

## **GUÍA DEL CURSO**

### **TÉCNICAS INDEPENDIENTES DE CULTIVO EN MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS (TICMA)**

En esta Guía se desarrollan los siguientes epígrafes:

- 1.-Introducción y Bienvenida
- 2.-Profesorado
- 3.-Objetivos
- 4.-Temario
- 5.-Bibliografía básica
- 6.-Metodología
- 7.-Recomendaciones para el Estudio
- 8.-Evaluación
- 9.-Cronograma

#### **1. Introducción y Bienvenida**

Estimado alumno/a:

Como responsable del curso “Técnicas Independientes de Cultivo en Microbiología de los Alimentos” (TICMA), te doy la bienvenida a la cuarta edición de este curso a distancia que se ofrece a través de la plataforma de Formación Continua On-Line de la Sociedad Española de Microbiología (SEM).

El curso está dirigido especialmente a estudiantes de doctorado y a profesionales de la industria relacionados con la Microbiología y la Tecnología de Alimentos que quieran familiarizarse con una serie de técnicas de reciente desarrollo que se utilizan para caracterizar la diversidad, composición y evolución de las poblaciones microbianas en diversos hábitats y se aplican cada vez con más profusión al análisis microbiológico de los alimentos.

La carga docente del curso es de 4 créditos distribuidos entre los días 3 de octubre y 23 de diciembre de 2016 ambos inclusive. El temario se ha preparado desde nuestra experiencia investigadora y la experiencia docente que conlleva haber realizado el curso de forma presencial durante tres convocatorias a lo largo de los últimos años. Espero que os resulte sencillo y ameno.

La lectura de esta guía os facilitará las tareas de aprendizaje y os proporcionará la información que precisáis sobre los objetivos del curso, la metodología de trabajo, la materia que se va a impartir, las actividades que debéis realizar, la programación temporal y la bibliografía básica que pueden consultar aquellos interesados en profundizar más en una materia concreta.

Durante el desarrollo del curso desearía que tuvieseis una participación lo más activa posible en el aula virtual, en la que espero recibir vuestros comentarios y preguntas sobre el temario, los contenidos, la estructura, etc. Puede ser interesante que al entrar por vez primera al aula hagáis una pequeña presentación de quiénes sois, de dónde sois, vuestra formación básica, por qué estáis interesados en este curso, qué es lo que esperáis del mismo, etc., y -si no tenéis mayores objeciones- personalicéis vuestro perfil con una fotografía para ir conociéndonos y poder reconocernos en el futuro.

Una vez más, bienvenidos al III curso virtual de “Técnicas Independientes de Cultivo en Microbiología de los Alimentos (TICMA)”, deseo que sea de vuestro interés y que podáis recomendarlo en el futuro a vuestros compañeros.

Un cordial saludo,

Baltasar Mayo

## **2. Profesorado**

El contacto que vais a tener durante el curso es solo conmigo. Sin embargo, aunque aparezca como responsable y gestor del curso, en la elaboración de los materiales (teoría y práctica) han participado activamente muchos de mis compañeros del IPLA. A continuación se relacionan de forma más precisa y por orden de lista las personas que han realizado los contenidos de las distintas Unidades Didácticas y confeccionado las preguntas de evaluación: Dr. Ángel Alegría González (Unidad

Didáctica 12), Dr. Miguel Ángel Álvarez González (Unidad Didáctica 6), Dra. Susana Delgado Palacio (Unidad Didáctica 8), Dra. María Fernández García (Unidad Didáctica 7), Dra. Ana Belén Flórez García (Unidad Didáctica 11), Drs. Noelia Martínez Álvarez y Abelardo Margolles Barros (Unidad Didáctica 4) y Dra. Beatriz Martínez Fernández (Unidad Didáctica 10). Mi más sincero agradecimiento a su generosidad presente y mi esperanza para seguir colaborando con ellos en la actualización y mejora de las materias que componen el curso.

¡Mucha suerte a todos los que emprendáis conmigo esta aventura de aprendizaje!

### Breve currículum

Soy Licenciado (1981), Licenciado de Grado (1982) y Doctor en Biología (1988) por la Universidad de Oviedo. Realicé mi Tesis Doctoral en el Área de Microbiología del Departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo



**Baltasar Mayo**  
Antoñán del Valle  
(Benavides de Órbigo, León)

entre los años 1985 y 1988 sobre el aislamiento y la caracterización de bacterias ácido-lácticas (BAL) procedentes del queso de Cabrales tradicional. Tras el doctorado, realicé una estancia postdoctoral de dos años en el Departamento de Genética de la Universidad de Groningen, Holanda, bajo la dirección de los doctores Gerard Venema y Jan Kok. En esta etapa trabajé en la caracterización genética del sistema proteolítico de *Lactococcus lactis*.

