

Microbiota bacteriana de la leche cruda bovina almacenada en un centro de acopio

Ana Karina Albuja Landi ¹, Paola Arguello-Hernández ², Sandra Escobar Arrieta ¹, Verónica Cando Brito ¹, Judith Araque ³ & Félix Andueza ^{3,4,5*}

¹ Grupo de Investigación LEISHPAREC, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), Campus universitario, Carretera Panamericana. Riobamba, Ecuador.

² Grupo de Investigación IDEA, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), Campus universitario, Carretera Panamericana, Riobamba, Ecuador.

³ Grupo de investigación ACMME. Universidad Central del Ecuador, Campus Universitario, Avenida Universidad. Quito. Ecuador.

⁴ Doctorado en Química de Medicamentos, mención Biotecnología. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Sector Campo de oro, Mérida, Venezuela.

⁵ Doctorado en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. C. de José Antonio Novais, 12, Moncloa, Madrid. España.

*Correos electrónicos: anduezalealfelix@gmail.com, fdandueza@uce.edu.ec

Recibido: 21 de abril de 2024

Corregido: 3 de enero de 2025

Aceptado: 6 de enero de 2025

<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.114032>

RESUMEN

Introducción: Conocer la microbiota bacteriana presente en la leche cruda bovina es importante para determinar su inocuidad y los posibles usos en la producción de derivados lácteos. **Objetivo:** Identificar la biodiversidad de la microbiota bacteriana de la leche cruda bovina almacenada en un centro de acopio en Ecuador. **Métodos:** Se utilizó la secuenciación de próxima generación (NGS) Illumina MiSeq de la región hipervariable V3 y V4 del gen 16S rRNA para identificar la composición taxonómica bacteriana de la leche analizada. El estudio se desarrolló durante los meses de invierno y de verano en la Provincia de Tungurahua, Ecuador y las muestras se recolectaron en un centro de acopio. El análisis comparativo de las secuencias obtenidas se realizó mediante el programa ClustalW y BLAST, obteniéndose los filotipos asignados a nivel de familia, género y especies. **Resultados:** Los datos obtenidos indican un predominio de bacterias Gram positivas (Terrabacterias) pertenecientes al grupo de las bacterias lácticas (Firmicutes), destacando la presencia mayoritaria, tanto en invierno como en verano, de las especies *Lactococcus raffinolactis* (42,3% y 22,81%) y *Lactococcus lactis* (37,4% y 52,25%). La biodiversidad y riqueza de especies fue mayor en la época de invierno, aunque el número de bacterias fue mayor en la época verano. También se identificaron microorganismos patógenos, aunque en porcentajes bajos, de los géneros *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*. **Conclusiones:** Los hallazgos de la investigación pueden ayudar a formular estrategias para la elaboración de derivados lácteos de buena calidad y establecer denominaciones de origen que potencien su comercialización.

Palabras clave: Microbiota; bacterias; leche; biodiversidad; Ecuador.

SUMMARY

Bacterial microbiota of raw bovine milk stored in a collection center

Introduction: Knowing the bacterial microbiota present in raw bovine milk is important to determine its safety and possible uses in the production of dairy products. **Objective:** Identify the biodiversity of the bacterial microbiota of raw bovine milk stored in a collection center in Ecuador. **Methods:** Illumina MiSeq next-generation sequencing (NGS) of the V3 and V4 hypervariable region of the 16S rRNA gene was used to identify the bacterial taxonomic composition of the analyzed milk. The study was carried out during the winter and summer months in the Province of Tungurahua, Ecuador and the samples were collected in a collection center. The comparative analysis of the sequences obtained was carried out using the ClustalW and BLAST programs, obtaining the phylotypes assigned at the family, genus, and species level. **Results:** The data obtained indicate a predominance of Gram positive bacteria (Terrabacteria) belonging to the group of lactic acid bacteria (Firmicutes), highlighting the majority presence, both in winter and summer, of the species *Lactococcus raffinolactis* (42.3% and 22.81%) and *Lactococcus lactis* (37.4% and 52.25%). Biodiversity and species richness were greater in the winter season, although the number of bacteria was greater in the summer season. Pathogenic microorganisms were also identified, although in low percentages, of the genera *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* and *Streptococcus*. **Conclusions:** The research findings can help formulate strategies for the production of good quality dairy products and establish designations of origin that enhance their commercialization.

Keywords: Microbiota; bacteria; milk; biodiversity; Ecuador.

RESUMO

Microbiota bacteriana do leite bovino cru armazenado em um centro de coleta

Introdução: Conhecer a microbiota bacteriana presente no leite bovino cru é importante para determinar sua segurança e possíveis utilizações na produção de produtos lácteos. **Objetivo:** Identificar a biodiversidade da microbiota bacteriana do leite bovino cru armazenado em um centro de coleta no Equador. **Métodos:** O sequenciamento de próxima geração (NGS) Illumina MiSeq da região hipervariável V3 e V4 do gene 16S rRNA foi utilizado para identificar a composição taxonômica bacteriana do leite analisado. O estudo foi realizado durante os meses de inverno e verão na província de Tungurahua, Equador e as amostras foram coletadas em um centro de coleta. A análise comparativa das sequências obtidas foi realizada através dos programas ClustalW e BLAST, obtendo-se os filotipos atribuídos em nível de família, gênero e espécie. **Resultados:** Os dados obtidos indicam um predomínio de bactérias Gram positivas (Terrabacteria) pertencentes ao grupo das bactérias lácticas (Firmicutes), destacando-se a presença maioritária, tanto no inverno como no verão, da espécie *Lactococcus raffinolactis* (42,3% e 22,81 %) e *Lactococcus lactis* (37,4% e 52,25%). A biodiversidade e a riqueza de espécies foram maiores no inverno, embora o número de bactérias tenha sido maior no verão. Também foram identificados microrganismos patogênicos, embora em percentuais baixos, dos gêneros *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*. **Conclusões:** Os resultados da investigação podem ajudar a formular estratégias para a produção de produtos lácteos de boa qualidade e estabelecer denominações de origem que potenciem a sua comercialização.

Palavras-chave: Microbiota; bactérias; leite; biodiversidade; Equador.

1. INTRODUCCIÓN

La microbiota bacteriana de la leche cruda ha sido estudiada durante varias décadas debido a las relaciones entre su biodiversidad y las posibles enfermedades de origen alimentaria que puede traer su consumo [1-3]. De igual forma, se ha establecido desde hace años la influencia que tiene la composición de la población de bacterias con la calidad de los productos lácteos que de ella se pueden derivar [4, 5].

La microbiota bacteriana de la leche cruda de origen bovino puede contener bacterias procedentes del ambiente donde se encuentra el ganado, de los alimentos dispensados, de los utensilios utilizados para el ordeño, así como también de la ubre y piel de la vaca [6, 7]. La diversidad en la composición taxonómica de esta población bacteriana se ha relacionado también con los diferentes tipos de producción de la leche empleados por los ganaderos [6, 8].

Numerosos estudios se han publicado sobre la microbiota bacteriana presente en la leche cruda de origen bovino [6, 7, 9, 10], observándose la presencia de una gran diversidad de géneros y especies, algunas patógenas, causantes de diversos tipos de infecciones en el rebaño vacuno y de infecciones alimentarias en los humanos [1, 3], así como especies beneficiosas para la salud de los consumidores, dado a su propiedades como probióticos [11, 12]. Por otra parte, también se han detectado especies bacterianas con capacidades enzimáticas que le permiten diversas aplicaciones a nivel de la industria de los derivados lácteos [13, 14, 15].

En Ecuador, los estudios sobre la microbiota bacteriana de la leche cruda bovina se han relacionado con trabajos sobre los indicadores de calidad sanitaria, detección de bacterias patógenas e investigaciones sobre regulaciones sanitarias y económicas [16-21].

