón tardía del queso es causado por la germinación de esporos del género *Clostridium*, generalmente *C. tyrobutyricum*, durante la etapa de maduración. Este defecto es uno de los mayores problemas en la fabricación de quesos de pasta dura y semi-dura, provocando alteraciones en la textura y sabor del queso, así como importantes pérdidas económicas. En la actualidad, no existe un método rápido que sea capaz de detectar leche contaminada con esporos butíricos. Los métodos empleados para la detección de los clostridios butíricos son principalmente microbiológicos, los cuales necesitan largos tiempos de incubación y presentan una baja sensibilidad. Por lo tanto, en este estudio se pretendió poner las bases para el desarrollo de un método rápido y fiable, para detectar esporos butíricos en leche, basado en PCR a tiempo real (qPCR) y compararlo con el cultivo microbiológico. Por un lado, para la cuantificación de esporos en leche, se ha necesitado un pretratamiento de la leche con subtilisina, la ruptura mediante microondas de los esporos y una etapa de purificación del DNA. Para demostrar la aplicabilidad del método, se analizaron muestras de leche de vaca sospechosas de estar contaminadas con clostridios butíricos. Por otro lado, también se trató de evaluar la posible aplicación de micropartículas magnéticas (MMPs) funcionalizadas con un ligando específico, afín por los esporos, para su bioseparación de la leche. Los resultados indicaron que algunas muestras de leche estaban contaminadas con esporos de *C. tyrobutyricum*; sin embargo, se detectaron diferencias en algunas muestras, entre los resultados de la amplificación del DNA y los del cultivo microbiológico. Finalmente, mediante la utilización de MMPs para la separación de esporos butíricos, se obtuvo mayor afinidad por los esporos de *C. tyrobutyricum*, que por los de *C. butyricum* y *C. beijerinckii*.

The late bowing defect in cheese is caused by the germination of spores from the genus *Clostridium*, usually *C. tyrobutyricum*, during the ripening stage. This defect is one of the major problems in the manufacture of hard and semi-hard cheeses, causing alterations in their texture and flavour, as well as, significant economic losses. Nowadays, there are not fast methods capable of detecting milk contaminated with butyric spores. The methods used for the detection of butyric clostridia are mainly microbiological which need longer incubation times and have low sensitivity. Thus, this study pursued to provide the basis for the development of a rapid and reliable method for detecting butyric spores in milk based on real-time PCR (qPCR), comparing it with microbiological culture. On one hand, for spore quantification in milk, a pre-treatment of the milk with subtilisin is needed, followed by a



microwave disruption of spores and a final purification stage of the DNA. To demonstrate the applicability of the method, samples of cow's milk suspected of being contaminated were analyzed. On the other hand, the possible application of magnetic microparticles (MMPs) functionalized with a specific ligand for the spores, was also evaluated for their bioseparation from milk. The results indicated that some samples of milk were found to be contaminated with *C. tyrobutyricum* spores; however, differences were detected in some samples between the results of DNA amplification and those of microbiological culture. Finally, higher affinity was obtained by using MMPs to separate butyric spores for *C. tyrobutyricum* than for *C. butyricum* and *C. beijerinckii*.

1. INTRODUCCIÓN

El género *Clostridium* pertenece a la familia *Clostridiaceae* y, por el momento, se han reconocido 231 especies dentro de él (Parte, 2018). Son bacilos Gram positivos, formadores de endosporas, suelen aparecer solos, agrupados en parejas o formando cadenas cortas, y pueden ser móviles, debido a flagelos peritricos, o inmóviles. Los esporos presentan una forma ovalada o esférica y se sitúan en el centro del bacilo o en un extremo subterminal deformando, generalmente, la célula vegetativa. Por lo general, las especies que forman este género son anaerobios estrictos y la mayoría de las células vegetativas mueren en presencia de oxígeno, sin embargo, todos los esporos sobreviven a largas exposiciones a oxígeno/aire (Gómez-Torres, 2017).

Dentro del género *Clostridium* se encuentran los clostridios butíricos, formadores de ácido butírico, que no constituyen un riesgo para el consumidor, pero si suponen un problema importante para la industria láctea, ya que generan pérdidas económicas al estar implicados en el deterioro de los quesos (Villar y Fernández, 1995). El principal agente responsable de la fermentación butírica es el *Clostridium tyrobutyricum*, sin embargo, hay estudios que confirman que se han aislado otros clostridios en quesos afectados por este defecto, en particular *C. butyricum*, *C. beijerinckii*, *C. acetobutylicum* y *C. sporogenes* (Klijn et al., 1995; Le Bourhis et al., 2007).

La fermentación butírica se debe a los esporos, las formas de resistencia de los clostridios butíricos, que pueden encontrarse en la leche cruda como contaminantes o proceder de algún punto de la cadena de producción. Los esporos son resistentes a procesos de esterilización, choques de calor, frío, presión, radiación, agentes químicos, desecación y pH extremos (Postollec et al., 2012). Por ello, los esporos permanecen en la leche después de los tratamientos de higienización y es en la etapa de maduración de los quesos cuando tiene lugar su germinación y la fermentación butírica, que produce el defecto conocido como "hinchazón tardía".

1.1 Fermentación butírica

La fermentación butírica o hinchazón tardía aparece en los quesos, semanas o incluso meses después de su fabricación. Esto se debe a que los esporos de los clostridios butíricos que han contaminado la leche permanecen en los quesos una vez procesados sin ningún tipo de actividad. Sin embargo, en la etapa de maduración es cuando estos esporos germinan, transformándose en células vegetativas (Leisen, 2002). Estas formas vegetativas son las causantes de metabolizar el ácido láctico, liberando a causa de la fermentación, ácido butírico

y gas, CO₂ y H₂ (Drouin y Lafreniere, 2012). Como resultado de la fermentación butírica, la matriz del queso no es capaz de soportar, a menudo, la presión ejercida por el gas generado y aparecen, como se muestra en la Figura 1, agujeros irregulares, rayas y/o grietas en su interior que pueden llegar al exterior.



Figura 1. Defectos ocasionados por la fermentación butírica debidas a *C. tyrobutyricum*. Fotos superiores: queso de pasta dura. Quesos inferiores: quesos de pasta semidura (Jakob, 2011).

Las alteraciones físicas que tienen lugar en el queso por la fermentación butírica vienen acompañadas normalmente de sabor y olor desagradables, provocados por los ácidos producidos. La formación de ácido butírico da lugar a notas de olor a rancio, fecales y a sudor (Curioni y Bosset, 2002). También se genera ácido acético que se asocia con notas de olor penetrante a vinagre. Por último, la formación de ácido propiónico produce olor penetrante a gas y a quemado. Se ha demostrado en diferentes estudios, que la producción de estos ácidos en mayor o menor cantidad, depende de la cepa de origen (Garde et al., 2011; Le Bourhis et al., 2007). La aparición de estos defectos de textura, olor, flavor y sabor desagradables en los quesos, causa graves pérdidas económicas en la industria, llegando a convertir el queso en un producto no comercializable como tal, destinándose a productos derivados como el queso rallado, procesado o fundido (Zhao et al., 2013).

Este tipo de alteración afecta fundamentalmente a quesos de pasta dura y semidura, como Emmental, Gouda, Gruyère, Edam, Parmesano, Grana Padano y Cheddar, elaborados con leche de vaca (Dasgupta y Hull, 1989). También podemos encontrar este problema en quesos elaborados con leche de cabra y de oveja, como es el caso del queso Manchego (Garde et al., 2011). Como se ha dicho anteriormente, el tiempo de maduración de estos quesos suele ser largo, en este tiempo se crean condiciones favorables para la germinación de los esporos butíricos y la proliferación de sus células vegetativas, como son: pH elevado, baja concentración de sal, alta humedad y atmósfera reductora.

La aparición, velocidad, frecuencia e intensidad de la hinchazón tardía, así como el número de quesos afectados, depende del número de esporos iniciales presentes en la leche. En varios estudios se ha descrito que el número de esporos necesarios para desarrollar el defecto de la hinchazón tardía es bajo. Algunos autores consideran que concentraciones de 100 esporos/L en leche cruda, serían suficientes para generar este defecto (Dasgupta y Hull, 1989). Sin embargo, otros autores consideran que incluso una concentración menor, de 50 esporos/L, puede producir la hinchazón (López-Enríquez et al., 2007).

1.2 Principales vías de contaminación de la leche con clostridios butíricos

Los clostridios butíricos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. En concreto, en la elaboración de productos lácteos, estos esporos se encuentran en los diferentes ambientes de la cadena láctea y en la misma leche cruda como contaminantes, germinando en el proceso de producción de los quesos (Leisen, 2002). Las condiciones óptimas para germinar y comenzar a reproducirse son, un ambiente anaerobio, abundancia de nutrientes y alto contenido de agua (Villar y Fernández, 1995). El medio que suele reunir las condiciones de crecimiento óptimas para los esporos butíricos es el suelo, considerándose la principal fuente de contaminación de los esporos a la leche (Driehuis, 2013).

Como se puede observar en la Figura 2, el forraje verde se contamina por el paso de los clostridios butíricos del suelo a la planta durante el crecimiento y/o la recolección. El grado de contaminación depende tanto de las condiciones climáticas como de las máquinas de recolección. Cuando el clima es lluvioso o la altura del cultivo es muy baja, se presenta una mayor contaminación de las plantas que van a constituir el ensilado, que a su vez puede ser la causa de un mayor recuento de esporos en la leche de las vacas que se alimentan con él (Drouin y Lafreniere, 2012; Brändle et al., 2016).

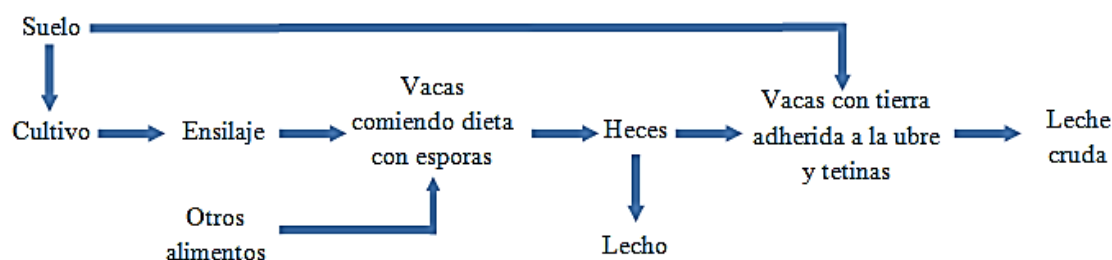


Figura 2. Ruta de contaminación de la leche por esporos de clostridios butíricos. Adaptado de Driehuis, (2013).

El proceso de ensilado se basa en la fermentación del forraje por las bacterias ácido lácticas en condiciones anaerobias, con la consiguiente producción de ácidos orgánicos (Weinberg y Ashbell, 2003). Si en el ensilado hay demasiada tierra presente como vector de contaminantes, la capacidad de amortiguación del ensilaje aumenta y el proceso de

acidificación se retrasa. Estas condiciones pueden llegar a favorecer que los clostridios butíricos esporulen, crezcan y se multipliquen, dando lugar a una fermentación secundaria (Dunière et al., 2013).

Tras la ingestión del ensilado u otros alimentos contaminados por la vaca, los esporos son capaces de sobrevivir a su paso a través del tracto digestivo del rumiante y acumularse en las heces. Esta etapa agrava el problema, ya que la concentración de esporos aumenta en las heces de 3 a 5 veces, en comparación con los niveles presentes en el ensilado consumido (Vissers et al., 2007). Las heces excretadas vuelven a contaminar los cultivos al ser reutilizadas como estiércol en los campos, contaminando también los establos y las ubres de las vacas.

Finalmente, los esporos ingresan en la leche, principalmente durante el ordeño, debido a que las ubres no están suficientemente limpias y a que no se realiza una adecuada desinfección de los equipos, o bien por contacto directo con el ensilado (Brändle, Domig y Kneifel, 2016). Por lo tanto, es indispensable aplicar unas buenas prácticas de manejo de los animales y desinfección en los equipos por donde va a circular la leche, además de una higiene adecuada de los establos, alimentación y ordeño. Debido a la presencia de clostridios en el entorno de la granja, el riesgo de contaminación por los esporos solo se puede reducir, pero no se puede evitar por completo (Vissers et al., 2007; Brändle et al., 2016).

Según diversos estudios, se ha observado que la estacionalidad también afecta a la probabilidad de contaminación de la leche. Como se muestra en la Figura 3, en leche cruda de oveja, los valores más altos de contaminación se registran en verano. El porcentaje de leches contaminadas en las otras estaciones del año varía según la zona geográfica. En el estudio de Garde et al. (2011) realizado en queserías de queso Manchego (España), la contaminación fue significativamente mayor en invierno que en otoño y primavera. Sin embargo, en el estudio de Turchi et al. (2016) de queserías de la provincia de Grosseto (Italia), la contaminación fue mayor en otoño que en primavera e invierno.

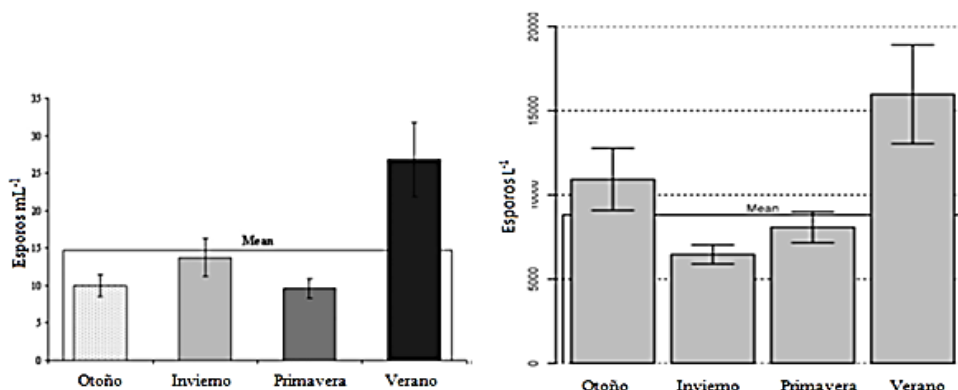


Figura 3. Variación estacional de los niveles de esporos de clostridios butíricos en leche cruda de oveja. A la izquierda, Queserías Manchegas (España) (Garde et al., 2011); a la derecha, Quesería provincia de Grosseto (Italia) (Turchi et al., 2016).

Sin embargo, según algunos autores como Salmerón et al. (2002) y Vissers et al. (2007) el mayor recuento de esporos butíricos en leche de vaca cruda, se produce en invierno y otoño. Debido al descenso de las temperaturas y aumento de las precipitaciones, las vacas se recogen gran parte del día en los establos, incrementando el consumo de ensilado y dificultando la higiene en el momento del ordeño.

Debido al importante problema económico que genera la hinchazón tardía, en algunos países como Italia o Francia, se han establecido los sistemas de pago por calidad de la leche, incluyendo el recuento de esporos butíricos. Como se puede observar en la Tabla 1, Italia tiene un sistema muy exigente, estimando un nivel aceptable como máximo de 200 esporos/L en la leche de vaca, por encima del cual se considera que se puede producir el problema de la hinchazón tardía. En cambio, Francia define leche de calidad excelente aquella con una carga inferior a 400 esporos/L (Arias, 2013).

Tabla 1. Clasificación de la leche de vaca en función de la contaminación por esporos butíricos. (Arias, 2013).