Tras una breve etapa como investigador postdoctoral en la Universidad de Oviedo, me incorporé en el año 1995 al Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). El IPLA es un Instituto del CSIC del Área de Ciencia y Tecnología de los Alimentos localizado en un hermoso entorno rural a las afueras de Villaviciosa (Asturias). Su dirección es: Paseo Río Linares, s/n, 33300-Villaviciosa, Asturias. Siempre que lo creáis conveniente, podéis contactar conmigo por teléfono (985893345) fax (985892233) o correo electrónico ([baltasar.mayo@ipla.csic.es](mailto:baltasar.mayo@ipla.csic.es)).

En el IPLA dirijo un pequeño grupo de investigación denominado “Cultivos Lácteos Funcionales”. Desde los inicios, la labor investigadora del grupo se ha centrado en la caracterización microbiana de diversos productos lácteos tradicionales (principalmente quesos), con especial dedicación a la identificación, selección y caracterización de microorganismos tecnológicamente relevantes que puedan utilizarse como fermentos o cultivos adjuntos. Desde hace unos años, trabajamos también en la caracterización microbiológica de diversas secciones del tracto gastrointestinal humano, con el objetivo de identificar y caracterizar lactobacilos y bifidobacterias de esas posiciones que se puedan utilizar como probióticos.

Además de la selección de cepas, estamos interesados también en la caracterización microbiana de los ecosistemas (del queso y del tracto gastrointestinal). Creemos que es importante conocer la diversidad y la evolución de las poblaciones de los distintos tipos microbianos en estos nichos ecológicos, puesto que este conocimiento posibilitará o facilitará el control y la modulación de las poblaciones beneficiosas, respecto de otras poblaciones indeseables. Para ahondar en esta caracterización, en el año 2001 realicé una estancia en el TNO Voeding (actualmente TNO Quality of Life), situado en Zeist, Holanda, para aprender las bases teóricas y el manejo práctico de varias técnicas microbiológicas independientes de cultivo como la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) y la FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization). De forma más reciente hemos introducido, no sin dificultades, técnicas genómicas y metagenómicas para la caracterización microbiana de los productos lácteos tradicionales o en el seguimiento de los microorganismos tecnológicamente relevantes durante las etapas de elaboración y maduración de estos productos. Como no podía ser de otra manera, también las hemos aplicado en los estudios de Microbiología gastrointestinal.

A lo largo de estos años he dirigido y participado en numerosos proyectos de investigación competitivos financiados por la EU, distintos planes nacionales gestionados por CICYT, INIA, MINECO, etc., el Principado de Asturias (FICYT), y otras entidades que han aportado la financiación necesaria para llevar a cabo nuestros estudios. Al mismo tiempo, hemos recibido financiación de empresas privadas nacionales y extranjeras a través de contratos de investigación y apoyo tecnológico. Los resultados de nuestras investigaciones se han publicado en artículos científicos en el campo de la Microbiología de Alimentos; fácilmente rastreables en distintas bases de

datos públicas como pueden ser Scopus (<http://www.scopus.com/>; Author ID 7003522906), PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) o ScienceDirect (<http://www.sciencedirect.com>). Hemos generado y transferido también varias patentes mediante las que hemos protegido cepas de BAL con propiedades únicas.

Pertezco a la Sociedad Española de Microbiología (SEM) desde el año 1986 y al Grupo Especializado de Microbiología de los Alimentos desde el año 2000; a la American Society for Microbiology (ASM) desde el año 2012; y desde este mismo año a la Sociedad Española de Biotecnología (SEBIOT). Formé parte de la Junta directiva del Grupo de Microbiología de los Alimentos entre los años 2008 y 2016.

### **3. Objetivos del curso**

En muchos nichos ecológicos un número indeterminado de especies microbianas interactúan y compiten por espacio y nutrientes. Las células se encuentran en condiciones fisiológicas y de viabilidad diversas, de tal forma que las técnicas de cultivo clásicas subestiman la diversidad y muchas veces no son capaces de cuantificar ni siquiera los grupos mayoritarios. Las dificultades de cultivo de un tipo microbiano concreto pueden deberse a diversas causas: necesidad de factores de crecimiento desconocidos, relación de dependencia con otros microbios del entorno, estar en estados fisiológicos no cultivables, etc. Para paliar las limitaciones del cultivo, se han desarrollado técnicas microbiológicas moleculares independientes de cultivo con las que se detectan y/o cuantifican, dependiendo de las técnicas, los microorganismos de un determinado ecosistema.