El empleo de las técnicas metagenómicas en los estudios de identificación de la biodiversidad bacteriana busca ampliar el conocimiento sobre la biodiversidad de la microbiota de la leche cruda bovina, lo cual, utilizando las técnicas microbiológicas tradicionales de cultivo, aislamiento, cuantificación y caracterización, es limitado [6, 7, 10].

Con los estudios metagenómicos se puede determinar tanto los microorganismos cultivables como los viables no cultivables, recopilando nueva información sobre muchos taxones microbianos, inclusive de aquellos no conocidos hasta ahora [22, 23].

Al estudiar la microbiota bacteriana presente en la leche cruda almacenadas en un centro de acopio ubicado en la provincia de Tungurahua, se podrá establecer tanto la calidad microbiana de la leche, como la población bacteriana característica y su biodiversidad, lo cual servirá para poder tener en un futuro, denominaciones de origen en los productos lácteos que se producen en esa zona del país, además de detectar cepas bacterianas con potencial biotecnológico para su utilización en la agroindustria alimentaria y no alimentaria, así como en la industria farmacéutica, ayudando al desarrollo tecnológico y económico de la zona y de Ecuador.

Este estudio pionero representa un avance fundamental en la comprensión de la composición microbiana y genética de la leche, abriendo puertas a la exploración detallada de la diversidad microbiológica presente en este vital recurso.

2. METODOLOGÍA

2.1. Obtención de muestras

Las muestras de leche cruda bovina analizadas en el estudio fueron recolectadas en el centro de acopio ubicado en el Cantón Mocha, perteneciente a la Provincia de Tungurahua, Ecuador (latitud de 1°25'10.3"S y una longitud de 78°39'12.5"W), en donde se almacena diariamente aproximadamente 2000 litros de leche, proveniente de 91 productores lecheros (Ver figura 1). Se analizaron en total 4 muestras compuestas de leche cruda (500 mL) provenientes de las rutas y los tanques de almacenamiento. Las muestras fueron recolectadas durante las épocas de invierno y verano de acuerdo con los datos de pluviosidad de la zona (verano: agosto y septiembre 2020; invierno: diciembre 2020 y enero 2021), siguiendo para ello los criterios indicados por la norma ecuatoriana para la recolección de muestras de alimentos, entre ellos la leche cruda, y manteniendo durante todo el proceso las medidas de higiene y asepsia adecuadas [24].

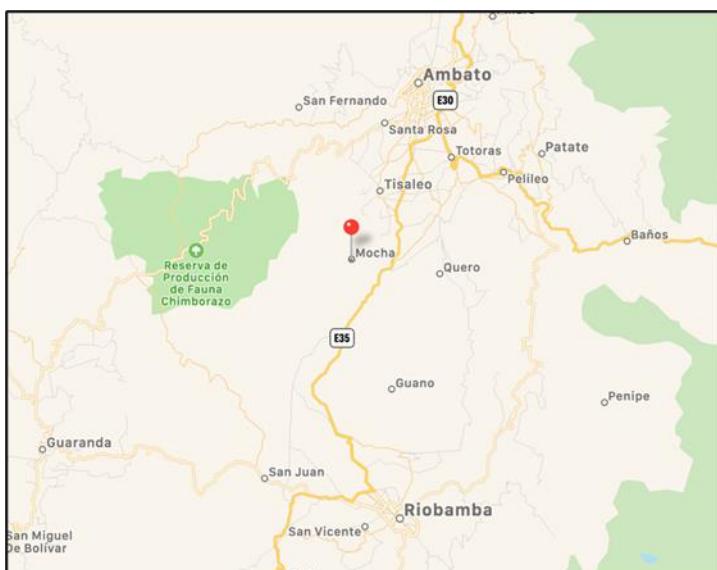


Figura 1. Mapa de ubicación del Cantón Mocha. Tungurahua. Ecuador.

Fuente: <https://www.google.com/maps/place/Cantón+Mocha>

2.2. Extracción y cuantificación del ADN genómico

Para estudiar la diversidad bacteriana de la leche cruda almacenada en el centro de acopio, se empleó el análisis de perfil taxonómico de los genes del ARN 16S de bacterias, mediante secuenciación masiva Next Generation Sequencing (NGS), a través del sistema de secuenciación MiSeq de Illumina. Para ello, cada muestra fue centrifugada a 10000 revoluciones por minuto (rpm) durante un tiempo de 10 minutos. Finalizado el tiempo de la centrifugación se descartó el sobrenadante y se recolectó el pellet en un tubo ependorf y el mismo fue utilizado para el proceso de extracción de ADN genómico total mediante disruptión mecánica, utilizando mortero y pistilo, por un tiempo de 12 min. Seguidamente se realizó una lisis por método químico, utilizando el kit de extracción Fast DNA™ SPIN Kit for Soil, siguiendo las instrucciones del fabricante (MP Biomedicals, CA USA). El ADN genómico total obtenido luego del proceso de extracción fue diluido en agua ultra pura libre de nucleasas, y cuantificado usando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 a una absorbancia a 260 y 280 nm (Thermo Fisher, USA).

2.3. Amplificación del gen bacteriano ARNr 16 S

La región amplificada fueron las regiones variables V3 y V4 de los genes del ARNr 16S bacterianos y las regiones conservadas que se encuentran entre ellas [25, 26]. En una primera etapa se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando una mezcla de reacción de 50 μ L que contenía 0,3 mg/mL de albúmina de suero bovino, 250 μ M de mezcla de dinucleótidos (dTNP), 0,5 μ M de cada uno de los primer V3 y V4 con los adaptadores para los índices Nextera Xt, 0,02 U de polimerasa de alta fidelidad (Phusion High-Fidelity DNA polymerase. Thermo Scientific), 5 μ L del ADN purificado y buffer HF 5X con 1,5 mM de MgCl₂ [27].

Las secuencias de los primer utilizados fueron:

1. Bakt_341F: 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' [28]
2. Bakt_805R: 5'-GACTACHVGGTATCTAATCC-3' [29]

Las condiciones para esta primera PCR fueron las siguientes: Inició a 98 °C durante 30 segundos, seguidos de 25 ciclos a 98 °C durante 10 segundos, a 55 °C durante 15 segundos y a 72 °C durante 20 segundos, concluyendo con un ciclo final a 72 °C durante 5 minutos [30].

Los productos del PCR fueron purificados mediante el kit QiaQuick para PCR (Qiagen, Hilden, Germany) y se cuantificaron usando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher, USA).

En una segunda etapa, se llevó a cabo otra PCR utilizando la misma mezcla de reacción que se empleó en la primera PCR [27]. No obstante, en esta ocasión se incorporaron secuencias índices cohesivas P5 y P7 que se hibridaron con los adaptadores de la célula de flujo del sistema de secuenciación MiSeq de Illumina [30]. Los primer utilizados para el PCR fueron:

P5: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTATAAGAGACAG-3';

P7: 5'-GTCTCGTGGCTCGGAGATGTATAAGAGACAG-3'

El programa para esta PCR fue el mismo que para el primer PCR, con la excepción de que se llevaron a cabo solamente 8 ciclos de amplificación [30].

La finalidad de esta segunda PCR fue conseguir amplicones 16S que posean una combinación de índices única que la diferencia del resto.

A continuación, se preparó un tubo con el ADN genómico, el cual se mantuvo a -20 °C, y posteriormente se remitió a la empresa Biosinbiociencias (Quito, Ecuador) para la secuenciación con el sistema MiSeq de Illumina.