Italia		Francia	
< 200	Ausencia de hinchazón tardía	< 400	Excelente
200 - 1.000	Algunos casos de hinchazón	400 - 1000	Poco contaminada
		1.000 - 4.000	Contaminada
> 1.000	Hinchazón generalizada	4.000 - 10.000	Muy contaminada
		> 10.000	Pésima

1.3 Métodos de detección, cuantificación e identificación de los clostridios butíricos

En general, la fermentación butírica se reconoce fácilmente en el queso madurado debido a sus destacados aspectos sensoriales. Como se ha mencionado anteriormente, el sabor a rancio del ácido butírico junto con la formación de ojos irregulares, hendiduras y grietas en los quesos, son indicadores bien conocidos de hinchazón tardía. En caso de duda, se podría

detectar mediante la cuantificación de ácidos carboxílicos volátiles, por medio de cromatografía de gases, para evaluar el grado de fermentación por los niveles de ácido butírico (Jakob, 2011). También, en el estudio de Lee et al. (2012) se sugiere la utilización de tomografía computerizada para la detección de los agujeros producidos por el gas y la alteración de la estructura del queso, evitando así la destrucción del mismo. Sin embargo, cuando ya se detectan daños en el queso, las pérdidas económicas son inevitables. Por lo tanto, es de gran importancia la detección de los clostridios butíricos en la leche antes de su procesado, para determinar su destino, ya que la leche contaminada con esporos, no se puede destinar a la elaboración de quesos de larga maduración. Sin embargo, los métodos desarrollados hasta el momento no son lo suficientemente rápidos como para que las industrias queseras puedan actuar en el proceso de elaboración del queso en función del número de esporos que presente la leche.

1.3.1 Técnicas microbiológicas

Actualmente, el único procedimiento de referencia para la detección de la contaminación de la leche con esporos butíricos, es la técnica del "número más probable" o *Most Probable Number* (MPN o NMP en español) (Bergère y Sivelä, 1990). Este método consiste en el cultivo, por triplicado, de diluciones seriadas de la leche en caldo nutritivo Bryant y Burkey con lactato. Este medio se inocula con las muestras de leche tratadas térmicamente para la eliminación de células vegetativas, y se incuban en condiciones de anaerobiosis a 37 °C. Tras 7 días de incubación, se consideran tubos positivos los que presentan formación de gas.

A pesar de que el MPN es un sistema muy apropiado para el control de calidad de la leche, presenta varios inconvenientes. En primer lugar, resulta poco preciso y poco reproducible (Bergère y Sivelä, 1990). Pueden aparecer tanto falsos positivos, principalmente por la presencia de otros microorganismos que han resistido al tratamiento térmico, como falsos negativos, debidos a que el tiempo de incubación no ha sido suficiente para que germinasen los esporos. Este método tampoco permite identificar los microorganismos a nivel de especie (Villar y Fernández, 1995). Otro inconveniente es que se trata de un método lento, por lo que cuando se recibe el resultado del análisis, la leche contaminada ya ha entrado en el proceso de producción del queso. El resultado obtenido por el MPN, basado en un método estadístico, solo permite una estimación semicuantitativa de la presencia de esporos butíricos, pero nunca refleja la concentración real de esporos en la muestra.

Los recuentos directos en placa también pueden utilizarse como un método alternativo. Sin embargo, el inconveniente de esta técnica es la baja sensibilidad para detectar las bajas

concentraciones de esporos capaces de producir hinchazón tardía. El medio de cultivo RCM (*Reinforced Clostridial Medium*), se ha utilizado con frecuencia para la enumeración no selectiva de clostridios en ensilados, leche y comida (Gibson, 1965). Posteriormente, se desarrolló una modificación de este método consiguiendo diferenciar las colonias del género *Clostridium* de las bacterias de otros géneros como *Bacillus*. Esta modificación consiste en la adición al medio de cultivo de dos compuestos, el Rojo Neutro y la D-cicloserina. Éste último, es un compuesto inhibitorio del crecimiento de las bacterias anaerobias facultativas, entre ellas las del género *Bacillus*, seleccionando así el crecimiento de los clostridios que son resistentes a él (Jonsson, 1990). Al igual que el método anterior, este es un método lento ya que necesita un tiempo de incubación largo.

Otros estudios, como el descrito por Bourgeois et al. (1984), sugirieron el desarrollo de una técnica de filtración por membrana, como una alternativa a los métodos de MNP, que son engorrosos y consumen mucho tiempo y material. Mediante esta técnica de filtración, se consigue concentrar la baja cantidad de esporos existentes en la leche y posteriormente se cultiva el filtro en un medio selectivo. Posteriormente, Reindl et al. (2014) modificaron la técnica para poder aplicarla a leche de cabra, ya que producía problemas con la capacidad de filtración debido al alto contenido fisiológico de células somáticas, superiores a 10^6 /mL.

Otra técnica que se ha utilizado con éxito en algunos laboratorios de control de calidad para el recuento de butíricos, utilizando un medio específico y unas condiciones de cultivo adecuadas, ha sido la impedancia. Es un método indirecto de valoración de carga microbiana. Relaciona cambios en la conductividad eléctrica en el medio de cultivo, debidos a la actividad microbiana, con el número de bacterias (Villar y Fernández, 1995).

1.3.2 Técnicas inmunológicas

Los inmunoensayos generalmente se basan en el uso de anticuerpos como elementos de detección, ya que se unen específicamente a moléculas complejas. Esto es debido a su alta especificidad, sensibilidad y versatilidad. Estos métodos se han vuelto muy populares en los últimos años en el campo de la Ciencia de los alimentos, por su carácter económico y rápido (Díaz-Amigo, 2010). Sin embargo, no se han establecido métodos inmunológicos para el análisis de rutina de clostridios butíricos debido a que la detección de un antígeno incluido en la corteza del esporo es compleja por ser difícil de solubilizar. Además, mientras que los métodos inmunológicos pueden detectar cantidades extremadamente bajas de moléculas pequeñas, como las toxinas bacterianas, el límite de detección para células bacterianas es relativamente alto, alrededor de 10^3 - 10^4 células/mL. Hay que tener en cuenta que solo 50

esporos/L pueden causar defectos por hinchazón tardía en queso. Por lo tanto, antes de realizar el inmunoensayo es necesaria una etapa de enriquecimiento, por lo que se alarga el procedimiento (Brändle, et al., 2016).

Lavilla et al. (2010) desarrollaron un método de detección específica de *C. tyrobutyricum* mediante la técnica de citometría de flujo, utilizando anticuerpos policlonales marcados con dos tipos de moléculas fluorescentes, isotiocianato de fluoresceína y Alexa Fluor 488. Se alcanzó un límite de detección de 10^3 esporos en 100 mL de leche y la técnica desarrollada permitió realizar el análisis en un tiempo aproximado de 2 horas. Con este método, a diferencia de los métodos clásicos, se consiguió reducir los tiempos prolongados de incubación.

Como alternativa a los anticuerpos, Lavilla et al. (2009) seleccionaron por la técnica de Phage Display péptidos afines a esporos de *C. tyrobutyricum*. Posteriormente, se unieron a nanopartículas magnéticas, consiguiendo una mayor relación de recuperación de esporos en leche, debido a su mayor afinidad (Lavilla et al., 2012).

1.3.3 Técnicas de biología molecular

Con el fin de solucionar las desventajas de algunos de los métodos utilizados para la detección de microorganismos, como son el coste, el tiempo de incubación o la sensibilidad, en las últimas décadas se han desarrollado diferentes técnicas rápidas de detección y cuantificación de células vegetativas y esporos bacterianos. En concreto, las técnicas de biología molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa o *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Rodríguez-Lázaro y Hernández, 2013) se han aplicado a la detección de diversos microorganismos.

La PCR es una técnica creada por el bioquímico Kary Mullis en 1983 (Mullis, 1990). Está basada en la síntesis enzimática de DNA *in vitro*, catalizada por una DNA polimerasa, que permite obtener múltiples copias iguales de un fragmento específico, partiendo de una mínima cantidad de DNA denominado molde. La técnica se lleva a cabo a partir de cebadores o *primers*, que son secuencias de oligonucleótidos que hibridan en las cadenas complementarias del DNA de la muestra, flanqueando el fragmento que va a ser amplificado. Cada ciclo de PCR se produce en varias etapas; desnaturalización por calor del DNA molde, reconocimiento del cebador y su acoplamiento con el DNA molde (hibridación) y finalmente la elongación del cebador por acción de la DNA polimerasa. Como cada hebra de DNA recién sintetizada sirve de molde para las reacciones siguientes, repitiendo los ciclos de desnaturalización-

hibridación-elongación, se logra amplificar el fragmento delimitado por los cebadores de forma exponencial. En la práctica, suelen realizarse unos 20 - 30 ciclos, con lo que se consigue una amplificación de unas $10^6 - 10^{11}$ veces la cantidad inicial de DNA (Arias, 2013).

La PCR convencional, es una técnica no cuantitativa y únicamente permite detectar el DNA. Tras la amplificación, es necesario realizar una electroforesis para detectar el producto amplificado mediante la unión al DNA de una molécula fluorescente, como el bromuro de etidio, y observar el gel bajo luz UV. En los últimos años, se ha sustituido el bromuro de etidio por el SYBR *Safe*, al ser una alternativa más segura. La técnica de PCR convencional ha evolucionado en las últimas décadas surgiendo diferentes modalidades, que se han empleado, entre otras finalidades, para la detección y cuantificación de bacterias. Como es el caso del estudio realizado por Can et al. (2014), donde detectaron *Salmonella* spp. en pasteles de crema, mediante el análisis por PCR.

En el estudio realizado por Klijn et al.(1995) detectaron *C. tyrobutyricum* en quesos fabricados con leche contaminada con 10^3 esporos/mL, mediante la utilización de PCR Anidada o *Nested* PCR. Herman et al. (1995) consiguieron disminuir el límite de detección de *C. tyrobutyricum* en leche hasta 30 esporos/mL. Esta técnica de PCR Anidada mejora la especificidad y el rendimiento de los amplicones deseados. La técnica consiste en el diseño de dos pares de cebadores de PCR: un conjunto de cebadores externos flanquea una región de DNA más extensa, que contiene el amplicón de interés. Un segundo conjunto de cebadores, cebadores anidados, flanquea la región precisa de DNA a amplificar. Los cebadores externos se usan en una primera PCR, cuyo producto se utiliza como molde en una segunda PCR con los cebadores anidados (Haft, 1994).

Otra variación fue la utilizada por Cremonesi et al. (2012), que desarrollaron una PCR en la que a partir de un solo ensayo pudieron detectar cuatro especies de clostridios: *C. tyrobutyricum*, *C. beijerinckii*, *C. butyricum* y *C. sporogenes*, con una sensibilidad de 10^2 UFC/mL. Esta variación fue la PCR Múltiple o *Multiplex* PCR, que permite la amplificación simultánea de diferentes secuencias de DNA en un mismo proceso de amplificación, utilizando diferentes *primers*. Esta técnica es interesante ya que a pesar de que *C. tyrobutyricum* es el principal responsable de la hinchazón tardía del queso, existen otros clostridios que pueden estar implicados en este defecto.

En la PCR a tiempo real o *Real time* PCR (qPCR), los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de una acción posterior. Tiene como principal característica, la detección de la amplificación de

DNA en tiempo real mediante el uso de moléculas fluorescentes, pudiendo medir en cada momento la cantidad de DNA sintetizado. Esto es debido a que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de DNA formado, permitiendo conocer en todo momento la cinética de la reacción de amplificación (Michael, 2012).

Los sistemas de detección por fluorescencia pueden ser de dos tipos, mediante agentes intercalantes o por sondas específicas marcadas con fluorocromos diseñados de manera especial. Los agentes intercalantes son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen al DNA de doble hélice. El más empleado en qPCR es el SYBR Green. El incremento de DNA en cada ciclo se refleja por un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. Este sistema tiene como ventaja respecto a las sondas específicas, además de ser más barato, una mayor sencillez en la optimización de las condiciones de la reacción. El principal inconveniente de los agentes intercalantes es su baja especificidad, debido a que se unen indistintamente a productos generados inespecíficamente o a dímeros de *primers*, muy frecuentes en la PCR. Para mejorar la especificidad, se deben emplear condiciones de reacción óptimas y una selección cuidadosa de los *primers*, para reducir el riesgo de formación de dímeros. También es recomendable, iniciar el proceso de síntesis de DNA a temperaturas elevadas, para disminuir el riesgo de amplificaciones inespecíficas (Costa, 2004).

Las sondas de hibridación específicas son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia entre las dos moléculas. Las sondas más utilizadas son las de hidrólisis, denominadas sondas TaqMan. Estas sondas son oligonucleótidos doblemente marcados con un fluorocromo en el extremo 5', denominado *quencher*, que bloquea la emisión de fluorescencia del fluorocromo del extremo 3'. Cuando la polimerasa se encuentra con la sonda, la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5'-3', y provoca la separación del *quencher*, permitiendo la emisión de fluorescencia (Costa, 2004; Rodríguez-Lázaro y Hernández, 2013).

Según indican Rodríguez-Lázaro y Hernández (2013) la emisión de fluorescencia durante la qPCR se puede visualizar en una curva de amplificación. Esta curva presenta tres fases diferentes como se muestra en la Figura 4.

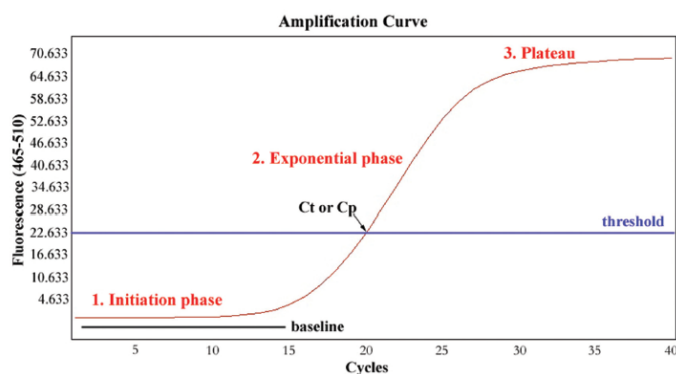


Figura 4. Fases de una curva de amplificación por PCR. Línea roja: curva de amplificación de una muestra positiva. Línea azul: umbral. Línea negra: ciclos basales (Rodríguez-Lázaro y Hernández, 2013).

La primera fase, de iniciación, ocurre durante los primeros ciclos de PCR en los que la fluorescencia emitida no se puede distinguir de la línea base, ya que no hay una cantidad suficiente de DNA replicado. En la segunda fase, exponencial o logarítmica, hay un aumento exponencial de la fluorescencia. La señal de fluorescencia comienza a incrementarse por encima del límite de detección, debido al aumento exponencial de la replicación del DNA. El ciclo en el que se produce se denomina *threshold cycle* (Ct). En la última fase, fase de meseta, los reactivos se agotan y no se observa aumento en la fluorescencia. La cuantificación solo es posible en la fase exponencial.

Tras estas etapas, comienza la *Melt curve*, donde se mide la cantidad de fluorescencia a medida que aumenta la temperatura. Como menciona Rodríguez-Lázaro y Hernández, (2013) en su estudio, las sondas fluorescentes se unen a la doble hebra de DNA, pero no a la monohebra. Con el aumento de la temperatura, el DNA se desnaturaliza, decreciendo con ello la fluorescencia. Estas curvas proporcionan la temperatura de *melting* (Tm), esta temperatura es aquella en la cual el 50% de las bases constitutivas no están unidas a sus bases complementarias de la hebra opuesta. Esta temperatura suele encontrarse entre 70-100 °C para la mayoría de los amplicones, dependiendo de la longitud y composición de las bases del DNA. Este parámetro es característico de cada fragmento de DNA y por lo tanto, nos permite comprobar, aunque no siempre, la especificidad de la qPCR (Costa, 2004).