En los últimos años estos métodos se están aplicando profusamente en Microbiología de los Alimentos. Una de sus principales aplicaciones en este campo es el estudio y la caracterización de las fermentaciones alimentarias tradicionales. De esta forma, se identifican los componentes de la microbiota que dirigen los procesos, se estudia la dinámica de poblaciones a lo largo de los procesos de elaboración y maduración y se rastrean los genes clave para la colonización de los ecosistemas.

Los objetivos concretos del curso son:

- Conocer las bases teóricas de las nuevas metodologías microbiológicas independientes de cultivo (DGGE, construcción y análisis de genotecas, FISH, metagenómica, etc.).
- Saber los procedimientos que se requieren y reconocer los pasos de los protocolos.
- Conocer el equipamiento, los materiales y los reactivos necesarios de las distintas técnicas.
- Reconocer la aplicación de las distintas técnicas y métodos para utilizar, llegado el caso, la más apropiada para una muestra o un ecosistema.
- Conocer las ventajas y limitaciones de las distintas técnicas y en qué casos resulta adecuada la utilización de cada una de ellas.
- Adquirir los conocimientos necesarios para realizar una lectura crítica de los resultados que se reportan en los artículos científicos con estas técnicas.

#### 4. Temario

El programa del curso consta de doce Unidades Didácticas. En la primera se hace una introducción general a la Microbiología de los Alimentos. La segunda revisa las técnicas microbiológicas convencionales de cultivo en medios selectivos y diferenciales. Tras una breve introducción a las técnicas microbiológicas independientes de cultivo en la tercera Unidad Didáctica, se repasa cada una de las técnicas en las unidades siguientes, explicando la metodología que cada una requiere, comenzando por uno de los pasos esenciales común a muchas de las técnicas: el aislamiento y la purificación de los ácidos nucleicos microbianos a partir de las matrices alimentarias.

- Unidad Didáctica 1.- Introducción a la Microbiología de los Alimentos
- Unidad Didáctica 2.- Análisis microbiológico de los alimentos: técnicas convencionales
- Unidad Didáctica 3.- Introducción a las técnicas microbiológicas cultivo-independientes

- Unidad Didáctica 4.- Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos.  
Hibridación de ácidos nucleicos
- Unidad Didáctica 5.- Hibridación fluorescente *in situ* (Fluorescent *in situ* hybridization, FISH)
- Unidad Didáctica 6.- Técnica de la PCR y amplificación de ácidos nucleicos
- Unidad Didáctica 7.- PCR-cuantitativa o PCR a tiempo real
- Unidad Didáctica 8.- Electroforesis en geles de gradiente desnaturalizantes (DGGE)
- Unidad Didáctica 9.- Otras técnicas electroforéticas (SSCP, LH-PCR, TFLP, RISA, ARISA, etc.). Técnicas independientes de cultivo no basadas en ácidos nucleicos
- Unidad Didáctica 10.- Hibridación de microarrays de ADN
- Unidad Didáctica 11.- Construcción de librerías génicas (genotecas)
- Unidad Didáctica 12.- Técnicas de secuenciación masiva (Next Generation Sequencing o NGS)

## 5. Bibliografía básica

El curso se puede seguir exclusivamente por los apuntes del aula virtual, pero se recomienda leer alguna de las revisiones que distintos aspectos del temario aparecen relacionadas a continuación. Se recomienda también ojear los artículos seminales de la aplicación de alguna técnica en particular a la Microbiología de Alimentos que se colgarán asimismo en el aula virtual.

### Revisiones:

**Ercolini, D.** 2013. High-throughput sequencing and metagenomics: moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**: 3148-55.

**Cocolin, L., Alessandria, V., Dolci, P., Gorra, R., and Rantsiou. K.** 2013. Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **167**: 29-43.



- Justé, A., B. P. Thomma, y B. Lievens.** 2008. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiol.* **25**: 745-761.
- Quigley, L., O. O'Sullivan, T. P. Beresford, R. P. Ross, G. F. Fitzgerald, y P. D. Cotter.** 2011. Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 150:81-94.