2.4. Análisis bioinformático

Para determinar la localización filogenética de los metagenomas, se compararon las secuencias obtenidas con secuencias de los genes 16S rRNA, disponibles tanto en la base de datos del NCBI (National Center of Biotechnology Information) como del EMBL-Bank (EMBL Nucleotide base de datos de secuencias). La asignación de los grupos putativos se realizó con el programa RDP (de Ribosomal Data Project) con un porcentaje de confiabilidad igual o superior al 90%. El análisis comparativo de las secuencias se realizó mediante BLAST (Basic Local Alignment Tool). Las secuencias se alinearon con el programa ClustalW y posteriormente se realizó la construcción de árboles filogenéticos, calculados mediante el algoritmo Neighbor Joining, NJ [31], utilizando el programa Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 4.0. Se realizó un análisis de Bootstrap (1000 réplicas) para evaluar posibles topologías y generar árboles de consenso [32]. Las secuencias finales fueron identificadas por el sistema BLAST [26,

33] con una tasa de identidad del 99 % para bacterias (base de datos RefSeq 16S) y los resultados se visualizarán con gráficos Krona y tablas de clasificación taxonómica de unidades operativa.

2.5. Determinación de índices de biodiversidad

Para valorar la biodiversidad bacteriana presente en las muestras de leche se utilizaron los índices de biodiversidad riqueza específica de especies y el índice de Margalef. Para determinar la riqueza específica (S) se consideraron los datos del número total de especies bacterianas obtenidas en los estudios metagenómicos, tanto en la época de invierno, como en la época de verano [34, 35].

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Resultados del estudio metagenómico

Los métodos basados en enfoques independientes del cultivo microbiano fundamentado en amplicones, pueden identificar con éxito los cambios en la microbiota asociados con el clima estacional, la gestión de granjas, la transferencia de leche del camión a las instalaciones de procesamiento de leche y la salud del animal. Estas técnicas permiten un análisis en profundidad de la microbiota de la leche y son capaces de detectar taxones que no se encuentran utilizando métodos de cultivo tradicionales [36, 37].

Para estudiar la diversidad bacteriana de la leche cruda bovina en el presente trabajo se utilizó la aproximación que dan las técnicas metagenómicas, comparando el microbioma bacteriano en época de invierno con el microbioma en la época de verano.

Los resultados generales obtenidos del estudio metagenómico para la muestra de leche cruda bovina procedentes del centro de acopio de Mocha en época de invierno y de verano se detallan en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados del análisis metagenómico de la leche cruda recolectada en época de verano e invierno del centro de acopio de Mocha. Tungurahua. Ecuador.

Época	Concentra-ción libre-ria de ADN (ng/uL)	Am-plicones	Número de lec-turas	OTUs	Número de secuen-cias	Número de géneros	Número de espe-cies	Número de bacte-rias
Invierno	31,33	609	254040	425	68539	48	99	68539
Verano	39,45	461	199110	427	72 470	46	95	72470

Nota: (OTUs): Unidad taxonómica operativa; (ng/uL): nanogramo/microlitro

Observando los resultados de la tabla 1 se puede indicar que fue posible analizar 68539 secuencias genómicas en las muestras de leche cruda bovina en la época de invierno, estas correspondieron a 425 Unidades Taxonómicas Operativas (OTUS), 48 géneros y 99 especies bacterianas, y para la época de verano, los resultados señalan 72470 secuencias correspondientes a 427 OTUS, con la presencia de 46 géneros y 95 especies bacterianas (Ver tabla 1).

Los resultados obtenidos en el estudio metagenómico, con relación al número de géneros y especies detectados, tanto en la época de invierno, como en la época de verano, indican que durante la época de verano el número de géneros y especies bacterianas se reducen ligeramente, al pasar de 50 géneros y 107 especies en la época de invierno, a 46 géneros y 95 especies

en la época de verano. Sin embargo, a pesar de que el número de especies disminuye ligeramente durante la época de verano, el número de individuos totales de la comunidad bacteriana aumenta significativamente al pasar de 62936 individuos en la época de invierno a 72470 individuos totales en la época de verano (Ver tabla 1).

En la época de invierno hay una disminución de la temperatura ambiental, lo cual repercute disminuyendo las tasas de crecimiento bacteriano de la mayoría de las bacterias mesófilas que forman parte de la microbiota de la leche, favoreciendo en este caso el crecimiento de especies de bacterias psicrofilas que son más variadas en su diversidad de especies, pero menos abundantes en número de individuos que las bacterias aerobias mesófilas, las cuales son generalmente parte de la microbiota de la leche, pero que pueden estar desfavorecidas en épocas cuando las temperaturas ambientales son más bajas [38].

Se ha señalado que las especies bacterianas que aumentan su diversidad en la época de invierno corresponden al grupo de las bacterias psicrofilas perteneciente al grupo de las gamma proteobacterias entre las cuales destacan la especies del género *Pseudomonas* [10, 39].

De igual manera, se debe considerar que, durante la época de verano, al aumentar la temperatura del ambiente, las bacterias heterótrofas presentes en el estiércol y en el ambiente se multiplican a una tasa más alta, este aumento del número de bacterias puede dar origen a una mayor transferencia de bacterias desde el medio ambiente hacia la leche, aumentando en este caso la población bacteriana de la leche [10, 40].

Resultados similares, en cuanto al número de especies e individuos en la comunidad bacteriana en diferentes épocas climáticas, han sido señalados por otros investigadores en diferentes partes del mundo, incluyendo países latinoamericanos [40-43].

En un estudio metagenómico realizado en Noruega por Skeie *et al.* en el año 2019 [44], donde se evaluó la composición bacteriana de la leche, los autores indican que la microbiota bacteriana se ve influenciada por el mes de muestreo, ello tomando en consideración si se trata de meses de lluvia con bastantes precipitaciones o no, así como la presencia de bajas o altas temperaturas en los meses de muestreo, ya que estos parámetros influyen en la tasa de reproducción bacteriana, y además, por la etapa de procesamiento en la que se obtienen las muestras, ya que existen fases del procesamiento de la leche donde pueden ocurrir contaminaciones cruzadas por parte del ambiente, uso de materiales y utensilios mal higienizados, o posibles contaminaciones por parte del personal que labora en los procesos, hecho que coincide con lo obtenido en la investigación realizada, donde se pudo observar cambios en la abundancia relativa del microbioma de la leche en invierno y verano, ello debido probablemente, al efecto del agua de las lluvias que puede actuar como un factor diluyente, así como las bajas y altas temperaturas de los meses de invierno y verano respectivamente, y por posibles contaminaciones de utensilios y operarios.

Los resultados del estudio metagenómico de la leche cruda bovina almacenada en el centro de acopio se encuentran detallados en la tabla 2 y en los gráficos Krona de las figuras 2, 3, 4 y 5, mismos que revelan la abundancia relativa de bacterias organizadas según la estructura filogenética de los grupos taxonómicos predominantes Terrabacterias y Proteobacterias.

En relación con el tipo de especies de bacterias que prevalecen en la leche cruda bovina que se recolectaron en el centro de acopio de Mocha, se puede indicar que existe un claro predominio de las bacterias Gram positivas (Terrabacterias), pertenecientes al grupo de las bacterias láctica (Firmicutes), sobre las bacterias Gram negativas (Proteobacterias), tanto en la época de invierno como la de verano (Ver tabla 2 y figuras 2 y 3).

Tabla 2. Distribución porcentual de biodiversidad bacteriana observada en los estudios metagenómicos de la leche cruda recolectada en época de verano e invierno del centro de acopio de Mocha. Tungurahua. Ecuador.