Se han publicado estudios en los que se ha aplicado la técnica de qPCR para la detección de *C. tyrobutyricum* y de otros clostridios. López-Enríquez et al. (2007) desarrollaron una qPCR para la detección exclusiva de *C. tyrobutyricum* mediante la utilización de *primers* específicos del gen de la flagelina. Consiguieron cuantificar en 25 mL de leche cruda y UHT, menos de 25 esporos. Morandi et al. (2015) desarrollaron una qPCR para la detección simultánea de *C. tyrobutyricum*, *C. beijerinckii* y *C. sporogenes*, con límites de detección de 5, 2 y 300 UFC/50 mL de leche cruda, respectivamente.

1.4 Métodos preventivos de la hinchazón tardía

Teniendo en cuenta el origen de la contaminación de la leche con esporos butíricos, la primera medida de prevención es asegurar, a nivel de las explotaciones ganaderas, una buena calidad microbiológica de la leche, manteniendo unas estrictas condiciones de higiene para evitar la aparición del defecto de la hinchazón tardía (Villar y Fernández, 1995; Vissers et al., 2007). Estas medidas preventivas en la granja comprenden el empleo de ensilados de buena calidad, y la limpieza en los establos, equipos de ordeño y sala de ordeño, así como el tratamiento de las ubres antes del ordeño. Estas condiciones son difíciles de mantener en la práctica, debido al ritmo de trabajo de las explotaciones ganaderas (Van den Berg et al., 2004).

A nivel de la quesería también es posible aplicar medidas de prevención que impidan o dificulten la fermentación butírica. Una alternativa para asegurar la ausencia de clostridios butíricos es la eliminación de los esporos mediante técnicas no térmicas, ya que algunas técnicas térmicas como la pasteurización, no son capaces de destruir los esporos bacterianos (De Jong, 2008). Por otra parte, la utilización de tratamientos de esterilización, que sí destruyen la mayoría de los esporos, no son aplicables a leches destinadas a la fabricación de queso, ya que las altas temperaturas tienen un efecto negativo sobre la capacidad de coagulación de las caseínas (Skeie, 2010). Entre las técnicas que aseguran una eliminación de alrededor del 90% de los esporos, se encuentran la bactofugación, la microfiltración y el desnatado estático (Villar y Fernández, 1995).

La bactofugación es el método más utilizado para la eliminación de los esporos de la leche. Se basa en centrifugar la leche alrededor de 10.000 x g y debido a la diferencia de densidad entre la leche y los esporos, estos últimos se pueden eliminar ya que quedan sedimentados (Brändle et al., 2016). Para mejorar la eficacia de la centrifugación, se recomienda calentar la leche a una temperatura superior a 60 °C. En las mejores condiciones, se puede llegar a conseguir una eliminación del 90-95% de los esporos, lo que no asegura la ausencia de fermentación butírica (Villar y Fernández, 1995).

La microfiltración consiste en filtrar la leche aplicando alta presión, a través de una membrana cerámica con un tamaño de poro de 1,4 µm de diámetro. En la membrana se quedan retenidos al menos el 99,5% de los esporos y bacterias presentes (Villar y Fernández, 1995). El inconveniente de este método es que no solo se limita a la eliminación de esporos de la leche desnatada, ya que en el filtro no solo quedan retenidas las bacterias y los esporos,

sino también los glóbulos de grasa al tener un mayor tamaño (Ávila et al., 2014; Brändle et al., 2016).

El desnatado estático es un simple proceso de desnatado, en el que se obtienen dos fracciones, una fracción no grasa y una fracción grasa, donde se localizan los esporos. Esta última fracción una vez separada, se puede someter a un tratamiento de bactofugación o tratamiento térmico UHT para la eliminación de los esporos y posteriormente, adicionar al resto de la leche para su estandarización. La eliminación de los esporos en este proceso no es del 100%, por lo que si la contaminación es elevada, solo debe utilizarse como una técnica complementaria (Villar y Fernández, 1995).

En los últimos años, se ha comenzado a estudiar la utilización de las presiones hidrostáticas en los quesos para inhibir los esporos butíricos. En el estudio realizado por Ávila et al. (2016) se demostró que los quesos tratados con una presión de ≥ 300 MPa durante el proceso de maduración, 7 días después de la fabricación, no mostraron síntomas de hinchazón tardía. Esto se debió a que los tratamientos de altas presiones, por encima de 300 MPa, fueron capaces de inactivar las células vegetativas de *C. tyrobutyricum* germinadas, que llevan a cabo la fermentación butírica, pero apenas redujeron el número de esporos.

Estos métodos son costosos desde el punto de vista económico, modifican la composición de la leche y la reducción de esporos logrados puede no ser suficiente para prevenir la hinchazón tardía en el queso. Por consiguiente, los fabricantes de queso prefieren la adición de sustancias inhibidoras de la germinación de los esporos y el crecimiento de células vegetativas de clostridios butíricos. Estas sustancias son fáciles de usar, no requieren equipos específicos y son procedimientos menos costosos (Ávila et al., 2014). Entre estas sustancias inhibidoras podemos encontrar los nitratos, lisozima, nisina, reuterina y polifosfatos, siendo los más empleados los nitratos, la lisozima y la nisina (Loessner et al., 1997; Ávila et al., 2014; Brändle et al., 2016). Sin embargo, el tipo de aditivos y la concentración máxima en la que se pueden añadir a la leche y al queso, están regulados por la legislación europea (Reglamento (UE) nº 1129/2011).

La adición de nitratos (E251-E252) a la leche es la medida de protección más común frente a la hinchazón tardía. Durante la maduración, las bacterias nitrato reductasa (bacterias coliformes, lactobacilos y microbiota de superficie) y la enzima xantina oxidasa, que se encuentra en la membrana del glóbulo graso, reducen el nitrato a nitrito, considerado inhibidor de la germinación de esporos (Ávila et al., 2014). Una desventaja importante es el efecto inhibidor del nitrito sobre el crecimiento de las bacterias productoras de ácido

propiónico, que en la maduración del queso Emmental son las responsables de la formación de sus ojos característicos. Otra desventaja es la reacción entre el nitrito y los aminoácidos aromáticos del queso, formando nitrosaminas, que pueden tener una actividad procancerígena (EFSA, 2010). Por ello, en Europa están prohibidos niveles de nitratos superiores a 150 mg/Kg en la leche de quesería (Reglamento (UE) nº 1129/2011).

La lisozima (E1105), que se obtiene de la clara de huevo, es una enzima que hidroliza los enlaces glucosídicos β 1-4 de los polisacáridos de la pared celular bacteriana, causando su lisis. La legislación europea no recoge una concentración máxima establecida en queso madurado, *quantum satis*, pero generalmente se agrega a la leche en una concentración de 500 unidades/mL (Van den Berg et al., 2004). La adición de lisozima es un método más caro que la bactofugación y menos efectivo que los nitratos. Sin embargo, si solo hay un número bajo de esporos, < 500 esporos/L, su adición puede ser adecuada para el control de la hinchazón tardía. En cambio, si el número de esporos es mayor, su aplicación no se recomienda por dos razones: primero, la susceptibilidad de los esporos por la lisozima varía, incluso llegando en algunos casos a activar el proceso de germinación del *C. tyrobutyricum* (Bassi et al., 2009). En segundo lugar, una dosis elevada puede inhibir la fermentación deseable de ácido láctico y propiónico en el queso (Brändle et al., 2016). Otro aspecto que se debe considerar es su alergenicidad, ya que, como se ha mencionado anteriormente, es una enzima que proviene de la clara de huevo. Sin embargo, el alcance de su alergenicidad cuando está presente en el queso madurado todavía no está claro (Ávila et al., 2014; Brändle et al., 2016).

Otro método de prevención de la hinchazón tardía es el uso de sustancias antimicrobianas como son las bacteriocinas. Hasta el momento, la nisina (E234) es la única bacteriocina aprobada para la elaboración de alimentos. Es producida de forma natural por *Lactococcus lactis*. Actúa formando poros en la membrana de las células vegetativas e inhibe el aumento de tamaño de los esporos en la última fase de la germinación. La concentración máxima permitida en quesos curados es de 12,5 mg/Kg (Reglamento (UE) nº 1129/2011). En la actualidad, se están investigando otras bacterias productoras de bacteriocinas que eviten el deterioro de la hinchazón tardía, como es el caso del *Lactobacillus reuteri* (Ávila et al., 2014). Sin embargo, hacen falta más estudios para la incorporación de otras bacteriocinas en la prevención de la hinchazón tardía del queso, ya que además de inhibir a las bacterias alterantes, pueden llegar a inhibir a las bacterias que son esenciales en la producción del queso (Brändle et al., 2016).

1.5 Bioseparación magnética

En los últimos años, el interés por la bioseparación magnética, se ha incrementado notablemente, debido a sus múltiples aplicaciones, entre ellas aplicaciones biomédicas, como la obtención de imágenes por resonancia magnética, administración de fármacos o incluso tratamientos contra el cáncer (De et al., 2008; Fang y Zhang, 2009).

La bioseparación magnética es una técnica relativamente nueva, se define como un proceso de separación basado en la interacción entre estructuras superficiales de las células diana y sus ligandos específicos unidos a nano y micropartículas magnéticas (MPs, del nombre en inglés). De todas las MPs, las que poseen un núcleo de magnetita (Fe_3O_4) o maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) son las más ampliamente estudiadas, ya que son fáciles de sintetizar y de cubrir con otras moléculas (Boyer, et al., 2010; Whiley et al., 2013).

La bioseparación magnética también se ha utilizado con éxito en la detección de bacterias patógenas. Como es el caso del estudio realizado por Xue, et al. (2018), en el que desarrollaron un biosensor fluorescente capaz de detectar y cuantificar *Escherichia coli* O157:H7, previamente separada de la leche, mediante la utilización de MPs recubiertas con puntos cuánticos (QDs, del nombre en inglés). Otro estudio que utilizó una técnica similar, fue el descrito por Ren et al. (2019), en el que lograron detectar y cuantificar *Salmonella typhimurium* en muestras de leche, mediante la utilización de MPs recubiertas por un aptámero y ssDNA, complementario al aptámero, marcado con QDs.

Las MPs se pueden sintetizar por diferentes métodos, como la descomposición térmica, microemulsión, síntesis hidrotermal, pero el más fácil y eficiente es la coprecipitación. Este método consiste en la reacción entre los iones férricos y ferrosos en condiciones básicas y anaerobias. A pesar de todos los métodos desarrollados para la síntesis de MPs, estas presentan algunos problemas en su utilización, relacionados con su estabilidad y dispersabilidad (Laurent et al., 2008).

Como se ha mencionado anteriormente, las MPs se pueden cubrir con otras moléculas, los principales materiales para el recubrimiento del núcleo de las MPs son polímeros, como la sílica y el polietilenglicol (Masserini, 2013). Estos recubrimientos son esenciales, ya que evitan aglomeraciones entre las MPs y actúan como barrera frente a los ataques de especies químicas. Además, se pueden unir grupos específicos por las moléculas diana, como ligandos, fluoróforos, radionucleidos, genes y fármacos, en un proceso que se denomina funcionalización (Fang y Zhang, 2009).

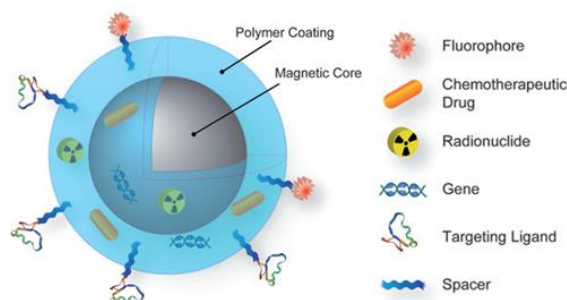


Figura 5. Representación gráfica de la estructura de una MP con un núcleo magnético, un recubrimiento polimérico modificado con ligandos, fluoróforos, radionucleidos, genes, fármacos y espaciadores (Fang y Zhang, 2009).

En la actualidad, el proceso de separación mediante el uso de MPs se puede realizar mediante dos tipos de bioseparación magnética. Por una parte, en la bioseparación magnética positiva, los componentes que se quieren aislar se unen directamente a las MPs. Por otro lado, en la bioseparación magnética negativa, los componentes de la mezcla que se quieren eliminar, se unen a las MPs, quedando sin unir los componentes de interés. Este último método, no es idóneo para su utilización en alimentos, debido a la complejidad de la matriz, por ello, se opta por la utilización de la bioseparación magnética positiva (Masserini, 2013; Safarík y Safaríková, 1999).

Según el estudio de Safarík y Safaríková (1999), la bioseparación magnética positiva consta de tres etapas. En la primera, se añaden las partículas magnéticas a la solución donde se encuentran las partículas de interés que se quiere aislar. Se incuba la solución durante un tiempo, con el fin de que se formen los complejos moléculas diana-MPs. Posteriormente, se separan mediante la aplicación de un campo magnético, quedando en el sobrenadante, el cual se retira, las moléculas que no se han unido. En la segunda etapa, se realizan varios lavados de los complejos moléculas diana-MPs, con el fin de eliminar los restos de componentes que no se han unido específicamente. Por último, las MPs se podrían destinar a otros procesos de análisis, como pueden ser la PCR o la citometría de flujo.

2. OBJETIVOS

En este estudio se pretende sentar las bases para el desarrollo de un método rápido para detectar y cuantificar los esporos butíricos, basado en PCR a tiempo real. Para ello, se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

1. Optimización de la detección de *Clostridium tyrobutyricum* por qPCR utilizando los *primers CTfla*.
2. Evaluación de la aplicación de los *primers CTfla* para otras especies de clostridios butíricos.

3. Análisis por qPCR y cultivo microbiológico de muestras de leche de vaca proporcionadas por la Asociación Interprofesional Lechera de Aragón (AILA).
4. Evaluación de la posible aplicación de micropartículas funcionalizadas con un ligando peptídico afín por los esporos para su bioseparación en leche.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cultivo y esporulación de clostridios butíricos

3.1.1 Cultivo de células vegetativas

Las células vegetativas utilizadas en este estudio se obtuvieron del cultivo de las siguientes especies de clostridios butíricos: *Clostridium tyrobutyricum* CECT 4012, *C. butyricum* CECT 361T y *C. beijerinckii* CECT 508 (Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, España). Los viales suministrados se procesaron según las indicaciones del laboratorio y a partir del cultivo obtenido se congelaron alícuotas en crioviales que se mantuvieron a -20°C. El cultivo se realizó en campana de flujo laminar PV-30/70 (Telstar Industrial, Terrasa, España) inoculando una bolita con suspensión bacteriana de los crioviales, en 9 mL de caldo de cultivo RCM (*Reinforced Clostridial Medium*) (Scharlab, Sentmenat, España). Se añadió una capa de 1 cm de espesor de parafina (Panreac, Barcelona, España) por encima del medio con la suspensión bacteriana para generar anaerobiosis. El cultivo se mantuvo en una estufa bacteriológica Incubat (Selecta, Barcelona, España) a 37 °C durante 24 h para *C. tyrobutyricum* y *C. beijerinckii*, y 48 h para *C. butyricum*, hasta observar la aparición de turbidez y formación de gas, que en algunos casos produjo el desplazamiento de la parafina hacia la parte superior del tubo. También se observó el olor característico a ácido butírico producido por los clostridios butíricos, e indicativo de que la bacteria se encontraba en la fase exponencial de crecimiento (Cremonesi et al., 2012).

3.1.2 Métodos de esporulación

A partir del cultivo en suspensión anteriormente descrito se utilizaron dos métodos diferentes para producir esporos butíricos, uno mediante cultivo en medio líquido y otro mediante cultivo en agar.

