

Microbiological identification from foods of vegetable origin and the evolution during the processing

Identificación microbiológica a partir de alimentos de origen vegetal y su evolución durante el procesado

M. Clemente-Carazo^{1*}, P.S. Fernández¹, P.M. Periago¹

¹ Departamento de Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena (ETSIA), Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena, Spain.

*martaclementecarazo@gmail.com

Abstract

Due to the evolution of the agri-food industry and its great advances, food safety is considered one of its main priorities. The need to ensure safety and preserve quality attributes (nutritional and sensory) have led to the need for increasingly sophisticated tools to produce food efficiently and in high quantities. This is a challenge to ensure microbiological stability by maintaining very standards of quality. The objective of this work has been through the use of the Polymerase Chain Reaction to rule out the presence of pathogenic microorganisms such as *Bacillus Cereus*.

Keywords: 16S; *Bacillus Spp.*; soups.

Resumen

Debido a la evolución de la industria agroalimentaria y a los grandes avances de ésta, la seguridad alimentaria se considera como una de las principales prioridades. La necesidad de garantizar seguridad y preservar los atributos de calidad (nutricionales y sensoriales) han derivado en la necesidad de contar con herramientas cada vez más sofisticadas para producir alimentos de manera eficiente y en elevadas cantidades. Ello supone un reto para garantizar la estabilidad microbiológica manteniendo estándares muy elevados de calidad. El objetivo de este trabajo ha sido a través del uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa descartar la presencia de microorganismos patógenos como es el caso de *Bacillus Cereus*.

Palabras clave: 16S; *Bacillus Spp.*; sopas.

1. INTRODUCCIÓN

El consumo de frutas y verduras se ha visto incrementado por el consumidor, debido a su gran potencial de compuestos antioxidantes, a lo largo de los últimos años [1].

Las industrias alimentarias han ido evolucionando a largo de los años, los estándares de seguridad y calidad alimentaria son los más importantes. Por lo que la industria alimentaria se ha visto obligada a realizar cambios importantes a nivel económico, que han hecho que no fuera tan fácil la puesta en marcha de equipos sofisticados, que hacen posible y fundamental la estabilidad microbiológica de los alimentos.

Es importante para el consumidor confiar en la inocuidad e integridad de los alimentos [2], así como también es de gran valor la adecuada manipulación del producto, en cada etapa, “del campo a la mesa” [3]. Por lo que es de vital importancia para la industria agroalimentaria conocer en cada momento, el producto que esté utilizando, en el caso del presente trabajo, productos de origen vegetal, el microorganismo al que se puede enfrentar, para que de esta manera se impida su aparición.

El objetivo de este trabajo es el siguiente: Identificar microorganismos aislados de productos de origen vegetal mediante técnicas moleculares (a partir de la secuenciación del ADN). Existen diferentes técnicas de identificación, pero las técnicas más fiables hoy en día son las moleculares. Estas son capaces a través de la secuenciación del ADN de averiguar qué microorganismo es al que nos estamos enfrentando. La más utilizada, es la Reacción en Cadena de la Polimerasa, más conocida como PCR.

Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia de interés, los productos de PCR o también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción ha tenido éxito, esta técnica se conoce como electroforesis [4].

El ARN ribosómico 16S es la macromolécula más conocida para estudios de filogenia y taxonomía bacteriana. Ha dado lugar al sistema de clasificación vigente, así como también a la identificación rápida y precisa de las bacterias. La amplificación del gen, para su posterior secuenciación, parte preferentemente de ADN extraído de un cultivo puro de la bacteria, aunque también puede utilizarse directamente de una muestra clínica. Esto último ha conducido al descubrimiento de nuevos agentes patógenos [5].

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Producto

Se adquirieron 10 envases (10 litros) de un producto a base de hortalizas de baja acidez, contenía patata y zanahoria.