Época estacional	Grupo filogenético (Clade)	Clase	Géneros (Número)	Especies (Número)	Cepas (Número)	Porcentaje del total (%)
Invierno						
	FCB	Bacteroidete	7	7	42	0,060
	Proteobacterias	α -proteobacterias	3	3	18	0,600
	Proteobacterias	β -proteobacterias	1	1	2	0,070
	Proteobacterias	γ -proteobacterias	21	59	2941	4,000
	Terrabacterias	Actinobacterias	7	7	187	0,300
	Terrabacterias	Firmicutes	9	22	65349	95,000
Verano						
	FCB	Bacteroidete	2	7	79	0,100
	Proteobacterias	α -proteobacterias	3	3	18	0,200
	Proteobacterias	β -proteobacterias	2	2	3	0,004
	Proteobacterias	γ -proteobacterias	20	43	8138	11,000
	Terrabacterias	Actinobacterias	4	10	220	0,300
	Terrabacterias	Firmicutes	12	27	64010	88,00

En la época de invierno (Ver tabla 2 y figura 2), con base en los datos de abundancia relativa, se observa que el género *Lactococcus* dominó la microbiota bacteriana con un 90,55% destacando entre ellas las especies *L. lactis* (53%), *L. raffinolactis* (23%), *L. piscium* (8%), *L. chunganensis* (6 %) y *L. garvieae* (1%).

Con respecto a los resultados en la época de verano (Ver tabla 2 y figura 3), se puede indicar, en base a los datos de abundancia relativa a nivel de género, que el 83,85 % de las bacterias presentes en la muestra de leche cruda bovina pertenecen al género *Lactococcus*, destacando entre ellas las especies *L. raffinolactis* (42%), *L. lactis* (38%), y *L. garvieae* (4%), muy similar a lo observado en la época de invierno.

Investigadores en diferentes partes del mundo han señalado que, en una leche de buena calidad sanitaria, existe el predominio de la población de bacterias láctica sobre los restantes grupos. Resultado que se evidencia en la presente investigación, donde los géneros predominantes fueron *Lactococcus* y *Leuconostoc* con porcentajes superiores al 70 % (Ver figuras 2 y 3) en las dos épocas climáticas evaluadas [11, 12, 15, 23, 36, 45-48].

Los resultados del presente trabajo difieren de los obtenidos por Skeie *et al.* en Noruega durante el año 2019 [44], quienes encuentran como los géneros bacterianos más abundantes *Pseudomonas* (26,6%), *Lactococcus* (12%), *Bacillus* (11 %) y *Streptococcus* (6,4%), mientras que en el presente estudio el género predominante en ambos muestreros fue *Lactococcus* representando el 84,04 y 92% en verano e invierno respectivamente (Ver figuras 2 y 3).

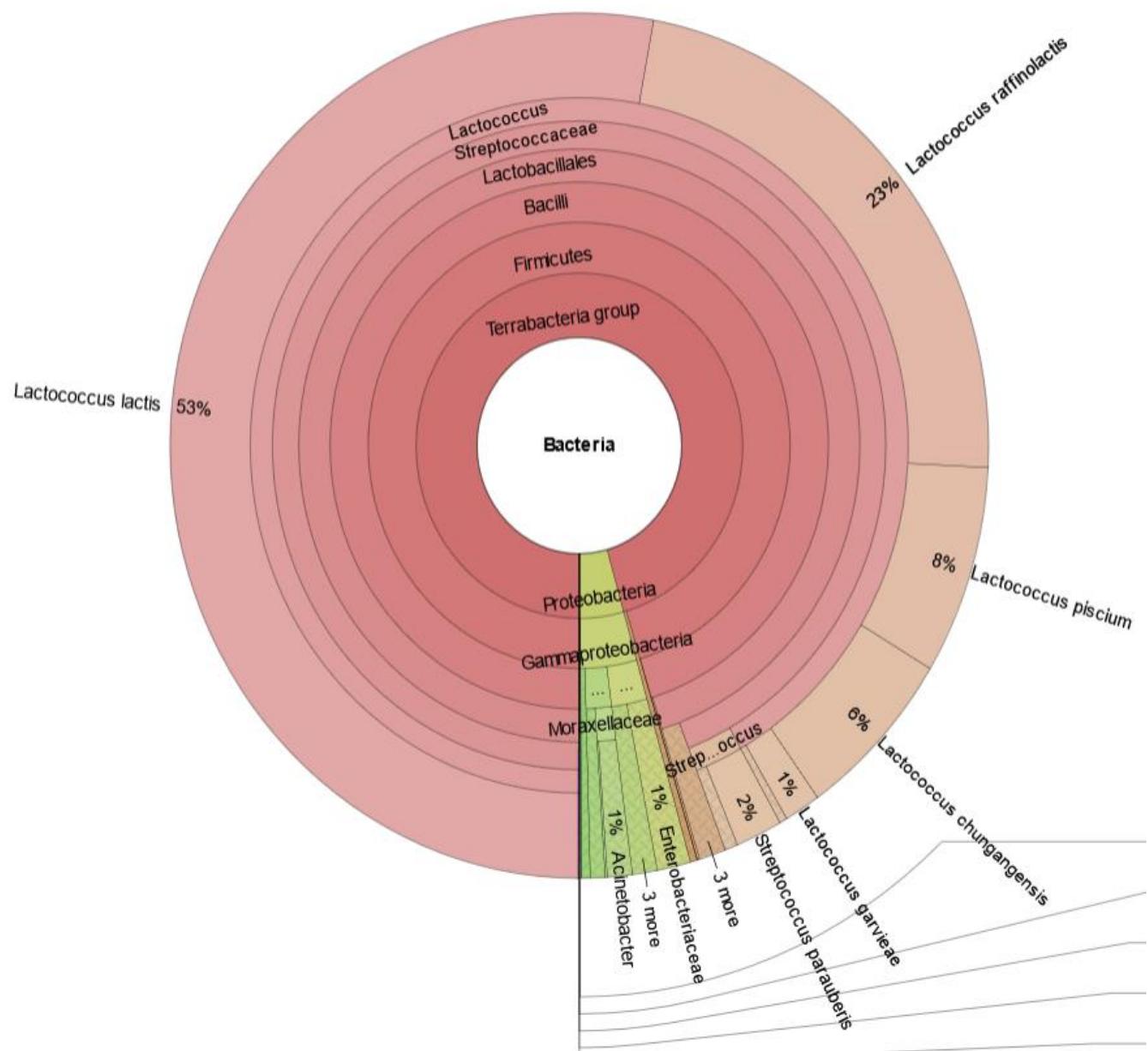


Figura 2. Abundancia relativa de los principales grupos taxonómicos a nivel de género y especie, en muestras de lecha cruda bovina del centro de acopio Mocha. Tungurahua. Ecuador para la época de invierno.