Primera aplicación de técnicas en Microbiología de los Alimentos:

- Ampe, F., N. ben Omar, C. Moizan, C. Wachter, y J.-P. Guyot.** 1999. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5464-5473.
- Cocolin, L., D. Aggio, M. Manzano, C. Cantoni, y G. Comi.** 2002. An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. *Int. Dairy J.* **12**:407-411.
- Duthoit, F., J.-J. Godon y M. C. Montel.** 2003. Bacterial community dynamics during production of registered designation of origin Salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene and single-strand conformation polymorphism analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:3840-3848.
- Ercolini, D., P. J. Hill, y C. E. R. Dodd.** 2002. Development of a fluorescence *in situ* hybridization method for cheese. *J. Microbiol. Methods* **52**: 267-271.
- Escalante, A., C. Wachter y A. Farrés.** 2001. Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol by 16S rDNA sequence analysis. *Int. Dairy J.* **64**:21-31.
- Humblot, C., y Guyot, J. P.** 2009. Pyrosequencing of tagged 16S rRNA gene amplicons for rapid deciphering of the microbiomes of fermented foods such as pearl millet slurries. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 4354-4361.
- Ogier, J.-C., O. Son, A. Gruss, P. Tailliez, y A. Delacroix-Buchet.** 2002. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3691-3701.
- Randazzo, C. L., S. Torriani, A. D. L. Akkermans, W. M. de Vos, y E. E. Vaughan.** 2002. Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production



of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1882-1892.

## **6. Metodología**

La única herramienta metodológica disponible será el aula virtual proporcionada por la SEM a través de la plataforma Moodle. Toda la documentación se irá colgando progresivamente en el aula del curso.

## **7. Recomendaciones para el Estudio**

Se recomienda una vez estudiada la Unidad correspondiente, anotar las ideas claves y hacer un pequeño resumen de la misma.

Utilizar la plataforma virtual para formular preguntas, dudas y comentarios que puedan plantearse durante el curso.

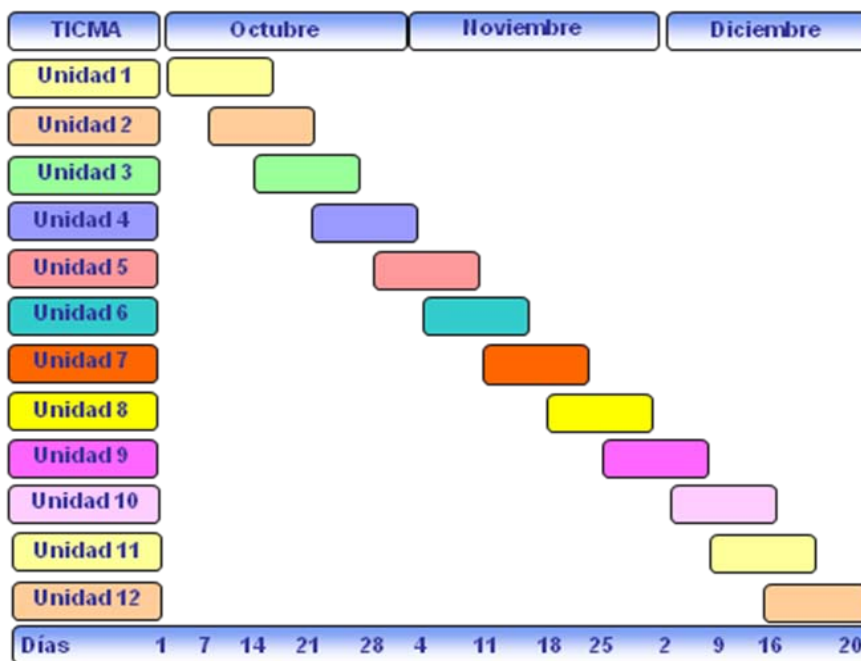
Se considera que con aproximadamente 4-5 horas de dedicación semanal es suficiente para poder superar sin ninguna dificultad este curso.

## **8. Evaluación**

Después de cada Unidad Didáctica los alumnos realizarán un examen de tipo test para su evaluación continuada. Las preguntas del examen tendrán cuatro respuestas posibles, de las cuales solo una será correcta. El tiempo disponible para responder a las cuestiones de cada examen vendrá definido al comienzo del mismo y sólo se podrá realizar un intento. Tened en cuenta que es posible el cambio de la respuesta de una pregunta hasta que se cierre el examen, pero cada cambio lleva asociada una pequeña penalización (0.2). Los exámenes de cada Unidad estarán habilitados durante un periodo de tiempo concreto que se especificará convenientemente, pasado el cual no se podrá acceder a ellos.

## 9. Cronograma

Cada Unidad Didáctica se irá habilitando secuencialmente, tal y como se detalla en el siguiente cronograma.



Se dispondrá de unos diez días para el estudio y para la realización de las actividades de evaluación de cada Unidad Didáctica. Transcurrido este tiempo, la documentación de las Unidades permanecerá habilitada hasta el final del Curso, pero no se podrá acceder a las actividades y los exámenes; por consiguiente, no serán consideradas para la evaluación.