2.2 Cultivo y aislamiento de colonias

Se inoculó 1 mL de la muestra de cada producto en una placa Petri y se vertió medio de cultivo de recuento de mesófilos totales, Plate Count Agar (PCA) (Scharlau Chemie SA, Barcelona, Spain). Las placas se incubaron en una estufa a 37°C durante 24 h. Con un asa de siembra estéril se cogieron colonias de cada placa Petri y se pusieron en un tubo de ensayo con 9 mL de medio líquido de caldo tripticasa de soja (TSB) (Scharlau Chemie SA, Barcelona, Spain) y se incubaron de nuevo a 37°C durante 24 h. De nuevo, con un asa de siembra se pasó del medio líquido a una placa de PCA, dejándolo incubar a 37°C durante 24 h para verificar su pureza. El medio líquido se llevó al Instituto de Biotecnología Vegetal (IBV) de la universidad Politécnica de Cartagena para realizar a las muestras la PCR.

2.3 Extracción y purificación del ADN

Tanto para la extracción como para la purificación del ADN se utilizaron dos Kit de Quiagen y se siguieron sus pertinentes protocolos, DNeasy PowerFood Microbial Kit y QUIAquick PCR Purification Kit respectivamente.

A continuación, se preparó una alícuota con los primers, reverse y forward y la enzima Taq polimerasa necesaria para la replicación del ADN molde. Y finalmente se cogieron 22 µL de la

mezcla anterior y 3 µL de cada muestra de ADN en eppendorf de PCR y se introdujeron en el termociclador programado para 40 ciclos.

Una vez finalizada la PCR se realizó la electroforesis para verificar que esta había funcionado y por tanto el ADN se había replicado.

3. RESULTADOS ESPERADOS

3.1 Evolución durante el procesado

Se ha comprobado que al ser un producto de baja acidez el número de colonias fue muy bajo durante los tres primeros días, pero conforme iba pasando el tiempo de incubación se observó un aumento del número de colonias en los 10L de producto. Esto probablemente sea debido al pH de este.

3.2. Secuenciación

Como se puede observar en la ilustración 2, el microorganismo pertenece al género de *Bacillus spp.* Si afinamos con la técnica del 16S podemos aproximarnos más a que género de *Bacillus* en concreto se refiere y observamos que hay una gran cantidad que se identifican con el microorganismo aislado al 99 %.

Ninguna de las cepas de *Bacillus* se considera patógena y el número de colonias en 1 mL demuestra es inferior a 1 UFC/100 mL en el producto de baja acidez por lo que no se considera riesgo alimentario.

Se han descrito casos que han provocado signos como vómitos asociados con niveles de *B. cereus* de 10³ UFC/g de alimento contaminado, se estima que la dosis infectiva mínima para ambos tipos de síndrome se encuentra aproximadamente entre 10⁵-10⁸ UFC/g de alimento consumido [6].

4. CONCLUSIONES

La técnica del 16S nos permite identificar al microorganismo que se ha aislado de la muestra en un corto plazo de tiempo de forma precisa, en este caso se ha identificado la especie del género *Bacillus* y descartar la presencia de *Bacillus cereus*, microorganismo patógeno.

5. AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos al departamento de Ingeniería de los Alimentos y del Equipamiento Agrícola por toda la ayuda prestada.

6. REFERENCIAS

[1] Motilva, M.-J., Macià, A., Romero, M.-P., Labrador, A., Domínguez, A., Peiró, L. 2014. Optimisation and validation of analytical methods for the simultaneous extraction of antioxidants: Application to the analysis of tomato sauces. Food Chem. 163: 234–243. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.096>

[2] OMS, F. 2003. Garantía de la inocuidad y calidad de los alimentos: directrices para el fortalecimiento de los sistemas nacionales de control de los alimentos.

[3]Beuchat, L.R. 1998. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw. Food Safety Unit. WHO. Report WHO/FSF/FOS/98.2.

[4] Tamay de Dios, L., Ibarra, C., Velasquillo, C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Medigraphic. 2: 70-78.

[5] Rodicio, M.R., Mendoza, M.C. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Enfermedades Infecc. Microbiol. Clínica 22: 238-245.

[6] Ward, P., Roy, D. 2005. Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria. Le Lait 85: 23-32.