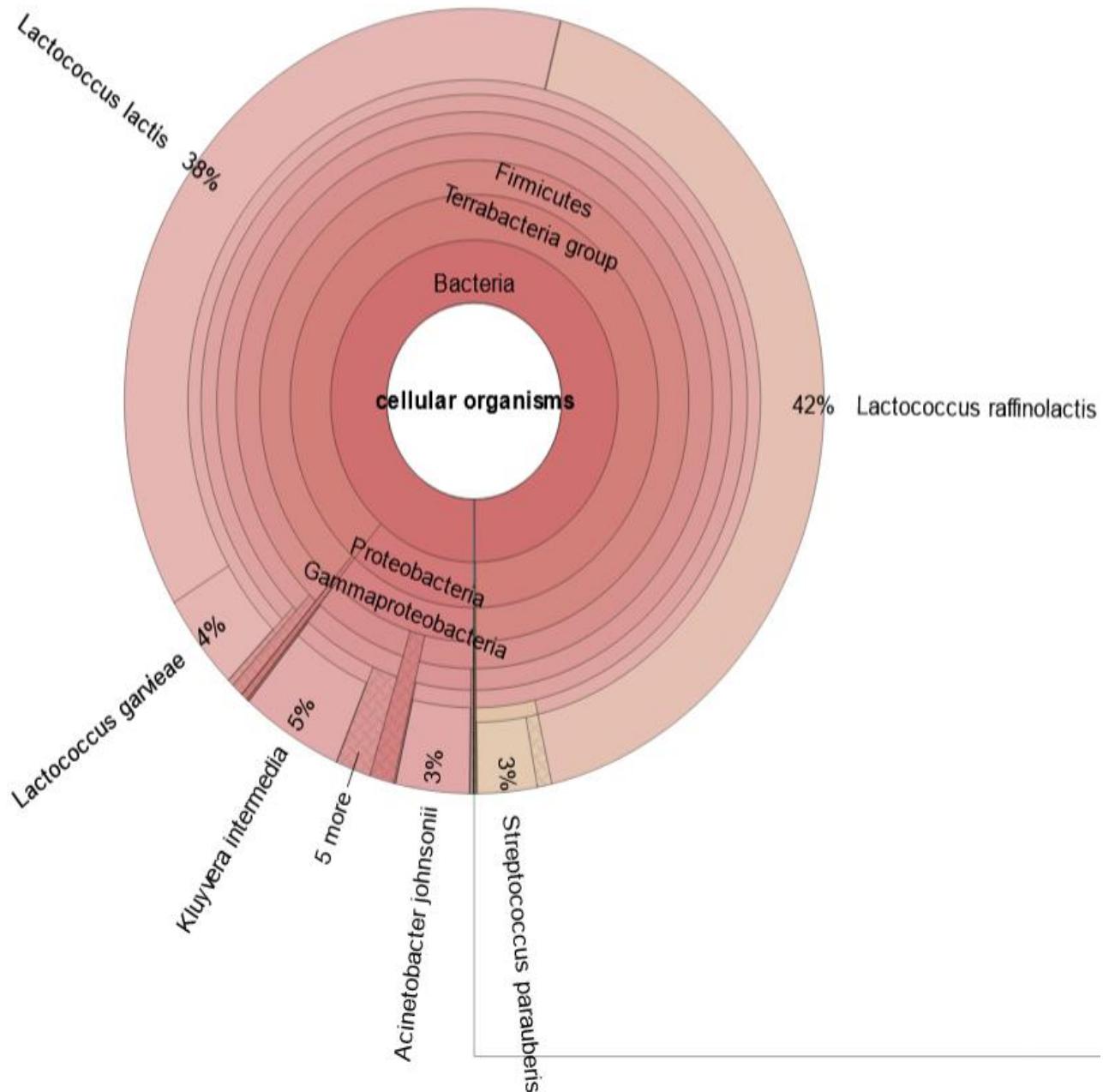


Figura 3. Abundancia relativa de los principales grupos taxonómicos a nivel de género y especie, en muestras de lecha cruda bovina del centro de acopio Mocha. Tungurahua. Ecuador para la época de verano.



Figura 4. Abundancia relativa de los principales grupos taxonómicos dentro de la clase γ Proteobacterias, en muestras de lecha cruda bovina del centro de acopio Mocha. Tungurahua. Ecuador para la época de invierno.

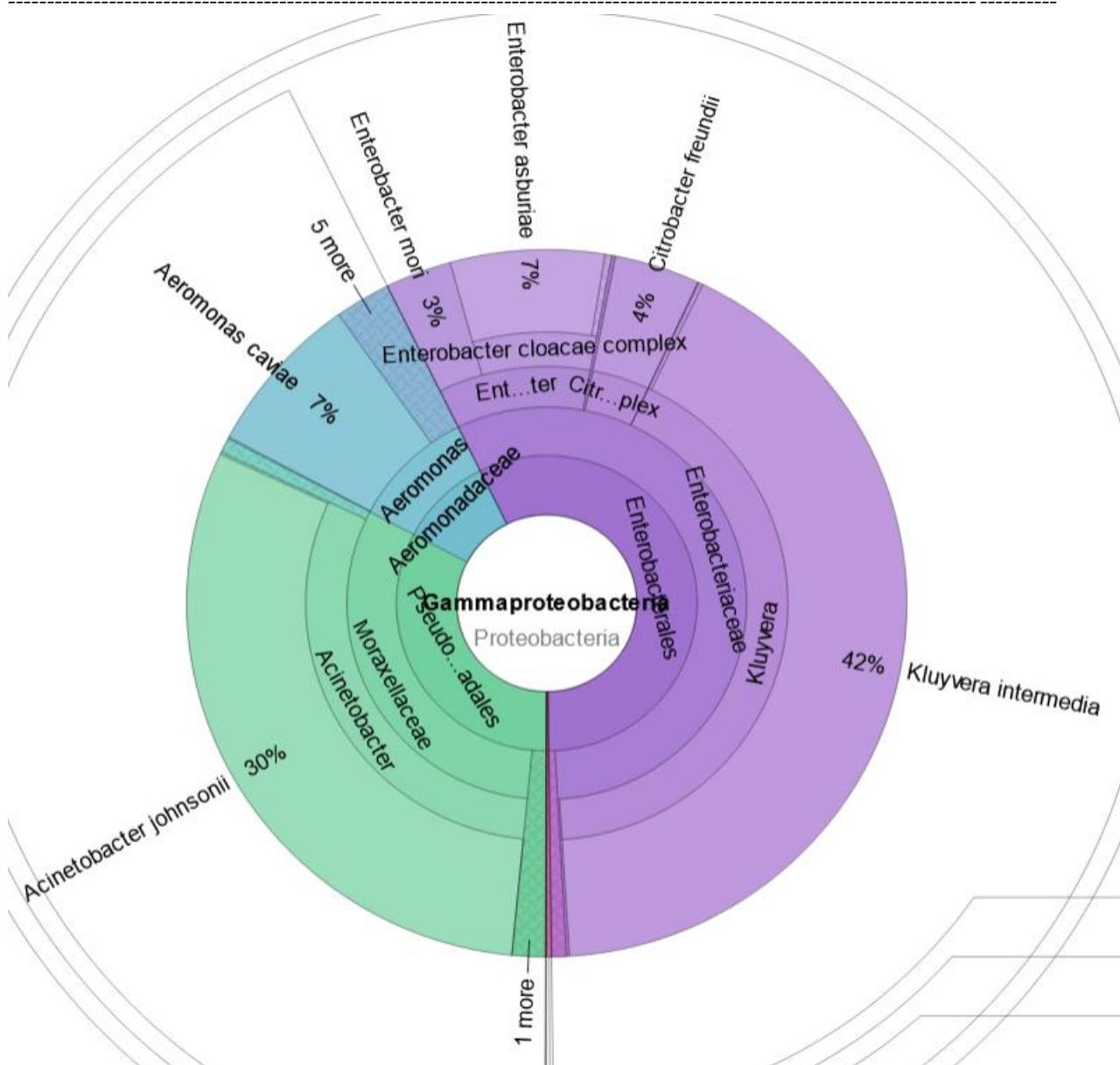


Figura 5. Abundancia relativa de los principales grupos taxonómicos dentro de la clase γ Proteobacterias, en muestras de lecha cruda bovina del centro de acopio Mocha. Tungurahua. Ecuador para la época de verano.

De igual forma, los datos obtenidos con los análisis metagenómico de la leche del centro de acopio de Mocha evidencian una composición de géneros y especies bacterianas muy diferentes a los encontrados por otros investigadores en diferente partes del mundo, lo cual se puede deber a los múltiples factores que inciden en la composición microbiológica de la leche cruda bovina, siendo prácticamente imposible encontrar una leche con un microbiota de igual composición taxonómica de una región a otra [7, 39, 41, 42, 49].

Por otra parte, también se pudo observar en los resultados del análisis metagenómico la presencia de diversos géneros y especies del grupo de las Proteobacterias, prevaleciendo miembros de la clase γ proteobacterias en la época de verano respecto a la época de invierno (Ver tabla 2 y figuras 4 y 5).