3.1.2.1 Esporulación en medio líquido

Este procedimiento se basó en el protocolo descrito por Schneider et al. (1963) y modificado por Lavilla et al. (2008). Según este método, se induce el proceso de esporulación

mediante el cultivo de una suspensión de células vegetativas en el interior de una membrana de diálisis inmersa en medio de cultivo líquido.

Se tomó 1 mL de un precultivo de 24-48 horas y se inoculó en 50 mL de caldo RCM con una capa de parafina líquida, para generar anaerobiosis. El cultivo se incubó en las mismas condiciones citadas anteriormente hasta que se observó producción de gas. Posteriormente, se añadieron 25 ml de esta suspensión en el sistema de esporulación, que consistía en una membrana de diálisis de celulosa introducida en un tubo de vidrio conteniendo caldo extracto de glucosa triptona (TGE) suplementado con extracto de levadura, de la manera descrita por Lavilla et al. (2008).

Por último, el precipitado de esporos obtenido después del proceso de esporulación se lavó tres veces con tampón fosfato salino (PBS), compuesto por KH_2PO_4 1 mM, Na_2HPO_4 8 mM, NaCl 14 mM, KCl 2 mM, pH 7,4, y se resuspendió en 100 mL de agua destilada estéril.

3.1.2.2 Esporulación en medio sólido

Para realizar la esporulación en placa se sembraron 100 μL de precultivo con asa de Digrafsky en placas de Agar RCM. Las placas se incubaron en jarras de anaerobiosis Gaspak™ (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) con el generador de gas anaerobio AnaeroGen™ 2,5 L y un indicador de anaerobiosis (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) a 37 °C durante 7 días en estufa bacteriológica. Tras el cultivo, se añadieron 2-3 mL de PBS estéril en la superficie del agar para recoger los esporos con un asa de Digrafsky en recipientes estériles. La suspensión obtenida se centrifugó a 4 °C durante 15 min a 4.000 x g y se resuspendió en 100 mL de agua destilada estéril.

3.1.2.3 Obtención de los esporos

Para liberar los esporos de las células vegetativas en las suspensiones obtenidas por los dos métodos, es necesario realizar una etapa de lisis mediante la utilización de lisozima (0,45 mg/mL) (Sigma-Aldrich, Madrid, España). La suspensión se incubó con el enzima a 45 °C durante 24 h. A continuación, se centrifugó a 4 °C durante 15 min a 4.000 x g, se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado dos veces con agua destilada estéril con el fin de eliminar los restos de lisozima. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 2 ml de agua destilada.

Para separar los restos celulares de los esporos se realizó un gradiente de densidad mediante Percoll® (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Para ello se prepararon diferentes soluciones de Percoll® a partir de una solución pura de 1,13 g/mL con agua destilada estéril

(1,10, 1,09, 1,07, 1,05 g/mL), obteniendo la proporción de cada dilución mediante la siguiente fórmula:

$$V_0 = V(p_0 - 1 \cdot p_{10} - 0,9) / (p_0 - 1) \text{ [ml]}$$

V_0 = Volumen de Percoll® puro

V = Volumen de solución que se va a preparar

p = densidad que se quiere preparar

p_{10} = densidad del agua

p_0 = densidad del Percoll® puro (1,13 g/ml) a 20 °C

Para formar el gradiente de Percoll® se añadieron en primer lugar, 8 mL de Percoll® puro en un tubo de 50 mL, y a continuación las diferentes soluciones, de la más densa a la menos densa, con gran cuidado para no mezclar las capas. Por último, se añadieron los 2 mL de la suspensión bacteriana tratada con lisozima y el gradiente se centrifugó a 4.000 x g durante 45 min a 4 °C, sedimentando los esporos en el fondo del tubo y distribuyéndose los restos celulares por las capas superiores del gradiente. Se eliminó con cuidado el sobrenadante y el precipitado con los esporos se lavó cinco veces con agua destilada estéril mediante centrifugaciones de 10 min a 13.000 x g. Posteriormente, los esporos se resuspendieron en 200 µL de PBS estéril y se determinó su concentración mediante una cámara de Thoma y un microscopio de contraste de fase ECLIPSE E400 (Nikon, Tokio, Japón). Los esporos se conservaron a -20 °C hasta su uso posterior.

3.2 Extracción de DNA y PCR a tiempo real (qPCR)

3.2.1 Extracción de DNA de células vegetativas

La extracción de DNA de las células vegetativas de las diferentes especies de clostridios utilizados en este trabajo se llevó a cabo mediante el kit GenElute™ Bacterial Genomic DNA (Sigma-Aldrich, Madrid, España) siguiendo el protocolo específico para Gram positivos.

En primer lugar, se tomaron 1,5 mL del correspondiente cultivo en fase estacionaria, y se centrifugaron en una microcentrífuga Biofuge Pico (Heraeus, Hanau, Alemania) durante 2 min a 13.000 x g y se desechó el sobrenadante. A continuación, para romper las células se añadieron 200 µL de lisozima (0,45 mg/mL) al precipitado y la mezcla se incubó en baño termostático (Selecta, Barcelona, España) a 37 °C durante 30 min.

Pasado el tiempo de incubación, para homogeneizar y lisar la muestra, se adicionaron 20 µL de proteinasa K (20 mg/mL) con el fin de digerir las proteínas presentes. Tras la

incubación con proteinasa K, se continuó el protocolo según las especificaciones del fabricante. Finalmente, la solución de DNA extraído se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.2 Extracción de DNA de esporos butíricos presentes en PBS y leche

3.2.2.1 Tratamiento de los esporos en PBS

Las muestras analizadas fueron muestras de PBS contaminadas artificialmente con esporos butíricos de *C. tyrobutyricum* añadidos a diferentes concentraciones: 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 y 10^7 esporos totales.

Para la extracción del DNA de los esporos butíricos se empleó una modificación del tratamiento mediante microondas descrito por Herman et al. (1995). Para ello, se introdujeron los 100 μL de la suspensión anterior en tubos Eppendorf[®] Safe-lock (Sigma-Aldrich, Madrid, España), que se colocaron en una vaporera con 300 mL de agua destilada y se trataron durante 15 min a 600 W en un microondas GE 87M-X (Samsung, Barcelona, España).

Después de la ruptura de los esporos butíricos, se procedió a la extracción y purificación del DNA de la muestra mediante una modificación del protocolo GenElute[™] Bacterial Genomic DNA utilizado para las células vegetativas, como se describe en el apartado 3.2.1. La modificación del protocolo consistió en que no se realizó el tratamiento previo con lisozima ni proteinasa K, con el fin de realizar la ruptura únicamente mediante microondas. El protocolo se continuó según las especificaciones del kit, a partir de la adición de etanol al lisado. Posteriormente, el DNA extraído se resuspendió en 100 μL de tampón de elución y se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su precipitación.

Para concentrar el DNA genómico obtenido de los esporos tras la purificación mediante el kit, se realizó una precipitación con acetato de sodio, etanol y glicógeno (Orfao y Morent, 2011). Partiendo del DNA genómico extraído, se añadieron 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M, pH 5,2; 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de glicógeno UltraPure[™] (Thermo Fisher, Madrid, España) y 2,5 volúmenes de etanol al 96%. La mezcla se incubó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora. Pasado el tiempo de incubación, la mezcla se centrifugó a 13.000 x g durante 15 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante con mucho cuidado y se realizó un lavado del precipitado de DNA con 200 μL de etanol al 70% a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para eliminar los posibles restos de sales. El precipitado obtenido se recogió mediante centrifugación en las mismas condiciones que en la precipitación anterior. Se descartó el sobrenadante con mucho cuidado y se eliminaron las trazas de etanol por evaporación durante 5-10 min en una estufa a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Finalmente, el DNA precipitado se resuspendió en 20 μL de agua libre de DNAsas/RNAsas (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Una vez extraído el DNA, se analizó por espectrofotometría con el equipo NanoDrop (Thermo Fisher, Wilmington, EE.UU.). Se midió a una longitud de onda de 230 nm para determinar contaminación por alcoholes, a 260 nm, para determinar la cantidad de DNA extraído y a 280 nm para medir la cantidad de proteína. La pureza del DNA se determinó mediante el cociente A_{260}/A_{280} , obteniendo valores de entre 1,6 y 1,9, y la contaminación con alcoholes por el cociente A_{260}/A_{230} , obteniendo valores de entre 1,8 y 2,2.

3.2.2.2 Tratamiento de las muestras de leche contaminada con esporos

Las muestras analizadas fueron de dos tipos distintos:

- Muestras de leche entera de vaca comercial UHT completa, con un contenido de 3,6 % de grasa y 3 % de proteína (marca Aliada), contaminadas artificialmente con esporos butíricos de las tres especies estudiadas (*C. tyrobutyricum*, *C. butyricum* y *C. beijerinckii*) añadidos a diferentes concentraciones: 10^1 , 10^3 , 10^5 y 10^7 esporos totales.

- Muestras de leche cruda de vaca procedentes de la Asociación Interprofesional Lechera de Aragón, AILA (Movera, España), sospechosas de estar contaminadas con clostridios butíricos. El código que se le asignó a las diferentes muestras fue la letra A (de Aragón), seguida de la fecha en la que se analizaron en AILA (año/mes/día) y finalmente, un número asignado del uno hasta el número total de muestras de cada lote. Previamente, las muestras se trataron en un baño termostático a 90 °C durante 10 min, para eliminar las células vegetativas presentes.

El volumen utilizado de cada muestra fue de 0,5 mL, si bien se realizaron algunos ensayos con un volumen mayor de leche, de 18 mL. En el caso de las muestras de leche entera comercial UHT contaminadas de manera artificial con esporos butíricos, tras la adición de los esporos a la leche, se procedió a una agitación continua a temperatura ambiente durante 30 min en un rotatubos Movil-Rod (Selecta, Barcelona, España).

Para la digestión de la leche y la recuperación de los esporos, se añadió a las muestras una solución de subtilisina en una proporción 1:1 (v/v). La subtilisina añadida se diluyó previamente con un tampón específico en una proporción 1:28 (v/v), ambos reactivos fueron amablemente cedidos por el laboratorio de AILA. La enzima subtilisina procedente de la bacteria *Bacillus subtilis* y el tampón para su disolución, que contiene un detergente, es utilizado para el tratamiento de las muestras de leche para el recuento rutinario de bacterias

totales en el equipo Bactoscan (Foss Electric, Hillerød, Dinamarca), que se encuentra en el laboratorio interprofesional del AILA.

La mezcla se incubó en un baño termostático a 60 °C durante 1 hora, temperatura óptima para la actividad del enzima (Fullana, 2014). A continuación, la mezcla se centrifugó durante 30 min a 13.000 x g, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado con 100 µL de PBS estéril. A partir de este paso, el proceso de extracción de DNA de esporos butíricos en leche fue similar al realizado en PBS, descrito en el apartado 3.2.2.1.

3.2.2.3 Condiciones de la PCR a tiempo real (qPCR)

La PCR a tiempo real se llevó a cabo en placas de 48 pocillos MicroAmp™ Fast Optical de Applied Biosystems (Thermo Fisher, Madrid, España). La mezcla de reacción para cada muestra contenía 12,5 µL de Master Mix SYBR® Green PowerUp de Applied Biosystems (Thermo Fisher, Madrid, España), 7,5 µL de agua libre de DNasa/RNasa (9,5 µL en el caso de los blancos) y 1,5 µL de cada *primer*, CT*fla* F (*forward*) 750 nM y CT*fla* R (*reverse*) 750 nM (Thermo Fisher, Madrid, España).

Los *primers* empleados fueron los CT*fla*, que corresponden al gen de la flagelina de *C. tyrobutyricum* descrito por López-Enríquez et al. (2007). La secuencia de los *primers* se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencia de *primers* específica para *C. tyrobutyricum*. F: Forward; R: Reverse.

<i>Primers</i>	Secuencia (5'-3')
CT <i>fla</i> F	CAGTTACAATTACGAGAACACATGGA
CT <i>fla</i> R	TGTACCACCAACTAAAGCAACATCA

Tras la adición de los *primers*, se añadieron 2 µL de ADN por pocillo, excepto en el blanco, siendo el volumen total de 25 µL. La placa se centrifugó en una centrífuga Jouan (Izasa, Barcelona, España) con un adaptador de placas, durante 1 min a 2.000 x g. Finalmente, la qPCR se realizó en el termociclador StepOne™ de Applied Biosystems (Life Technologies, Paisley, Reino Unido), con capacidad de análisis para 48 muestras. Cada muestra fue amplificada por duplicado, se incluyó un control positivo de células vegetativas y un control negativo, *no template control* (NTC), donde el DNA se sustituyó por H₂O libre de DNasas/RNasas.

El programa de amplificación que se llevó a cabo fue el siguiente: una fase inicial a 50 °C durante 2 min, en la que se activa la uracil-DNA-glicosilasa (UNG) que se encuentra en la Master Mix SYBR® Green PowerUp, que evita las contaminaciones del DNA, destruyendo

así copias de DNA que hayan podido contaminar las muestras durante el proceso (Müller-Esterl y Brandt, 2008). Después, se realizó una etapa de desnaturalización inicial y 50 ciclos de amplificación, que incluían las etapas de desnaturalización, hibridación y extensión, cuyas condiciones se encuentran descritas en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de qPCR para el sistema CT fla .

Sistema	Nº de ciclos	Desnaturalización		Hibridación		Polimerización	
		T (°C)	Tiempo	T (°C)	Tiempo	T (°C)	Tiempo
CT fla	1	95,0	10 min	—	—	—	—
	50	95,0	15 s	60,0	15 s	60,0	1 min

Como resultado de la amplificación, se obtiene el valor del ciclo umbral o *threshold cycle* (Ct), el cual es inversamente proporcional al número de copias de DNA, a mayor concentración de DNA, menor Ct.

Una vez pasados los 50 ciclos de amplificación, comenzó la fase de *Melt curve*. Esta curva proporciona la temperatura de *melting* (T_m), en la cual el 50% de las moléculas de DNA están desnaturalizadas. Este dato nos permite distinguir si el DNA amplificado corresponde al fragmento de interés o si se han formado dímeros o hay contaminaciones.

3.2.2.4 Visualización de los productos de qPCR en gel de agarosa

Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Se utilizó agarosa al 1,5%, diluida en tampón TAE 1X, Tris-acetato 40 mM (pH 8.0), EDTA 1 mM (Conda Lab., Madrid, España), teñido con SYBR® *Safe* 1X (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Como marcador de pesos moleculares se utilizó PCR 100 pb DNA Low Ladder (Sigma-Aldrich, Madrid, España) 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. Las muestras se prepararon como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Preparación de las muestras para la electroforesis en agarosa.

Sistema	DNA	Tampón de carga	PCR ladder	Agua libre de DNAsas
PCR Ladder	—	2 µL	5 µL	5 µL
Muestra DNA	8 µL	2 µL	—	—

El gel se colocó en la cubeta de electroforesis y se sometió a un voltaje de 90 V durante 40 min. La visualización de las bandas de DNA se realizó en un transiluminador UV (UVP BioDoc-It system, CA, EE.UU).

3.3 Identificación de esporos butíricos mediante cultivo microbiológico

La identificación de los esporos butíricos se realizó mediante cultivo en Agar RCM con Rojo neutro y D-cicloserina. Previamente, se realizó un pre-enriquecimiento de las muestras de leches sospechosas de estar contaminadas, suministradas por el laboratorio de AILA. Para ello se cultivaron 500 µL de leche tratada térmicamente a 90 °C durante 10 minutos en 10 mL de caldo RCM sobre el que se añadió parafina de 1 cm de espesor para generar anaerobiosis. El cultivo se mantuvo en estufa bacteriológica a 37 °C durante 24–48 h, hasta observar la aparición de turbidez y formación de gas.