Destaca dentro de la clase de las γ proteobacterias la presencia de miembros de la familia *Enterobacteriácea* y *Pseudomonadales* con una mayor diversidad en la época de invierno respecto

a la de verano (Ver figuras 4 y 5). A nivel de especies, en este grupo bacteriano en las épocas de invierno y verano prevalecieron las cepas de *Acinetobacter johnsonii* (18% vs 30%) y *Kluyvera intermedia* (14% vs 42%).

Dicha presencia puede estar indicando problemas de contaminación de la leche por factores ambientales o de higiene, así como la influencia de situaciones como la variación estacional (el aumento de temperatura incrementa la multiplicación de proteobacterias psicotrofas, entre ellas los miembros de la familia *Pseudomonadales*), las prácticas de higiene, la contaminación de los equipos de ordeño, entre otros factores [44, 50].

De igual forma, dentro de las γ proteobacterias se observó la presencia de bacterias potencialmente patógenas para los humanos, aunque en una baja proporción si se considera que se trata de una leche cruda que debe sufrir ulteriormente un proceso de pasteurización, por lo que no representaría un riesgo alto para la salud de los consumidores. Entre las especies detectadas resaltan miembros de los géneros *Acinetobacter*, *Aeromonas* y *Klebsiella* (Ver figuras 4 y 5) La presencia de estas especies bacterianas, generalmente asociadas con la contaminación del agua y de la leche por contacto con la tierra, pueden incidir en la transmisión de infecciones alimentarias si la leche se consume cruda sin ningún tipo de procedimiento térmico de pasteurización, y además, pudieran ocasionar problemas de alteración de las propiedades organolépticas de la leche durante el almacenamiento de la leche, haciendo necesario que se advierta a los productores y responsables del centro de acopio, lo importante de implementar programas de limpieza y saneamiento, así como un control exhaustivo en la temperatura de refrigeración de la leche al momento de ser almacenada, además de realizar campañas para que este tipo de producto no sea dispensado a la población sin la debida pasteurización [1, 4, 5, 8].

Otra de las especies bacterianas detectadas en el análisis metagenómico de la leche cruda de Mocha, fue la especie del grupo de las terrabacterias *Streptococcus parauberis*, que se han relacionado con las infecciones como la mastitis en el ganado vacuno y que se observaron en mayor cantidad durante la época de invierno (Ver figuras 2 y 3).

Diversos autores han resaltado la utilidad de los análisis metagenómicos en la detección temprana de infecciones mastíticas en el ganado lechero, cuando hay una preponderancia en la microbiota bacteriana de la leche de bacterias de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* y de las especies de la familia de las *Enterobacteriaceae*, se deben tomar medidas sanitarias, ya que además de poner en riesgo la calidad de la leche, se afecta la salud del rebaño [3, 9, 51-54].

Hoque y colaboradores en un estudio realizado en Bangladesh durante el año 2019 [55], analizaron la asociación entre la diversidad del microbioma y la mastitis bovina, comparando el microbioma de la mastitis clínica y las muestras de leche sana a través de la secuenciación del metagenoma completo. Se identificó 363 y 146 cepas bacterianas en muestras de leche mastítica y sana respectivamente y se detectó 356 y 251 géneros bacterianos respectivamente con prevalencia de las especies de *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*, indicando que podría ser una característica de las leches mastíticas la pérdida de biodiversidad.

Así mismo, en otro estudio realizado en Colombia en el año 2019, se analizó la leche mastítica por metagenómica, los perfiles filogenéticos revelaron cuatro filos dominantes: Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria y Bacteroidetes, detectándose alrededor de 394 géneros con abundancia variable donde *Pseudomonas* y *Acinetobacter* fueron los géneros predominantes, resultados totalmente diferentes a lo observado en la presente investigación [56].

Si bien no se han encontrado estudios metagenómicos de la leche cruda bovina de Ecuador, con los cuales se pueda hacer una comparación de las abundancias bacterianas y de la composición taxonómica de la misma, las diferencias con respecto a las condiciones climáticas y la altitud, la diferencia en las prácticas agrícolas, la alimentación del ganado y las prácticas

de higiene, así como las diversas fuentes de contaminación que pueden estar presentes, podrían explicar las diferencias en la estructura de la microbiota de la leche cruda recolectada en el centro de acopio de Mocha, con respecto a las indicadas por autores de otras partes del mundo [39, 40, 42, 44, 47, 49, 51, 57, 58].

3.2. Análisis de los índices de biodiversidad bacteriana presente en la leche cruda

A fin de cuantificar la biodiversidad bacteriana, se determinaron los índices de riqueza específica y el índice de diversidad de Margalef. Los resultados de estas determinaciones se indican en la tabla 3.

Tabla 3. Índices de biodiversidad de la leche cruda recolectada en época de verano e invierno del centro de acopio de Mocha. Tungurahua. Ecuador.

Índice de biodiversidad	Muestra en verano	Muestra en invierno
Riqueza específica	92	116
Índice de diversidad de Margalef	8,22	10,41
Nº total de bacterias encontradas	72470	68539

Los índices de biodiversidad, evidencian que la época de invierno fue donde se encontró la mayor riqueza y biodiversidad de especies bacterianas en comparación con la época de verano, aunque el número de bacterias es mayor en época verano respecto a la de invierno, lo que se pueden explicar por el efecto de la temperatura en la velocidad del crecimiento de las bacterias, así como en el tipo de manejo que se le da al ganado en las épocas de lluvia y en las épocas de verano.

Los índices de biodiversidad se han utilizado muy pocos en la cuantificación de la biodiversidad bacteriana presente en muestras de leche cruda bovina en las diferentes estaciones del año. Se ha aplicado generalmente en estudios que comparan la biodiversidad de la leche producidas en diferentes zonas de un país [10].

Los valores en los índices de biodiversidad ratifican los resultados que se han obtenido en el análisis metagenómico desde el punto de vista estadístico y señalan diferencias en cuanto a la diversidad bacteriana en las épocas de invierno y verano evaluadas.

4. CONCLUSIONES

El estudio metagenómico reveló una microbiota bacteriana característica de la leche de la zona de estudio con predominio del grupo de las Terrabacterias, seguida de las Proteobacterias. Además de una gran abundancia de células bacterianas diferentes en ambas épocas, destacando la presencia del género *Lactococcus* en el verano como en el invierno.

Los índices de biodiversidad señalan diferencias entre la riqueza de especies en la época de invierno y verano, siendo mayor la diversidad bacteriana en la época de invierno, aunque el número de individuos de la población sea menor.

La presencia mayoritaria de especies del grupo de las bacterias lácticas en la leche cruda bovina de la zona estudiada es un indicativo de la buena calidad de la leche, y, además, abre las posibilidades de hacer estudios para conocer las bondades biotecnológicas y tecnológicas de estas cepas bacterianas en la producción de derivados lácteos con denominaciones de origen.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores dejan constancia que no existen ningún tipo de conflicto de intereses con la investigación realizada y los resultados obtenidos.