Basándonos en el estudio realizado por Jonsson (2010), se sembraron 100 µL del cultivo pre-enriquecido en Agar RCM mediante siembra en superficie con asa de Digralesky y por agotamiento. El medio estaba suplementado con Rojo Neutro (Sigma-Aldrich, Madrid, España) a una concentración de 50 µg/mL y D-cicloserina (Thermo Fisher, Madrid, España) a una concentración de 200 µg/mL. El Rojo Neutro es un indicador fluorescente que vira a amarillo con la producción de ácido (Kaufman y Weaver, 1960) y la D-cicloserina se utiliza para reducir el crecimiento de las bacterias anaerobias facultativas que pueden estar presentes en la leche como *Bacillus* spp., pero no afecta a *C. tyrobutyricum* (Abgrall, Bourgeois y Bourva, 1985). Las soluciones de Rojo Neutro y D-cicloserina fueron esterilizadas previamente mediante filtros de 0,22 µm (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Las muestras se incubaron en jarras de anaerobiosis a 37 °C durante 5 días en estufa bacteriológica.

3.4 Bioseparación magnética de esporos butíricos en leche UHT

La bioseparación magnética de esporos consistió en la incubación de micropartículas magnéticas (MMPs) con muestras contaminadas con esporos en leche entera UHT, para la concentración de estos últimos. Las muestras de leche se contaminaron con 10^3 y 10^5 esporos totales, para cada una de las micropartículas utilizadas.

Las MMPs se encuentran funcionalizadas con un péptido, denominado pCZS1, que consta de 18 aminoácidos y tiene unas características similares al péptido descrito por Lavilla et al. (2009). Este péptido, tiene capacidad para reconocer y unirse a la superficie de los esporos butíricos, pero no de las células vegetativas. Las MMPs utilizadas en este estudio fueron: micropartículas magnéticas BcMag™ long-arm Thiol-activated (Ref. MNP-T-PEP) y micropartículas magnéticas - BcMag™ long-arm Iodoacetyl-activated (Ref. MNP-I-PEP) (Bioclone Inc., San Diego, CA, EE.UU.) funcionalizadas por Nanoimmunotech (Zaragoza, España). Ambas MMPs con un tamaño de partícula de 1 µm de diámetro y una concentración

de 2×10^9 partículas/mL en PBS con azida de sodio al 0.05%. Las MMPs de tiol presentan $1,5 \times 10^{15}$ moléculas de péptido/mg MMP y las de yodo $2,8 \times 10^{15}$ moléculas de péptido/mg MMP.

En este procedimiento, las etapas de contaminación de leche UHT con los esporos butíricos y el tratamiento con subtilisina fueron similares a las que se describen en el apartado 3.2.2.2, salvo la resuspensión del precipitado final obtenido. En este caso, se llevó a cabo con 100 μ L de acetato de sodio 0,5 M, pH 3,6, en vez de PBS, para neutralizar la suspensión, dado que se había comprobado que el pH básico del tampón de la subtilisina impedía la unión del esporo al péptido pCZS1.

La bioseparación con las MMPs, se llevó a cabo mediante la adición de 100 μ L de MMPs, conteniendo 2×10^8 partículas, en una relación 1:1 (v/v) a la suspensión de esporos en acetato de sodio. Posteriormente, las muestras se incubaron en agitación continua a 4 °C durante 2 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, los complejos de MMPs y esporos se separaron colocando las muestras en un separador magnético DynaMag™ 2 (Thermo Fisher, Madrid, España) durante 3-5 minutos para que se realizase la separación. Una vez transcurrido este tiempo, se recogió el sobrenadante y se llevó a un tubo nuevo, para evaluar la concentración de esporos libres. Los precipitados de MMPs y esporos se resuspendieron en 100 μ L de PBS estéril, para determinar la concentración de esporos unidos a las MMPs (Lavilla et al., 2012).

Las MMPs y el correspondiente sobrenadante, se sembraron separadamente en placas de Agar RCM, mediante siembra en superficie con asa de Digralsky, y se incubaron en jarras de anaerobiosis a 37 °C durante 24-48 horas. Pasado el tiempo de incubación, se realizó el recuento de colonias para establecer el porcentaje de recuperación de esporos por las MMPs a partir de los esporos libres en el sobrenadante (ns) y los esporos unidos a la suspensión de MMPs (nb).

$$R\% = \frac{nb}{ns + nb} \times 100$$

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se ha expuesto anteriormente, el principal causante del defecto de la hinchazón tardía en queso es *C. tyrobutyricum* y concretamente sus esporos, que no son inactivados durante el tratamiento térmico de la leche debido a su estructura más resistente, aunque las células vegetativas sí son inactivadas durante este tratamiento (Loessner et al., 1997).

Para la realización de este trabajo se han tenido en cuenta distintas metodologías, condiciones y resultados de estudios previos realizados por el grupo de investigación.

4.1 Optimización de la metodología

Para evaluar el método de detección de esporos de clostridios butíricos en leche mediante qPCR, primero se analizó la forma más eficaz de producción de esporos de clostridios butíricos. Se llevaron a cabo dos procedimientos, esporulación en medio de cultivo sólido y en medio líquido, comprobando cual era el método que más esporos producía. Asimismo, se comparó la efectividad de la ruptura y extracción del DNA de los esporos butíricos, en soluciones de PBS y leche UHT. El DNA se extrajo mediante microondas, kit de purificación GenElute™ Bacterial Genomic DNA para Gram positivos y una última etapa de concentración de DNA mediante precipitación con alcoholes. En el caso de las leches, se introdujo además una etapa de tratamiento con subtilisina para la digestión de las proteínas y la grasa, para facilitar la liberación de los esporos de estas fases.

En un estudio realizado previamente en el grupo de investigación (datos pendientes de publicación), se demostró que los esporos obtenidos mediante esporulación en medio sólido daban buen rendimiento, pero eran más difíciles de amplificar mediante qPCR que los esporos obtenidos en medio líquido. Esto puede ser debido a que los esporos obtenidos en medio sólido son más resistentes a la ruptura. Por ello, para la realización de este trabajo se eligieron los esporos producidos en medio líquido.

El siguiente paso fue evaluar si era necesaria una etapa previa a la qPCR para obtener DNA más concentrado, en la que se precipitase el DNA con etanol y acetato de sodio. Para ello, se contaminaron artificialmente soluciones de PBS con esporos de *C. tyrobutyricum* en concentraciones conocidas, de 10^1 a 10^7 esporos totales, y se realizó el protocolo de extracción de DNA basado en microondas. Para finalizar, las muestras se analizaron por la técnica de qPCR, utilizando los *primers* CT fla . Como se muestra en la Figura 6 se produjo amplificación mediante qPCR para todas las concentraciones de esporos, observándose linealidad en el rango de 10^4 - 10^7 esporos totales para las muestras obtenidas mediante precipitación del DNA y sin precipitación. En cambio, no se observó linealidad para las concentraciones de 10^2 - 10^4 esporos totales, siendo los valores de Ct más o menos constantes en ese intervalo, 36,39 en el caso de las muestras de DNA sin precipitación y 34,04 en el caso de las muestras con precipitación. A la concentración de 10^2 esporos totales, sin etapa de precipitación, se obtuvieron valores de Ct de 36,34, en cambio, con precipitación se obtuvieron valores de Ct más bajos, de 33,65. Si nos fijamos en la concentración de 10^1

esporos totales sin etapa de precipitación, se obtuvo un valor de Ct de 39,22, sin embargo, con etapa de precipitación se obtuvo un valor de 34,62. A la vista de estos resultados, se confirmó que a una misma concentración de esporos totales de *C. tyrobutyricum* en PBS, se detectaron antes los esporos para los que se aplicó la etapa de precipitación del DNA, que a los que no se aplicó. Por lo que, la etapa de precipitación se incorporó a la metodología de extracción de DNA de los esporos en todos los ensayos.

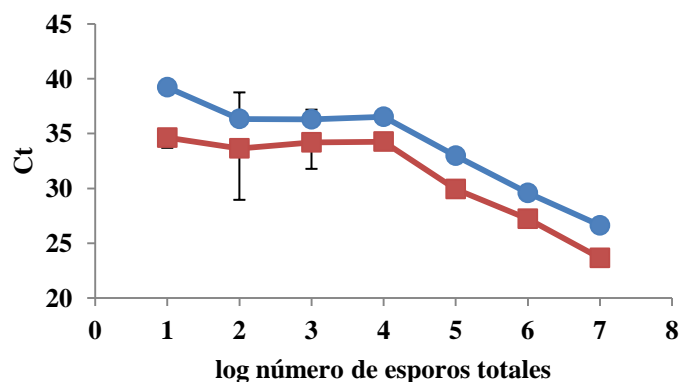


Figura 6. Gráfica de amplificación de esporos de *C. tyrobutyricum* en PBS obtenidos mediante esporulación en medio líquido. DNA sin precipitar (●) y DNA precipitado (■). Los valores representados corresponden con la media de duplicados de dos experimentos independientes (n=4). Las barras de error corresponden con las desviaciones estándar.

Una vez estudiada la detección de esporos de *C. tyrobutyricum* por qPCR en PBS se realizaron ensayos en leche entera UHT, con el fin de trabajar en las condiciones más cercanas a las reales, ya que los esporos deben detectarse en la leche cruda para evaluar su contaminación y el riesgo que conlleva su utilización en la fabricación del queso. La utilización de leche comercial UHT aseguraba que no hubiera ningún tipo de contaminación previa a la adición de los esporos que íbamos a realizar en nuestro estudio.

Al igual que se hizo con las soluciones de PBS, se contaminó leche entera UHT con esporos de *C. tyrobutyricum* en concentraciones conocidas: 10^1 , 10^3 , 10^5 y 10^7 esporos totales. Se utilizaron esporos procedentes de esporulación en medio sólido y en medio líquido. En la Figura 7 se representan los resultados de amplificación de los esporos obtenidos por los dos tipos de esporulación. Como se puede observar, a concentraciones de 10^3 , 10^5 y 10^7 esporos totales, producidos en medio líquido, se mantuvo la linealidad, a mayor concentración de esporos, menor valor de Ct ($34,82 \pm 2,72$; $31,51 \pm 0,97$; $27,04 \pm 3,01$, respectivamente). Sin embargo, a concentraciones menores no se mantuvo esta tendencia; cómo podemos observar en la gráfica, a concentraciones por debajo de 10^3 esporos totales, se alcanzaron valores de Ct de $34,06 \pm 1,77$ a la concentración de 10^1 esporos totales. Si observamos los resultados de los

esporos obtenidos en medio sólido, podemos ver que no se siguió una tendencia lineal, sino que la concentración de esporos se mantuvo más o menos constante, en torno a un valor medio de Ct de $31,32 \pm 1,18$.

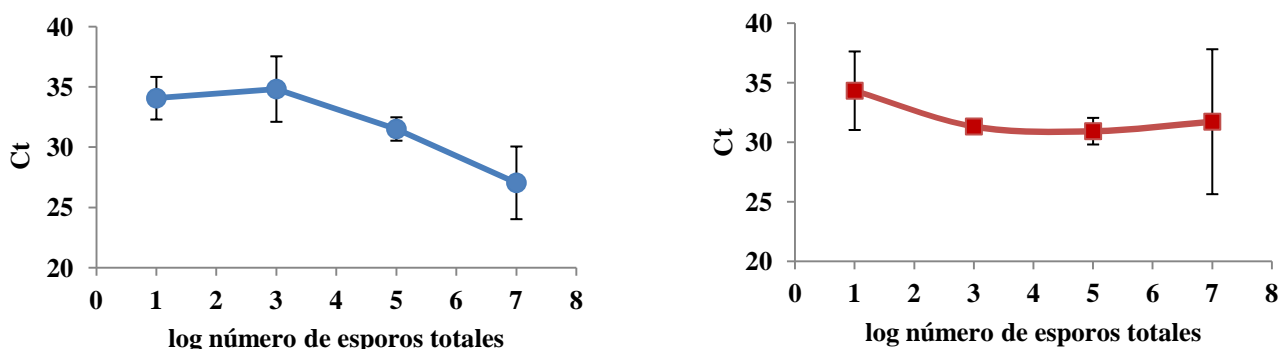


Figura 7. Gráfica de amplificación de esporos de *C. tyrobutyricum* en leche UHT. Esporos obtenidos en medio líquido (●). Esporos obtenidos en medio sólido (■). Los valores representados corresponden con la media de duplicados de dos experimentos independientes (n=4). Las barras de error corresponden con las desviaciones estándar.

Por todo lo mencionado anteriormente, se eligió la gráfica de amplificación de los esporos obtenidos en medio líquido, para calcular la recta de calibrado y poder cuantificar el DNA de las muestras suministradas como sospechosas de contener esporos de clostridios butíricos. La recta de calibrado se calculó a partir de los valores que se encontraban en la parte lineal de la gráfica, dando como resultado la siguiente ecuación:

$$Y = -1,94 X + 40,84; R^2 = 0,9927.$$

Los valores de Ct obtenidos para cada concentración de esporos, fueron superiores a los descritos por López-Enríquez et al. (2007). Esto es debido posiblemente a que se extrajo menor cantidad de DNA mediante el protocolo de extracción utilizado en nuestro estudio. Por otro lado, hay que señalar, que la pendiente de nuestra recta de calibrado, fue menor que la descrita por López-Enríquez et al. (2007), que se puede atribuir también a que su protocolo de extracción era más sensible, al tratarse de un procedimiento más complejo. Sin embargo, el inconveniente del método que se utiliza en su estudio frente al nuestro, es que sería difícilmente aplicable en un procedimiento rápido por el elevado número de etapas de las que consta. De igual manera, en el estudio de Bassi et al. (2013), desarrollaron un método cuantitativo mediante qPCR para detectar *C. tyrobutyricum*, utilizando *primers* específicos para el gen de la fosfoacetiltransferasa (*pta*). Los resultados mostraron un 100 % de eficiencia en el estudio. Sin embargo, cuando utilizaron los *primer* CT*fla* para analizar diferentes cepas de *C. tyrobutyricum*, aisladas de quesos afectados, aplicando el método de *bead beating* para la extracción del DNA, no consiguieron amplificar el fragmento del gen *fla*.

Como muestra la Figura 8, a partir de la curva de amplificación del DNA de cada muestra, se obtuvo el valor de Ct que se puede relacionar con la concentración de esporos. Esto quiere decir que a mayor valor de Ct, menor concentración de esporos totales. También se pudo observar que el DNA de las células vegetativas de *C. tyrobutyricum* dio un valor de Ct menor que el de los esporos a diferentes concentraciones. Este hecho puede explicarse, como se ha investigado previamente en el grupo de investigación, por una baja recuperación de DNA en la extracción de los esporos en comparación con las células vegetativas, debido a que los esporos están envueltos por una compleja pared (Setlow, 2006). Además, el DNA que se encuentra en el interior del núcleo, está altamente deshidratado y empaquetado. Esto es debido a una serie de proteínas específicas denominadas SASPs (*Small acid-soluble proteins*), que no se encuentran presentes en las células vegetativas y que protegen al DNA del espora (Wetzel y Fischer, 2015).

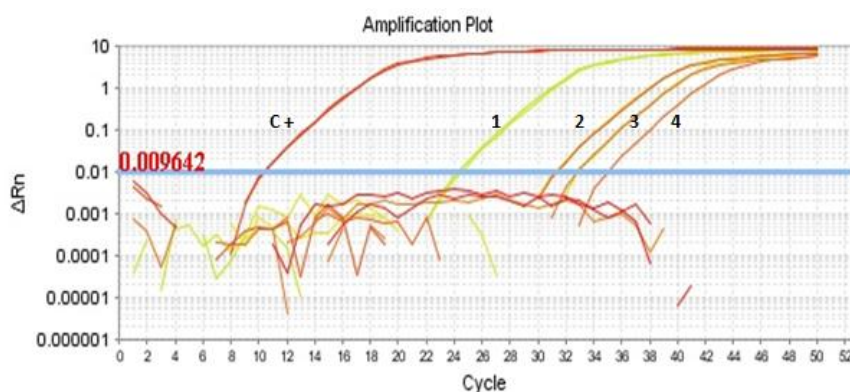


Figura 8. Gráfico de amplificación por qPCR de una calibración de diferentes cantidades de esporos de *C. tyrobutyricum* en leche UHT tratada con subtilisina. Las curvas corresponden a las amplificaciones de cada cantidad de esporos totales: (C+) Control + ; (1) 10^7 esporos; (2) 10^5 esporos; (3) 10^3 esporos; (4) 10^1 esporos. La línea azul corresponde con el *threshold cycle*. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

También se analizaron las *Melt curves* de cada una de las amplificaciones. En la Figura 9 se muestran las curvas obtenidas para el *C. tyrobutyricum* de la amplificación ilustrada en la Figura 8. En ella se puede ver que para todas las muestras se obtuvo un único pico con el mismo valor de T_m de 76,61, que coincide con el control positivo. Si hubiese aparecido una curva a una T_m menor, significaría que se han formado dímeros de *primers* (Costa, 2004). Además, se puede observar que la altura del pico varía dependiendo de la concentración de esporos totales de la muestra, correspondiendo el pico más bajo con la muestra con menor concentración de esporos, 10^1 esporos totales.

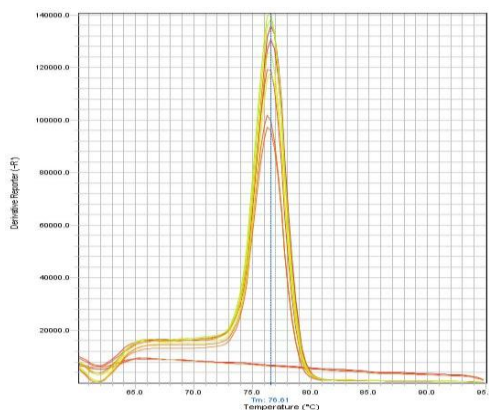


Figura 9. Melt curve de la qPCR obtenida de esporos de *C. tyrobutyricum*. Línea roja inferior: control negativo. Línea roja superior: control positivo/células vegetativas. Resto de líneas rojas y verdes: muestras con diferentes concentraciones 10^1 10^3 10^5 y 10^7 de esporos totales analizados en leche UHT.

Al igual que para los esporos de *C. tyrobutyricum*, se realizó el mismo ensayo para otras especies como *C. butyricum*, y *C. beijerinckii*, ya que hay estudios que confirman que se han aislado otras especies de clostridios en quesos afectados por la hinchazón tardía (Le Bourhis et al., 2007). Los resultados obtenidos no fueron concluyentes, ya que no se obtuvo una linealidad que reflejase una disminución de Ct a medida que aumentaba la concentración de esporos, además un número considerable de muestras no amplificaron. Tampoco se obtuvo resultado de amplificación para las células vegetativas de dichas especies, que hemos incluido en los ensayos de qPCR como control positivo de la reacción. Esto es debido a que los primers utilizados, descritos en el estudio de López-Enríquez et al. (2007), son específicos para la especie *C. tyrobutyricum* y no para otras especies de clostridios. Una alternativa interesante, sería la utilización de la técnica PCR Multiplex descrita por Cremonesi et al. (2012), con la que obtuvieron una detección rápida y sensible de cuatro especies diferentes de clostridios: *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *C. sporogenes* y *C. tyrobutyricum*.

4.2 Análisis de muestras de leche cruda de vaca

Se analizaron muestras de leche cruda de vaca procedentes de la Asociación Interprofesional Lechera de Aragón, AILA, que eran sospechosas de estar contaminadas con clostridios butíricos. En total se analizaron 52 muestras de leches, de las cuales, 37 eran leches conservadas en congelación, ya que se habían recogido y almacenado a -20 °C durante el año 2018, y 15 eran leches recogidas en el año 2019 y analizadas frescas.

Estas leches son sospechosas de poder estar contaminadas con esporos de clostridios butíricos, porque provienen de ganaderías que en algunas ocasiones han dado positivo en el análisis por la técnica del MPN realizada en el laboratorio interprofesional, según comunicación personal.

4.2.1 Identificación de esporos butíricos en leches sospechosas mediante cultivo microbiológico

En un principio, las leches tratadas térmicamente fueron cultivadas en medio Agar RCM suplementado con Rojo Neutro y D-cicloserina en anaerobiosis. Para confirmar que los resultados fuesen correctos, se incubaron en cada jarra de anaerobiosis dos controles: un control positivo con 10^7 esporos totales de *C. tyrobutyricum* y un control negativo, que no contenía bacterias.

Los resultados fueron negativos tanto para el control positivo, como para el control negativo y las muestras. Estos resultados, como se mencionó en el estudio de Reindl et al. (2014) son debidos posiblemente a una baja concentración de esporos en las leches sospechosas de contaminación, así como a la dificultad de los esporos para germinar en un medio sólido (agar) suplementado con antibióticos, en este caso D-cicloserina (Brändle et al., 2018). Por ello, como citó Reindl et al. (2014) en su investigación, para favorecer un crecimiento más eficiente a la hora de cultivar las muestras en un medio sólido, se recomienda realizar una etapa de pre-enriquecimiento de las muestras en medio líquido. Así, se incluyó una etapa previa, que consistió en cultivar las leches sospechosas en RCM líquido, para favorecer la germinación y el crecimiento de los esporos de los clostridios butíricos.

Una vez cultivadas las leches sospechosas en el medio RCM, dieron diferentes resultados en cuanto a la producción de turbidez y gas, como se recoge en los Anexos I y II. En relación con los resultados obtenidos en el pre-enriquecimiento, se ha de indicar que en las 52 muestras pre-enriquecidas se observó turbidez del medio. En 17 de ellas se observó producción de gas, provocando en 12 de ellas, la elevación de la parafina, causada por la gran cantidad de gas formado como se observa en la Figura 10, tal y como citó Reindl et al. (2014) en su estudio.

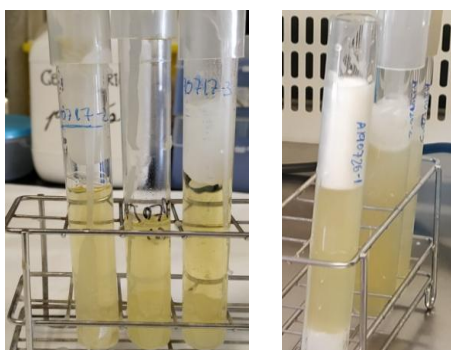


Figura 10. Muestras de leche pre-enriquecidas en medio RCM donde se observa la producción de gas y desplazamiento de la parafina.

Después de la etapa de pre-enriquecimiento, las leches se cultivaron en el medio Agar RCM suplementado con Rojo Neutro y D-cicloserina, obteniéndose los resultados recogidos en los Anexos I y II. Como mencionó Jonsson (1990) en su estudio, el Agar RCM es un medio para *Clostridium* con poca o ninguna selectividad. Con la suplementación de D-cicloserina, se consigue retrasar el crecimiento de *Bacillus* spp., y al suplementarlo con Rojo Neutro, se consigue distinguir las células vegetativas germinadas a partir de los esporos de clostridios, de otras bacterias esporuladas, en este caso de *Bacillus*. Así, las colonias del género *Clostridium* aparecen de color amarillo y las colonias del género *Bacillus* de color rojo en dicho medio. Esto se puede ver en algunos ejemplos recogidos en la Figura 11. En las imágenes 2 y 3, se observa un color amarillo característico de las colonias del género *Clostridium*, entre ellas el control positivo.

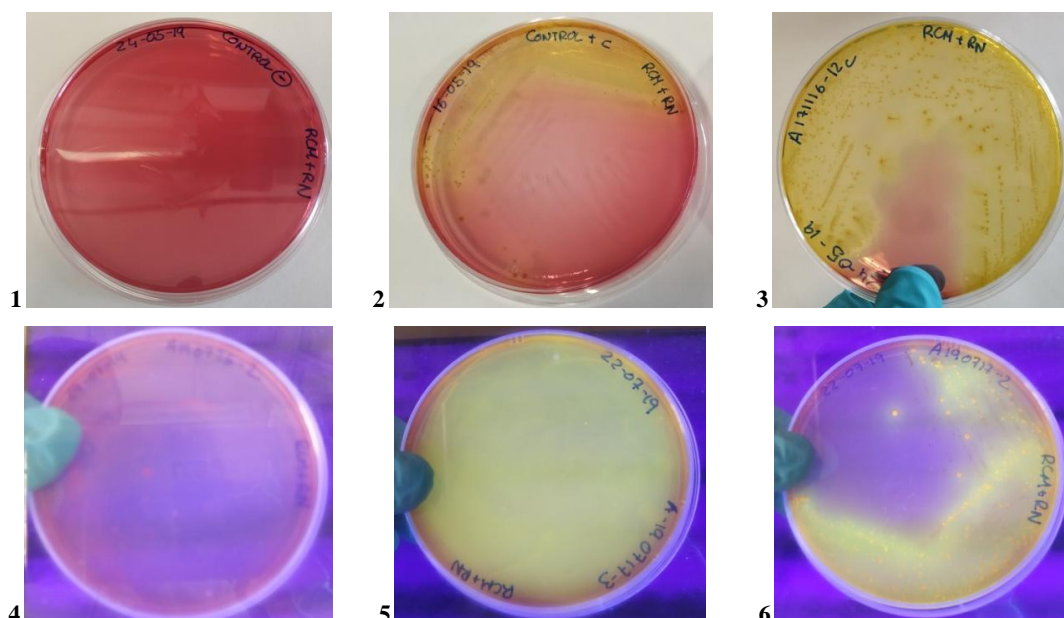


Figura 11. Resultados de cultivo en Agar RCM con Rojo Neutro y D-cicloserina de algunas muestras de leche cruda. (1) Control negativo; (2) Control positivo; (3) muestra de leche positiva; (4) muestra de leche sospechosa, negativa bajo luz UV; (5) muestra de leche sospechosa, positiva bajo luz UV; (6) muestra de leche sospechosa, positiva bajo luz UV.

Además, la adición de Rojo Neutro en el medio hizo posible que las colonias de los clostridios produjeran fluorescencia de color amarillo bajo luz UV, como se aprecia en las placas de las imágenes 5 y 6. Por el contrario, en la placa de la imagen 4, no se produjo fluorescencia característica del género *Clostridium* bajo luz UV.

Hay que señalar que sería idóneo complementar este método de cultivo en medio selectivo, con la prueba de la catalasa a las colonias dudosas, como mencionó en su estudio Jonsson (1990), ya que hay algunas colonias con un tenue color amarillo-anaranjado, pero que no producen fluorescencia.

En la Tabla 5 se muestran los resultados del cultivo de las leches sospechosas en Agar RCM suplementado con Rojo Neutro y D-cicloserina. Como se puede observar, de las 52 muestras de leches cultivadas, un 42% creció en el medio de cultivo y un 58% no creció.

Tabla 5. Resultados del cultivo de las leches sospechosas de estar contaminadas con clostridios butíricos en Agar RCM con Rojo Neutro y D-cicloserina.

	Número de muestras	%
Creció en cultivo	22	42
No creció en cultivo	30	58
Total	52	100

4.2.2 Detección de clostridios butíricos en leches sospechosas por qPCR

Las muestras de leche sospechosas de estar contaminadas con clostridios butíricos se analizaron mediante qPCR. Previamente, habían sido sometidas al tratamiento con subtilisina, ruptura de los esporos con microondas, purificación del DNA con el kit GenElute™ Bacterial Genomic DNA para Gram positivos y precipitación mediante acetato de sodio, etanol y glicógeno.

La leche puede retener en su capa de grasa un alto contenido de esporos, presentando un problema a la hora de su liberación de esa fase. Además, la naturaleza compleja de la leche, en la que una parte de las proteínas está formando las micelas de caseína, hace difícil la recuperación de los esporos butíricos. Por ello, se investigó la utilización de la enzima subtilisina, disuelta en un tampón que contiene un detergente, para la digestión de la leche y para facilitar la separación y concentración de los esporos que se encuentran dispersos en las diferentes fases de la leche.

En total, se analizaron 52 muestras de leches sospechosas, en 37 de ellas, se analizó un volumen de 0,5 mL de leche y en 15 se analizó un volumen de 18 mL. En los Anexos I y II se recogen los resultados de amplificación de las diferentes muestras sometidas a qPCR.

A partir de la ecuación de la recta de calibración obtenida de la representación gráfica incluida en la Figura 7, se calcularon las cantidades esporos detectadas en las muestras analizadas. En el caso de las leches sospechosas analizadas a partir de un volumen de 0,5 mL, los valores de Ct oscilaron entre 39,01 y 32,01; por lo que los niveles de esporos totales se encontraban entre 10^1 y 10^4 . El valor medio de Ct fue de $34,91 \pm 2,11$, que corresponde con una cantidad de 10^3 esporos totales.

Por otro lado, en el caso de las leches sospechosas que se analizaron a partir de un volumen de 18 mL, los valores de Ct oscilaron entre 38,68 y 33,42; siendo la cantidad de esporos totales de entre 10^1 y 10^3 . El valor medio de Ct fue de $36,15 \pm 2,15$, que corresponde con una cantidad de 10^2 esporos totales. A la vista de estos resultados, se sugiere que analizando un mayor volumen de muestra, se consigue una mayor sensibilidad en el procedimiento.

Como se ha indicado, las leches sospechosas de contaminación pueden contener una baja concentración de esporos, y ocasionar serios defectos en la maduración del queso. En el estudio realizado por Brändle et al. (2018) se analizaron muestras de leche cruda sospechosas de estar contaminadas de siete proveedores distintos, destinadas a la elaboración de queso. Seis de los proveedores producían leche cruda sin suministrar a las vacas ensilado como alimento, el séptimo sí lo suministraba. Como resultado, en cinco de las muestras se detectaron recuentos bajos de esporos <75 esporos/L y en la sexta entre 150-550 esporos/L que provocaron defectos de hinchazón tardía en algunos quesos. Por último, la leche cruda del proveedor que no suministraba ensilado, obtuvo una concentración de esporos de 550 esporos/L, provocando hinchazón tardía. A continuación, en las Tablas 6 y 7, se muestran los porcentajes de amplificación de las diferentes muestras por qPCR.

Tabla 6. Resultados de amplificación de leches sospechosas de contaminación con clostridios butíricos utilizando un volumen de muestra de 0,5 mL.

	Número de muestras	%
Sí amplifica	22	59
No amplifica	15	41
Total	37	100

En la Tabla 6 se muestran los resultados de amplificación de leches sospechosas de contaminación con clostridios butíricos, en las que se utilizó un volumen de muestra de 0,5 mL. Como se indica en la tabla, de las 37 muestras que se analizaron un 59% amplificaron en la qPCR con los *primers CTfla*, mientras que un 41% no amplificó.

En la Tabla 7 se muestran los resultados de amplificación de leches sospechosas de contaminación con clostridios butíricos, en las que se utilizó un volumen de muestra para análisis de 18 mL. En este caso, de las 15 muestras que se analizaron un 67% amplificaron por qPCR con los *primers CTfla*, sin embargo, un 33% fueron negativas.

Tabla 7. Resultados de amplificación de leches sospechosas de contaminación con clostridios butíricos utilizando un volumen de muestra de 18 mL.