REFERENCIAS

1. A.M. Aguilera-Becerra, E. X. Urbano-Cáceres & C.P. Jaimes-Bernal. Bacterias patógenas en leche cruda: problema de salud pública e inocuidad alimentaria. *Ciencia y Agricultura*, **11**(2), 83–93 (2014). Doi: <https://doi.org/10.19053/01228420.3860>
2. M.J. Santolaya-Hernández. *Ánálisis microbiológico y físico-químico de la leche*. Tesis de Maestría. Centro de estudios de postgrados, Universidad de Jaén, Jaén, España, 2018; 81 p. URL: <https://crea.ujaen.es/items/f5a63706-00d6-45d4-a86b-c60acb6a5bb5>
3. R.I.Z.A. Durmaz. Comparison of milk microbiota between healthy and mastitic cows. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, **48**(1), 17–32 (2024). Doi: <https://doi.org/10.55730/1300-0128.4333>
4. D.A. Agurto-Granda. *Ánálisis de la microbiota asociada a la leche cruda para la toma de decisiones sobre buenas prácticas de manejo en actividades de acopio a gran escala*. Tesis de Maestría. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja, Ecuador, 2020; 45 p. URL: <https://dspace.utpl.edu.ec/handle/20.500.11962/27072>
5. N.H. Martin, R.L. Evanowski & M. Wiedmann. *Invited review: Redefining raw milk quality—Evaluation of raw milk microbiological parameters to ensure high-quality processed dairy products*. *Journal of Dairy Science*, **106**(3), 1502–1517 (2023). Doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22416>
6. E. Parente, A. Ricciardi & T. Zotta. The microbiota of dairy milk: A review. *International Dairy Journal*, **107**, 104714 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104714>
7. S. Ryu, W.S. Park, B. Yun, M. Shin, G.W Go, J.N. Kim & Y. Kim. Diversity and characteristics of raw milk microbiota from Korean dairy farms using metagenomic and culturomic analysis. *Food Control*, **127**, 108160 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108160>
8. A. J. Ouamba, M. Gagnon, G. LaPointe, P.Y. Chouinard & D. Roy. *Graduate Student Literature Review: Farm management practices: Potential microbial sources that determine the microbiota of raw bovine milk*. *Journal of Dairy Science*, **105**(9), 7276–7287 (2022). Doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21758>
9. A.P. Palii, Y.S. Ulko, O.O Bogomolov, L.V. Kis-Korkishchenko, M.D. Kambur, A.A. Zamaziy & A.P. Paliy. Species composition of microbiota of cow's udder and raw milk quality at mastitis. *Ukrainian Journal of Ecology*, **10**(4), 78–85 (2020). URL: <https://www.ujecology.com/articles/species-composition-of-microbiota-of-cows-udder-and-raw-milk-quality-at-mastitis.pdf>
10. X. Guo, Z. Yu, F. Zhao, Z. Sun, L.Y. Kwok & S. Li. Both sampling seasonality and geographic origin contribute significantly to variations in raw milk microbiota, but sampling seasonality is the more determining factor. *Journal of Dairy Science*, **104**(10), 10609–10627 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20480>
11. R.C. Reuben, P.C. Roy, S.L. Sarkar, A.R.U. Alam & I.K. Jahid. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties. *Journal of Dairy Science*, **103**(2), 1223–1237 (2020). Doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17092>
12. W. Zhang, S. Lai, Z. Zhou, J. Yang, H. Liu, Z. Zhong & G. Peng. Screening and evaluation of lactic acid bacteria with probiotic potential from local Holstein raw milk. *Frontiers in Microbiology*, **13**, 918774 (2022). Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.918774>
13. D. Zhang, J. Palmer, K.H. Teh & S. Flint. Identification and selection of heat-stable protease and lipase-producing psychrotrophic bacteria from fresh and chilled raw milk during up to five days storage. *LWT*, **134**, 110165 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110165>

14. D.S. Kocabas, J. Lyne & Z. Ustunol. Hydrolytic enzymes in the dairy industry: Applications, market, and future perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, **119**, 467–475 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.12.013>
 15. L. Bettera, A. Levante, E. Bancalari, B. Bottari & M. Gatti. Lactic acid bacteria in cow raw milk for cheese production: Which and how many? *Frontiers in Microbiology*, **13**, 1092224 (2023). Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1092224>
 16. D. Guevara-Freire, M. Montero-Recalde, A. Rodríguez, L. Valle, D. Avilés-Esquivel. Calidad de leche acopiada de pequeñas ganaderías de Cotopaxi, Ecuador. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, **30**(1), 247–255 (2019). URL: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v30n1/a25v30n1.pdf>
 17. M.G. Buste-Sabando & G.M. López-Vera. *Mejoramiento de la calidad higiénico-sanitaria de la leche de los sistemas bovinos del cantón el Carmen*. Tesis de pregrado. Escuela Superior Politécnica de Manabí, Manabí, Ecuador, 2019. URL: <https://repositorio.espm.edu.ec/handle/42000/1130>
 18. R. Contero, N. Requelme, C. Cachipuendo & D. Acurio. Calidad de la leche cruda y sistema de pago por calidad en el Ecuador. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*, **33**(1), 31–43 (2021). Doi: <https://doi.org/10.17163/lgr.n33.2021.03>
 19. A. Salguero, D. De la Torre, B. Puga-Torres. Calidad de leche cruda de pequeños productores de los cantones Cayambe y Pedro Moncayo, Ecuador, mediante análisis fisicoquímicos y ensayos cuantitativos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, **34**(1), e24611 (2023). Doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v34i1.24611>
 20. E.M.T. Valencia & J.G.O. Tejedor. Análisis bacteriológico de leche cruda expendida en Tarqui-Ecuador. *Anatomía Digital*, **6**(3), 116–1431 (2023). Doi: <https://doi.org/10.33262/anatomiadigital.v6i3.2619>
 21. S.M.Y. Asanza, J.D.M. Castillo, C.E.S. Calderón, S.G.M. Loaiza, A.R.F. Acosta & L.E. Zuñiga-Moreno. Identificación de Bacterias Gram positivas en muestras de leche cruda, obtenida por ordeño manual. *Revista Alfa*, **8**(22), 69–83 (2024). URL: <https://www.revistaalfa.org/index.php/revisaalfa/article/view/332/813>
 22. E.V. Doll, L. Staib, C. Huptas, S. Scherer & M. Wenning. *Facklamia lactis* sp. nov., isolated from raw milk. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **71**(7), 004869 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004869>
 23. T. Zotta, A. Ricciardi, N. Condelli & E. Parente. Metataxonomic and metagenomic approaches for the study of undefined strain starters for cheese manufacture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **62**(14), 3898–3912 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1870927>
 24. Servicio Ecuatoriano de Normalización (INEN). *Norma Técnica Ecuatoriana. Control Microbiológico de los Alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico*. NTE INEN 1529-2, 2013. Quito, Ecuador.
 25. M.J. Cox, W.O. Cookson & M.F. Moffatt. Sequencing the human microbiome in health and disease. *Human Molecular Genetics*, **22**, R88–R94 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt398>
 26. F. Valenzuela-González, R. Casillas-Hernández, E. Villalpando & F. Vargas-Albores. The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities. *Ciencias Marinas*, **41**(4), 297–313 (2015). Doi: <https://doi.org/10.7773/cm.v41i4.2492>
 27. A. Klindworth, E. Pruesse, T. Schweer, J. Peplies, C. Quast, M. Horn & F. Olive. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, **41**(1), e1 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
 28. D.P.R. Herlemann, M. Labrenz, K. Juergens, S. Bertilsson, J.J. Waniek & A.F. Anderrson. Transition in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *The ISME Journal*, **5**(10), 1571–1579 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.41>
 29. N. Corcoll, T. Osterlund, L. Sinclair, A. Eiler, E. Kristiansson, T. Backhaus & K. Eriksson. Comparison of four DNA extraction methods for comprehensive assessment of 16S rRNA bacterial diversity in marine biofilms using high-throughput sequencing. *FEMS Microbiology Letters*, **364**(14), fnx139 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx139>
 30. M. Laserna & M. Claesson. *Library generation through ribosomal RNA 16S genes amplification for determining microbiota composition*. Laboratory Medicine at a glance. School of Microbiology and APC
-