	Número de muestras	%
Sí amplifica	10	67
No amplifica	5	33
Total	15	100

Según estos resultados, hubo un aumento en la tasa de amplificación cuando se utilizó una mayor cantidad de muestra, que era el principal objetivo al comparar diferentes volúmenes de muestra. Sin embargo, este hecho no se puede considerar significativo, ya que no se analizaron el mismo número de muestras en los dos grupos.

Una vez obtenidos los resultados de las muestras de leches sospechosas con diferente volumen, se agruparon en las Tabla 8 y 9 donde se estudió la relación que había entre el crecimiento en Agar RCM con Rojo Neutro y D-cicloserina y la amplificación mediante qPCR.

Tabla 8. Resultados de cultivo y amplificación de leches sospechosas de contaminación con clostridios butíricos utilizando un volumen de muestra de 0,5 mL.

	Número de muestras	%
Creció en cultivo	15	41
No amplifica	6	17
Si amplifica	9	24
No creció en cultivo	22	59
No amplifica	9	24
Si amplifica	13	35
Total	37	100

Observando los resultados de la Tabla 8, el 17% de las leches sospechosas creció en el cultivo, pero no amplificó, esto puede indicar que las leches estaban contaminadas con esporos de otra especie diferente al *C. tyrobutyricum*. Si observamos las leches que crecieron en el cultivo y amplificaron, un 24%, podemos afirmar que estas leches se encontraban contaminadas con *C. tyrobutyricum*.

Por otro lado, si observamos las leches que no crecieron en el cultivo, nos encontramos con un 24% que no amplificaron, por lo que deducimos que no estaban contaminadas. Por el contrario, un 35% no creció, pero si amplificó, por lo que podemos deducir que las leches estaban contaminadas. Estos resultados pueden deberse a varios motivos: a que la qPCR es una técnica que tiene más sensibilidad que el cultivo, porque hayan surgido dificultades en la

germinación de los esporos en un medio sólido suplementado con antibióticos, en este caso D-cicloserina, porque había muy poca cantidad de esporos que se han visto desplazados por otros microorganismos en el medio RCM.

Tabla 9. Resultados de cultivo y amplificación de leches sospechosas frescas. Volumen de muestra 18 mL.

	Muestras	%
Creció en cultivo	7	47
No amplifica	2	14
Si amplifica	5	33
No creció en cultivo	8	53
No amplifica	3	20
Si amplifica	5	33
Total	15	100

Como podemos observar en los resultados de la Tabla 9, el 14% de las leches sospechosas creció en el cultivo, pero no amplificó, esto puede indicar, como ocurrió en el caso anterior, que las leches estaban contaminadas con esporos de otra especie diferente al *C. tyrobutyricum*. Si observamos la relación de leches que crecieron en el cultivo y amplificaron, fue de un 33%, lo que nos puede indicar que estas leches se encontraban contaminadas con *C. tyrobutyricum*. Si comparamos este resultado, con el que se obtuvo al utilizar menor cantidad de muestra, podemos ver que, la cantidad de muestras que dieron como resultado positivo crecimiento en cultivo y amplificación es mayor. Hay que tener en cuenta, como ya se ha indicado, que se necesitarían hacer más repeticiones para comprobar la influencia del volumen de la muestra en la amplificación por qPCR.

Por otra parte, analizando los resultados de las leches que no crecieron en el cultivo, encontramos que un 20% de ellas no amplificaron, por lo que podemos suponer que no estaban contaminadas con clostridios butíricos. Por último, si examinamos las leches que no crecieron, pero si amplificaron, obtuvimos un 33%, por lo que podemos suponer que las leches estaban contaminadas. Como en los análisis de un menor volumen de muestra, estos resultados podrían ser debidos a varios factores.

Hay que señalar que, para la amplificación del DNA de los esporos, se emplearon unas secuencias de *primers* específicas, que amplificaban una región del gen de la flagelina de *C. tyrobutyricum*. Como hemos comentado, la falta de coincidencia entre los resultados de la amplificación por qPCR y el cultivo, puede deberse a la presencia de otras especies de clostridios butíricos en las leches. Aunque hay muchos estudios que han evaluado la recta de

calibrado de qPCR de esporos en leches contaminadas artificialmente con una especie en concreto, no hay datos publicados de la utilización de qPCR en leches contaminadas naturalmente.

Observando los resultados de las muestras analizadas, podemos decir que no hubo grandes variaciones en los resultados al aumentar el volumen de muestra analizada, exceptuando un ligero aumento en el porcentaje de las muestras que crecieron en el cultivo y amplificaron, es decir en las que pudo confirmarse su contaminación con *C. tyrobutyricum*.

4.2.3 Visualización de los productos de amplificación mediante gel de agarosa

Basándonos en la *Melt curve* de las muestras de leche analizadas por qPCR, se seleccionaron algunas muestras en las que aparecieron dobles picos. Por ello, se decidió analizar los productos de amplificación de estas muestras mediante electroforesis en gel de agarosa para comprobar el tamaño de los productos de la amplificación.

En primer lugar, se realizó un estudio *in silico* con la herramienta NCBI Primer-BLAST. Los resultados indicaron que para los *primers* CT*fla* utilizados (López-Enríquez et al., 2007) solo se obtuvo una coincidencia con un amplicón de 82 pb para el *C. tyrobutyricum* (Código Gen Bank: AJ242662).

En la imagen izquierda de la Figura 12 se representa la electroforesis del producto de amplificación de qPCR-CT*fla*, de algunas de las leches sospechosas analizadas. Como podemos observar el control positivo corresponde con el tamaño esperado del amplicón de *C. tyrobutyricum*, 82 pb. Para la muestra (1), se pudo apreciar una doble banda de amplificación, una correspondiente con el amplicón de *C. tyrobutyricum* y otra con una longitud del amplicón de 200 pb, aproximadamente. Este resultado se observó también en la *Melt curve*, ya que apareció un doble pico, uno correspondiente con la T_m característica del *C. tyrobutyricum*, 76,75, y otro a una T_m de 80,63. En la muestra (2), se obtuvo un tamaño de amplicón menor que el del *C. tyrobutyricum*, también en la *Melt curve* se obtuvo un pico a T_m 65,13 menor que la T_m de *C. tyrobutyricum*. En la muestra (3), no se observó banda del amplicón, sin embargo, la muestra amplificó en la qPCR a la misma T_m que *C. tyrobutyricum*. En la muestra (4), se aprecian dos ligeras bandas, una con un tamaño de amplicón similar al del *C. tyrobutyricum* y otro ligeramente inferior, semejante al amplicón de la muestra 2. En la correspondiente *Melt curve* se obtuvo una T_m similar a la del *C. tyrobutyricum*, pero el tamaño de la curva era mayor. Estos resultados pueden deberse a que cuando se calibra el método, siempre se obtiene un pico, pero cuando se analizan muestras de

leches reales que pueden estar contaminadas por *C. tyrobutyricum* y otras especies u otros microorganismos, pueden aparecer falsos positivos.

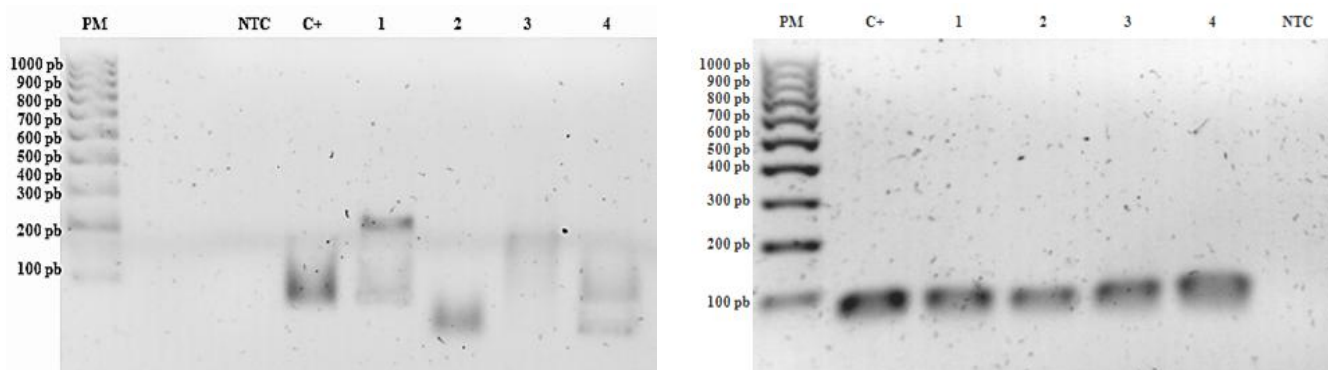


Figura 12. Imagen Izda. Electroforesis del producto de amplificación de qPCR de las muestras de leche sospechosa. PM: marcador de pesos moleculares; NTC: no template control; (C+): control positivo de *C. tyrobutyricum*; (1): muestra A170510-11; (2): muestra A190627-2; (3): muestra A170522-2; (4): muestra A171116-11. Imagen Dcha. Electroforesis del producto de amplificación de qPCR de una calibración de muestras de leche UHT contaminadas con esporos de *C. tyrobutyricum*. (PM): marcador de pesos moleculares; (C+): control positivo de *C. tyrobutyricum*; (1): 10^1 esporos totales; (2): 10^3 esporos totales; (3): 10^5 esporos totales; (4): 10^7 esporos totales; (NTC): no template control.

4.3 Estudio de la bioseparación magnética de esporos butíricos en leche UHT

Debido a la baja concentración de esporos que están presentes en la leche, uno de los objetivos de la utilización de MMPs funcionalizadas es que sean capaces de separar y concentrar los esporos por encima de los límites de detección (Lavilla et al., 2012). En este trabajo, se utilizaron para la separación biomagnética, leche UHT contaminada artificialmente con esporos y tratada con subtilisina. Se utilizaron muestras de leche UHT tratadas con subtilisina, porque en estudios anteriores realizados en el grupo de investigación, los porcentajes de recuperación obtenidos en leche UHT sin tratar fueron considerablemente bajos, del orden del 10%.

En esta parte del estudio se evaluó la idoneidad de los dos tipos de MMPs (tiol y yodo) funcionalizadas con el péptido pCZS1 para la separación de esporos butíricos pertenecientes a las especies *C. tyrobutyricum*, *C. beijerinckii*, y *C. butyricum*.

En el caso de la bioseparación magnética de esporos de *C. tyrobutyricum*, como se puede observar en la Figura 13, para 10^3 esporos totales se consiguió separar el 99% de los esporos, utilizando las MMPs de tiol y el 88% con la utilización de las MMPs de yodo. Por otro lado, para una cantidad de 10^5 esporos totales se consiguió separar el 72% con las MMPs de tiol y el 70% con la utilización de MMPs de yodo. La disminución del porcentaje de recuperación en 10^5 esporos puede ser debida a la saturación de los ligandos en la superficie de las MMPs, aunque la cantidad que se está poniendo siempre supera la del número de esporos.

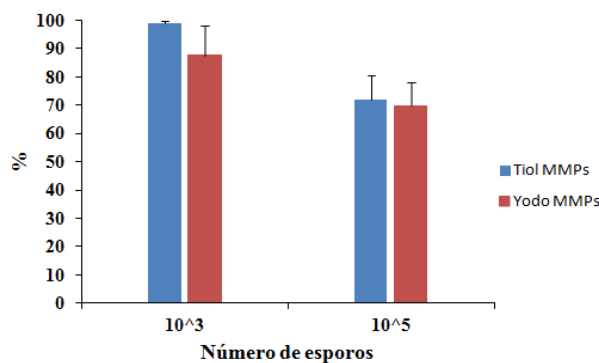


Figura 13. Porcentaje de esporos de *C. tyrobutyricum* unidos a las MMPs. (■) MMPs de tiol, (■) MMPs de yodo. Los valores representados corresponden con la media de seis repeticiones realizadas en tres ensayos independientes \pm la desviación estándar.

En la Figura 14 se muestran los resultados obtenidos en la bioseparación magnética de esporos de *C. beijerinckii*, en la que se obtuvo para 10^3 esporos, un 41% de unión a las MMPs de tiol y un 18% para las MMPs de yodo. Se observa en el caso de 10^5 esporos, que los porcentajes de separación son de un 58% para las MMPs de tiol y 52% para las MMPs de yodo. Además, como se puede observar, las desviaciones estándar obtenidas al realizar esta separación fueron elevadas tanto a la concentración de 10^3 esporos para ambas MMPs, como a la concentración de 10^5 esporos para las MMPs de tiol. Esto indica una gran variabilidad en la interacción de los esporos de esta especie con el ligando unido a las MMPs.

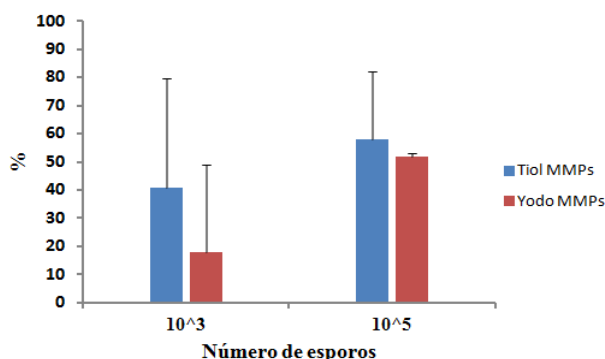


Figura 14. Porcentaje de esporos de *C. beijerinckii* unidos a las MMPs. (■) MMPs de tiol, (■) MMPs de yodo. Los valores representados corresponden con la media de cuatro repeticiones realizadas en dos ensayos independientes \pm la desviación estándar.

Se analizó también la bioseparación magnética de esporos de *C. butyricum*, pero en este caso no hubo prácticamente afinidad entre los esporos y las MMPs, observándose porcentajes muy bajos de unión. En el caso de 10^3 esporos, 0% para MMPs de tiol y yodo y en el caso de 10^5 esporos, 16% para MMPs de yodo y 9% para MMPs de tiol.

Se puede decir que las MMPs de tiol y yodo funcionalizadas con el péptido afín por los esporos de clostridios butíricos, tienen mayor afinidad por los esporos de *C. tyrobutyricum*, en cambio por los esporos de *C. beijerinckii*, y *C. butyricum*, tienen una baja afinidad o prácticamente nula.

Estos resultados indican que esta técnica podría usarse como una forma apropiada de concentrar el bajo número de esporos de *C. tyrobutyricum* encontrados en las leches sospechosas de contaminación, como un paso previo para su detección y cuantificación. A su vez, se deben realizar más estudios para desarrollar MMPs funcionalizadas con péptidos afines a otros clostridios butíricos como *C. beijerinckii* y *C. butyricum*. Por último y no menos importante, sería conveniente desarrollar un procedimiento que permitiese recuperar los esporos con las MMPs directamente de la leche, sin tener que realizar un tratamiento previo.

5. CONCLUSIONES

En este Trabajo Fin de Máster, con los resultados obtenidos, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. Los esporos de *C. tyrobutyricum* producidos en medio líquido han mostrado mejor amplificación por qPCR que los producidos en medio sólido.
2. La técnica qPCR se ha optimizado para la detección de esporos de *C. tyrobutyricum* en PBS, encontrándose una relación lineal entre 10^4 y 10^7 esporos totales.
3. La técnica qPCR ha permitido detectar *C. tyrobutyricum* en leche UHT a partir de 10^1 esporos totales. Existe una relación lineal entre el logaritmo del número de esporos y el valor de Ct de 10^3 a 10^7 esporos totales.
4. La amplificación por qPCR no ha permitido detectar otras especies como *C. beijerinckii* y *C. butyricum*, debido a que los *primers* no han amplificado la región diana en estas especies.
5. No se ha encontrado en todas las muestras sospechosas analizadas una correlación positiva entre los resultados del cultivo microbiológico y los de la qPCR.
6. El incremento del volumen de análisis de la leche mediante la aplicación del método diseñado para la detección por qPCR puede mejorar su sensibilidad.
7. El valor medio de los niveles de esporos butíricos detectados en las muestras de leche sospechosas que se han analizado, ha sido de 10^2 - 10^3 esporos totales.
8. Las micropartículas magnéticas funcionalizadas con un péptido afín por los esporos, recuperaron un elevado porcentaje de esporos de *C. tyrobutyricum* en leche UHT contaminada artificialmente y tratada con subtilisina.