- Microbiome Institute, University College Cork, Cork, Ireland. 2016; pp. 9–13. URL: https://www.researchgate.net/publication/311982398_Creacion_de_librerias_mediante_amplificacion_del_ARN_ribosomal_16S_para_la_caracterizacion_de_la_microbiota_Library_generation_through_16S_ribosomal_RNA_gene_amplification_for_determining_microbiota_c
31. N. Saitou & M. Nei. The Neighbor-Joining method: a new method of reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**(4), 406–425 (1987). Doi: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
 32. J. Felsenstein. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**(4), 783–791 (1985). Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
 33. National Center for Biotechnology Information. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Consultado en febrero de 2023.
 34. G. Halffter (Compliador). *La biodiversidad biológica de Iberoamérica I*. CYTED-B: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Instituto de Ecología, A.C. Secretaría de Desarrollo Social, Xalapa, México, 1992; 204 p. URL: https://rds.org.co/apc-aa-fiches/ba03645a7c069b5ed406f13122a61c07/diversidad_biológica_iberoamerica.pdf
 35. A. Magurran. *Ecological diversity and its measurement*. Princeton University Press, New Jersey, USA, 1988.
 36. P. Cremonesi, C. Ceccarani, G. Curone, M. Severgnini, C. Pollera, V. Bronzo, F. Riva, M.F. Addis, J. Filipe & M. Amadori. Milk microbiome diversity and bacterial group prevalence in a comparison between healthy Holstein Friesian and Rendena cows. *PloS One*, **13**(10), e0205054 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205054>
 37. B. Hornik, J. Czarny, J. Staninska-Pięta, L. Wolko, P. Cyplik & A. Piotrowska-Cyplik. The raw milk microbiota from semi-subsistence farms characteristics by NGS analysis method. *Molecules*, **26**(16), 5029 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26165029>
 38. M.P. Doyle, F. Diez-González & C. Hill. *Food microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 5th ed. ASM Books, Washington, USA, 2019.
 39. M.E. Kable, Y. Srisengfa, M. Laird, J. Zaragoza, J. McLeod, J. Heidenreich & M.L. Marco. The core and seasonal microbiota of raw bovine milk in tanker trucks and the impact of transfer to a milk processing facility. *mBio*, **7**(4), e00836-16 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1128/mbio.00836-16>
 40. A. Morillo. *Microbiota de la leche cruda en el Estado Mérida*. Tesis de Maestría. Postgrado de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela, 2014.
 41. I.S. Kim, Y.K. Hur, E.J. Kim, Y.T. Ahn, J.G. Kim, Y.J. Choi & C.S. Huh. Comparative analysis of the microbial communities in raw milk produced in different regions of Korea, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, **30**(11), 1643–1650 (2017). URL: <https://doi.org/10.5713/ajas.17.0689>
 42. N. Li, Y. Wang, C. You, J. Ren, W. Chen, H. Zheng & Z. Liu. Variation in raw milk microbiota throughout 12 months and the impact of weather conditions. *Scientific Reports*, **8**(1), 2371 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20862-8>
 43. M. Yap, O. O'Sullivan, P.W. O'Toole, J.J. Sheehan, M.A. Fenelon & P.D. Cotter. Seasonal and geographical impact on the Irish raw milk microbiota correlates with chemical composition and climatic variables. *mSystems*, **9**, e01290-23 (2024). Doi: <https://doi.org/10.1128/msystems.01290-23>
 44. S.B. Skeie, M. Håland, I.M. Thorsen, J. Narvhus & D. Porcellato. Bulk tank raw milk microbiota differs within and between farms: A moving goalpost challenging quality control. *Journal of Dairy Science*, **102**(3), 1959–1971 (2019). Doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14083>
 45. L. Quigley, O. O'Sullivan, T.P. Beresford, R.P. Ross, G.F. Fitzgerald & P.D. Cotter. Molecular approaches to analyzing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, **150**(2-3), 81–94 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.001>
 46. M. Addis, A. Tanca, S. Uzzau, G. Oikonomou, R. Bicalho & P. Moroni. The bovine milk microbiota: Insights and perspectives from-omics studies. *Molecular BioSystems*, **12**(8), 2359 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1039/C6MB00217J>
 47. W. Chen, J. Mi, N. Lv, J. Gao, J. Cheng, R. Wu, J. Ma, T. Lan & X. Liao. Lactation stage-dependency of the sow milk microbiota. *Frontiers in Microbiology*, **9**, 945 (2018). Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00945>

48. D. Porcellato, M. Aspholm, S.B. Skeie, M. Monshaugen, J. Brendehaug & H. Mellegård. Microbial diversity of consumption milk during processing and storage. *International Journal of Food Microbiology*, **266**, 21–30 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.004>
49. G. Oikonomou, M.F. Addis, C. Chassard, M.E.F. Nader-Macias, I. Grant, C. Delbès & S. Even. Milk microbiota: What are we exactly talking about? *Frontiers in Microbiology*, **11**, 60 (2020). Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00060>
50. V. Ntuli, P.M.K. Njage & E.M. Buys. Characterization of *Escherichia coli* and other *Enterobacteriaceae* in producer-distributor bulk milk. *Journal of Dairy Science*, **99**(12), 9534–9549 (2016). Doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11403>
51. G. Oikonomou, V.S. Machado, C. Santisteban, Y.H. Schukken & R.C. Bicalho. Microbial diversity of bovine mastitic milk as described by pyrosequencing of metagenomic 16S rDNA. *PLoS One*, **7**(10), e47671 (2012). Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047671>
52. G. Oikonomou, M.L. Bicalho, E. Meira, R.E. Rossi, C. Foditsch, V.S. Machado, A.G.V. Teixeira, C. Santisteban, Y.H. Schukken & R.C. Bicalho. Microbiota of cow's milk; distinguishing healthy, sub-clinically and clinically diseased quarters. *PLoS One*, **9**(1), e85904 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085904>
53. H. Derakhshani, K.B. Fehr, S. Sepehri, D. Francoz, J. De Buck, H.W. Barkema, J.C. Plaizier & E. Khafipour. *Invited review*: Microbiota of the bovine udder: Contributing factors and potential implications for udder health and mastitis susceptibility. *Journal of Dairy Science*, **101**(12), 10605–10625 (2018). Doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14860>
54. S.A. Metzger, L.L. Hernández, S.G. Garret, L. Pamela & P.L. Ruegg. Understanding the milk microbiota. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, **34**(3), 427–438 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2018.06.003>
55. M.N. Hoque, A. Istiaq, R.A. Clement, M. Sultana, K.A. Crandall, A.Z. Siddiki & M.A. Hossain. Metagenomic deep sequencing reveals association of microbiome signature with functional biases in bovine mastitis. *Scientific Reports*, **9**(1), 13536 (2019). URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49468-4>
56. M.Y. Coronado-Vélez. *Microbiota de la leche cruda de bovinos infectados con mastitis subclínica analizados mediante secuenciación del gen 16S rRNA*. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Colombia, 2019; 35 p. URL: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/76685>
57. F. Breitenwieser, E.V. Doll, T. Clavel, S. Scherer & M. Wenning. Complementary use of cultivation and high-throughput amplicon sequencing reveals high biodiversity within raw milk microbiota, *Frontiers in Microbiology*, **11**, 549577 (2020). Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01557>
58. O. Nikoloudaki, W.J. Lemos Junior, L. Borruso, S. Campanaro, M. De Angelis, R.F. Vogel & M. Gobbetti. How multiple farming conditions correlate with the composition of the raw cow's milk lactic microbiome. *Environmental Microbiology*, **23**(3), 1702–1716 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15407>

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

A.K. Albuja-Landi, P. Arguello-Hernández, S. Escobar-Arrieta, V. Cando-Brito, J. Araque & F. Andueza. Microbiota bacteriana de la leche cruda bovina almacenada en un centro de acopio. *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **54**(1), 113–130 (2025). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciq-uifa.v54n1.114032>