Los resultados obtenidos en este estudio pueden servir de referencia para futuras líneas de investigación que pretendan desarrollar un método adecuado para la detección rápida de la presencia de esporos de clostridios butíricos en leche cruda.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abgrall, B., Bourgeois, C. y Bourva, F. (1985). Dénombrement des spores de *Clostridium tyrobutyricum* par filtration sur membrane et culture sur milieu gélosé. *Le Lait*, 65(647–648), 45–53. <https://doi.org/10.1051/lait:1985647-6484>
- Arias, C. (2013). Recuento y caracterización de *Clostridium spp* . en la ración unifeed y en la leche en relación con las condiciones higiénico sanitarias y de manejo de las ganaderías de oveja Manchega. Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real, España.
- 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, 165–173. <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, 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.002>
- Bassi, D., Cappa, F. y Cocconcelli, P. S. (2009). A combination of a SEM technique and X-ray microanalysis for studying the spore germination process of *Clostridium tyrobutyricum*. *Research in Microbiology*, 160(5), 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.04.003>
- 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), 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.06.008>
- 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, 18–23.
- Bourgeois, C. M., Le Parc, O., Abgrall, B. y Cleret, J.-J. (1984). Membrane Filtration of Milk for Counting Spores of *Clostridium tyrobutyricum*. *Journal of Dairy Science*, 67(11), 2493–2499. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(84\)81605-7](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(84)81605-7)
- Boyer, C., Whittaker, M. R., Bulmus, V., Liu, J. y Davis, T. P. (2010). The design and utility of polymer-stabilized iron-oxide nanoparticles for nanomedicine applications. *NPG Asia Materials*, 2(1), 23–30. <https://doi.org/10.1038/asiamat.2010.6>

- Brändle, J., Domig, K. J. y Kneifel, W. (2016). Relevance and analysis of butyric acid producing clostridia in milk and cheese. *Food Control*, 67, 96–113. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.038>
- Brändle, J., Heinzle, L., Fraberger, V., Berta, J., Zitz, U., Schinkinger, M., Stocker, W., Kneifel, y W., Domig, K. J. (2018). Novel approach to enumerate clostridial endospores in milk. *Food Control*, 85, 318–326. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.10.017>
- Can, H. Y., Elmali, M., Karagöz, A. y Öner, S. (2014). Detection of *Salmonella spp.*, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhi* and *Salmonella Typhimurium* in cream cakes by polymerase chain reaction (PCR). *Medycyna Weterynaryjna*, 70(11), 689–692.
- Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(2), 299–305.
- 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), 318–323. <https://doi.org/10.1017/S002202991200026X>
- Curioni, P. M. G. y Bosset, J. O. (2002). Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *International Dairy Journal*, 12(12), 959–984. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00124-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00124-3)
- 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, 82–87.
- De Jong, P. (2008). Thermal processing of milk. In T. J. Britz & R. K. Robinson (Eds.), *Advanced dairy science and technology* (pp. 1–31). Oxford, Reino Unido: Blackwell Publishing.
- De, M., Ghosh, P. S. y Rotello, V. M. (2008). Applications of nanoparticles in biology. *Advanced Materials*, 20(22), 4225–4241. <https://doi.org/10.1002/adma.200703183>
- Diaz-Amigo, C. (2010). Antibody-based detection methods: from theory to practice. In B. Popping, C. Diaz-Amigo y K. Hoenicke (Eds.), *Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists* (pp. 223–245). Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons.
- Driehuis, F. (2013). Silage and the safety and quality of dairy foods: A review. *Agricultural and Food Science*, 22(1), 16–34.

- Drouin, P. y Lafreniere, C. (2012). Clostridial Spores in Animal Feeds and Milk. *Milk Production - An Up-to-Date Overview of Animal Nutrition, Management and Health*.
<https://doi.org/10.5772/50775>
- 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(1–4), 1–15.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.04.006>
- EFSA (2010) Opinion of the scientific panel of food additives and nutrient sources added to food on the request from the European Commission related to scientific evidence for a revision of the maximum limits on nitrites in food adopted in Directive 2006/52/EC. Question number: EFSA-Q-2010-00097. Adopted on 11 March 2010. *EFSA Journal* 8: 1538.
- Fang, C. y Zhang, M. (2009). Multifunctional magnetic nanoparticles for medical imaging applications. *Journal of Materials Chemistry*, 19(35), 6258–6266.
<https://doi.org/10.1039/b902182e>
- Fullana, N. (2014). Producción y caracterización parcial de una proteasa bacteriana activa a baja temperatura. Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay.
- 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), 272–278.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.11.003>
- Gibson, T. (1965). Clostridia in Silage. *Journal of Applied Bacteriology*, 28(1), 56–62.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1965.tb02126.x>
- Gómez-Torres, N. (2017). Control of *Clostridium spp.* and prevention of late blowing defect of cheese by antimicrobial-producing lactic acid bacteria, high pressure and phage endolysins. Universidad Complutense de Madrid.
- Haft, L. A. (1994). Improved Quantitative PCR Using Nested Primers. *Genome Research*, 3, 332–337.
- 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), 4141–4146.
- Jakob, E. (2011). Analytik Rund Um Die Buttersäuregärung. *ALP Forum*, (85), 1–23.

- 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), 719–725. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(90\)78725-5](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(90)78725-5)
- Kaufman, L. y Weaver, R. H. (1960). Use of neutral red fluorescence for the identification of colonies of clostridia. *Journal of Bacteriology*, 79, 292–294.
- 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), 2919–2924.
- Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Elst, L. Vander y Muller, R. N. (2008). Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chemical Reviews*, 108, 2064–2110.
- Lavilla, M. (2008). Desarrollo de un método inmunoquímico para la detección y cuantificación de esporos de *Clostridium tyrobutyricum* en leche. Universidad de Zaragoza. España.
- 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), 214–219. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.09.008>
- 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), 488–498. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04435.x>
- Lavilla, M., Moros, M., Puertas, S., Grazú, V., Pérez, M. D., Calvo, M., De La 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), 3219–3226. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5621-z>
- Le Bourhis, A. G., Doré, 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), 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.027>

- Lee, K., Uegaki, K., Nishii, C., Nakamura, T., Kubota, A., Hirai, T. y Yamada, K. (2012). Computed tomographic evaluation of gas hole formation and structural quality in Gouda-type cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 65(2), 232–236. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2011.00751.x>
- Leisen, E. (2002). Influence of forage quality and hygienic conditions on the content of Clostridium in milk of organic farms in North-West Germany. *SÖL-Berater-Rundbrief*, (Tabelle 2), 37–41.
- Loessner, M. J., Maier, S. K., Schiwiek, P. y Scherer, S. (1997). Long-chain polyphosphates inhibit growth of *Clostridium tyrobutyricum* in processed cheese spreads. *Journal of Food Protection*, 60(5), 493–498. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-60.5.493>
- 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), 3747–3751. <https://doi.org/10.1128/AEM.02642-06>
- Masserini, M. (2013). Nanoparticles for Brain Drug Delivery. *ISRN Biochemistry*, 2013, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2013/238428>
- Michael, P. (2012). Laboratory Methods in Cell Biology: Biochemistry and Cell Culture. In *Methods in Cell Biology* (pp. 56–58). Oxford, Reino Unido: Academic Press.
- 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, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.005>
- Müller-Esterl, W. y Brandt, U. (2008). *Bioquímica : fundamentos para medicina y ciencias de la vida*. Barcelona, España: Reverté.
- Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262, 56–61. 64–5.
- Orfao, A. y Morent, M. M. (2011). Protocolo de Extracción de Ácidos Nucleicos. *Spanish National Biobank Network*, p. 30. Madrid, España.
- Parte, A. C. (2018). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: LPSN. Retrieved July 10, 2019, from <http://www.bacterio.net>
- Postollec, F., Mathot, A. G., Bernard, M., Divanac'h, M. L., Pavan, S. y Sohier, D. (2012). Tracking spore-forming bacteria in food: From natural biodiversity to selection by processes. *International Journal of Food Microbiology*, 158(1), 1–8.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.004>

- 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), 6036–6045. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8218>
- Ren, J., Liang, G., Man, Y., Li, A., Jin, X., Liu, Q. y Pan, L. (2019). Aptamer-based fluorometric determination of *Salmonella Typhimurium* using Fe₃O₄ magnetic separation and CdTe quantum dots. *PLoS ONE*, 14(6), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218325>
- 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) n° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión. Diario Oficial de la Unión Europea n° L 295 de 12.11.2011, pp. 1-177.
- Rodríguez-Lázaro, D. y Hernández, M. (2013). Real-time PCR in Food Science. *Current Issues in Molecular Biology*, 15, 25–38.
- Safarík, I. y Safaríková, M. (1999). Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *Journal of Chromatography*, 722(1–2), 33–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10068132>
- 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), 167–174. <https://doi.org/10.1006/fmic.2001.0475>
- Schneider, M. D., Grecz, N. y Anellis, A. (1963). Sporulation of *Clostridium botulinum* types A, B, and E, *Clostridium perfringens*, and putrefactive anaerobe 3679 in dialysis sacs. *Journal of Bacteriology*, 85(1950), 126–133.
- Setlow, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, 101(3), 514–525. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x>
- Skeie, S. (2010). Milk quality requirements for cheesemaking. In M. W. Griffiths (Ed.), *Improving the safety and quality of milk. Milk production and processing* (pp. 433–453). Cambridge, Reino Unido: Woodhead Publishing.
- 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 and Technology*, 96(5), 693–701. <https://doi.org/10.1007/s13594-016-0298-x>
- Van den Berg, G., Meijer, W. C., Düsterhöft, E. M. y Smit, G. (2004). Gouda and related cheeses. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (3rd ed., Vol. 2, pp. 103–140). [https://doi.org/10.1016/S1874-558X\(04\)80041-1](https://doi.org/10.1016/S1874-558X(04)80041-1)
- Villar, A. y Fernández, B. (1995). La contaminación butírica de la leche. Causas y efectos sobre los quesos. *Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPAMA)*, 32.
- Vissers, M. M. M., Driehuis, F., Te Giffel, M. C., De Jong, P. y Lankveld, J. M. G. (2007). Minimizing the Level of Butyric Acid Bacteria Spores in Farm Tank Milk. *Journal of Dairy Science*, 90(7), 3278–3285. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-798>
- Weinberg, Z. G. y Ashbell, G. (2003). Engineering aspects of ensiling. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2–3), 181–188. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00130-4](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00130-4)
- Wetzel, D. y Fischer, R. J. (2015). Small acid-soluble spore proteins of *Clostridium acetobutylicum* are able to protect DNA in vitro and are specifically cleaved by germination protease GPR and spore protease YyaC. *Microbiology (United Kingdom)*, 161(11), 2098–2109. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000162>
- Whiley, H., Akker, B. Van Den, Giglio, S. y Bentham, R. (2013). The Role of Environmental Reservoirs in Human Campylobacteriosis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 5886–5907. <https://doi.org/10.3390/ijerph10115886>
- Xue, L., Zheng, L., Zhang, H., Jin, X. y Lin, J. (2018). An ultrasensitive fluorescent biosensor using high gradient magnetic separation and quantum dots for fast detection of foodborne pathogenic bacteria. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 265, 318–325. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.03.014>
- Zhao, J., Lu, C., Chen, C. C. y Yang, S. T. (2013). Biological production of butanol and higher alcohols. In S. T. Yang, H. El-Ensashy y N. Thongchul (Eds.), *Bioprocessing technologies in biorefinery for sustainable production of fuels, chemicals, and polymers* (pp. 235–261). Hoboken, EE.UU.: John Wiley & Sons Inc.

ANEXOS

Anexo I

Tabla 10. Resultados obtenidos en el análisis de las muestras de leche cruda de vaca procedentes de la Asociación Interprofesional Lechera de Aragón (AILA), sospechosas de estar contaminadas con clostridios butíricos. Volumen de leche utilizado en el análisis: 0,5 mL.

Leches sospechosas	Descripción enriquecimiento	Cultivo	% amplificación	Coincidencia PCR-cultivo
A170522-1	Turbidez y muy poco gas al agitar el tubo	-	100	NO
A170927-1	Turbidez y gas	-	0	SI
A170510-10	Turbidez y gas	-	100	NO
A170522-2	Turbidez y poco gas	-	100	NO
A170522-3	Turbidez	+	100	SI
A170510-11	Turbidez	-	0	SI
A170714-1	Turbidez	-	0	SI
A170714-2	Turbidez y muy poco gas al agitar el tubo	-	0	SI
A170714-3	Turbidez y muy poco gas al agitar el tubo	+	0	NO
A170714-4	Turbidez y gas	+	100	SI
A170927-12	Turbidez y gas	+	0	NO
A170927-13	Turbidez	-	50	NO
A170927-14	Turbidez	-	0	SI
A170927-15	Turbidez	-	0	SI
A171005-1	Turbidez y gas	+	0	NO
A171005-2	Turbidez	-	100	NO
A171005-3	Turbidez	-	50	NO
A171020-1	Turbidez	-	50	NO
A171027-1	Turbidez y poco gas	-	50	NO
A171020-2	Turbidez	-	0	SI
A171020-3	Turbidez	-	50	NO
A171020-4	Turbidez y gas	+	50	SI
A171027-2	Turbidez	+	50	SI
A171027-3	Turbidez y gas olor intenso	+	100	SI
A171116-11	Turbidez y gas	+	50	SI
A171116-12	Turbidez y gas	+	50	SI
A171124-1	Turbidez y gas	+	0	NO
A171124-2	Turbidez	+	0	NO
A171124-3	Turbidez	-	100	NO
A171124-4	Turbidez	-	0	SI
A171215-1	Turbidez	-	50	NO
A171211-10	Turbidez y gas	+	50	SI
A171211-18	Turbidez	-	50	NO
A171211-35	Turbidez	-	100	NO
A171215-2	Turbidez	+	0	NO
A171215-3	Turbidez	-	0	SI
A171215-4	Turbidez y mucho gas	+	50	SI

Anexo II

Tabla 11. Resultados obtenidos en el análisis de las muestras de leche cruda de vaca, procedentes de la Asociación Interprofesional Lechera de Aragón (AILA), sospechosas de estar contaminadas con clostridios butíricos. Volumen de leche utilizado en el análisis: 18mL.

Leches sospechosas	Descripción enriquecimiento	Cultivo	% amplificación	Coincidencia PCR-cultivo
A190617-1	Turbidez	-	50	NO
A190617-2	Turbidez y mucho gas	+	100	SI
A190617-3	Turbidez	-	0	SI
A 190627-1	Turbidez	-	50	NO
A 190627-2	Turbidez y gas	+	50	SI
A 190627-3	Turbidez	-	0	SI
A 190705-1	Turbidez	-	50	NO
A 190705-2	Turbidez y gas	+	0	NO
A 190705-3	Turbidez	-	0	SI
A 190717-1	Turbidez y gas	+	100	SI
A 190717-2	Turbidez y gas	+	100	SI
A 190717-3	Turbidez y gas	+	0	NO
A190726-1	Turbidez, gas y olor intenso	+	100	SI
A190726-2	Turbidez	-	100	NO
A190726-3	Turbidez	-	50	NO