



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

Estimad@ alumn@:

te doy la bienvenida a la XI edición del curso “**Técnicas Independientes de Cultivo en Microbiología de los Alimentos**” (TICMA) que se ofrece a distancia a través de la plataforma de Formación Continua On-Line de la Sociedad Española de Microbiología (SEM) (<http://formaciononline.semicrobiologia.org/>).

El curso está dirigido a estudiantes de los últimos cursos de los grados de ciencias (Biología, Biotecnología, Ciencia y Tecnología de Alimentos, Bioquímica, Farmacia, etc.), a los estudiantes de máter, doctorado o a los profesionales de la industria relacionados con la Microbiología y la Tecnología de Alimentos que quieran familiarizarse con una serie de técnicas, algunas de relativamente reciente desarrollo, de Ecología Microbiana Molecular que se utilizan para caracterizar la diversidad, estructura y sucesión de las poblaciones microbianas en diversos ecosistemas,



incluyendo los de las matrices alimentarias. Estas poblaciones pueden tener gran interés tecnológico o de seguridad alimentaria.

La carga docente del curso es de 4 créditos distribuidos entre los **días 2 de octubre y 31 de diciembre de 2023**. El temario se ha preparado desde la experiencia investigadora de los profesores/investigadores que han desarrollado los temas y la experiencia docente que conlleva haber realizado el curso de forma presencial durante tres convocatorias (2007, 2009 y 2011) antes de su impartición on-line. Espero que resulte sencillo, ameno y sobre todo útil en vuestro trabajo y/o investigaciones.

La lectura de esta **Guía** pretende facilitar las tareas de aprendizaje y os proporcionará la información que precisáis sobre los objetivos del curso, la metodología de trabajo, las materias que se imparten, las actividades que debéis realizar, la programación temporal y la bibliografía básica y complementaria que podéis consultar si estáis interesados en profundizar en un tema particular o en alguna técnica concreta.

Durante el desarrollo del curso desearía que tuvieseis una participación lo más activa posible a través del **Aula Virtual**, en la que espero recibir vuestros comentarios, sugerencias o preguntas sobre el temario, los contenidos, la estructura, etc., así como que me hagáis notar los fallos que, inevitablemente, puedan haber quedado en los textos. Puede ser interesante que al entrar por vez primera al **Aula** hagáis una pequeña presentación de quiénes sois, de dónde sois, qué formación básica tenéis, por qué estáis interesados en este curso, qué es lo que esperáis del mismo, etc. También podéis -si no tenéis mayores objeciones- personalizar vuestro perfil con una fotografía para ir conociéndonos y poder reconocernos en el futuro.

En este curso en el que vamos abandonando las incertidumbres de la pandemia y aproximándonos a la “nueva realidad”, las enseñanzas a distancia tendrán todavía una gran importancia. Deseo que la novena edición de **TICMA** sea de vuestro interés y sus enseñanzas resulten de utilidad en vuestra vida profesional.

Un cordial saludo,



Baltasar Mayo

2. Profesorado

Como responsable y gestor del curso, el contacto que vais a tener a lo largo de este tiempo será solo conmigo. Sin embargo, en la elaboración de los contenidos (teóricos y prácticos) han participado activamente la mayor parte de mis compañeros del Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC). A continuación, se relacionan de forma más precisa, y por orden de lista, las personas que han participado en la realización 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), Dres. Noelia Martínez Álvarez y Abelardo Margolles Barros (Unidad Didáctica 4) y Dra. Beatriz Martínez Fernández (Unidad Didáctica 10).



Baltasar Mayo

Mi más sincero agradecimiento a su generosidad y mi esperanza para que sigamos colaborando en la actualización y mejora de los contenidos y materias que componen el curso.

¡Mucha suerte a todos los que emprendéis 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 entre los años 1985 y 1988 sobre el aislamiento y la caracterización de bacterias ácido-lácticas (BAL) procedentes del queso de Cabrales tradicional elaborado



con leche cruda. 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 sobre la caracterización genética del sistema proteolítico de *Lactococcus lactis*, en la que conseguimos clonar y caracterizar varios genes de esta especie que codifican peptidasas.

Tras una breve etapa como investigador postdoctoral en la Universidad de Oviedo (1991-1993), me incorporé al IPLA en el año 1994. El IPLA es un Instituto del CSIC del Área de Ciencia y Tecnología de los Alimentos localizado en un hermoso entorno natural 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 correo electrónico (baltasar.mayo@ipla.csic.es) o por teléfono (985893345).

En la actualidad, soy Profesor de Investigación de OPIs en el IPLA-CSIC, donde dirijo un pequeño grupo de investigación denominado “Cultivos Lácteos Funcionales” 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 en las matrices lácteas. Desde hace años trabajamos también en la caracterización microbiológica de diversas secciones del tracto gastrointestinal humano (estómago, intestino, heces, etc.), con el objetivo de identificar y caracterizar lactobacilos, bifidobacterias y otros tipos bacterianos 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), puesto que pensamos que es importante conocer la diversidad y la sucesión de las poblaciones de los distintos tipos microbianos en estos nichos ecológicos y que este conocimiento posibilitará o facilitará el control y la modulación de las poblaciones beneficiosas y la eliminación o la inhibición, al menos, 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 DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) y FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization). De forma más reciente hemos introducido en nuestro grupo -no sin grandes dificultades- técnicas genómicas y metagenómicas para la caracterización microbiana de los productos lácteos tradicionales o para el seguimiento de los microorganismos tecnológicamente relevantes durante las etapas de elaboración y maduración. Como no podía ser de otra manera, estas técnicas se han aplicado también 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, el Principado de Asturias (FICYT) y otras entidades que han aportado la financiación necesaria para llevar a cabo nuestros estudios. Hemos recibido financiación también de empresas privadas nacionales y extranjeras a través de contratos de investigación y contratos de apoyo tecnológico. Los resultados de nuestras investigaciones se han publicado en diversos artículos científicos, principalmente en el campo de la Microbiología de Alimentos, que son fácilmente rastreables en distintas bases de datos públicas como Scopus (<http://www.scopus.com/>; Author ID 7003522906), PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) o ScienceDirect (<http://www.sciencedirect.com>). También hemos generado y transferido materiales biológicos (cepas de BAL y bifidobacterias, vectores plasmídicos, etc.), algunos protegidos por patente de invención, a empresas del sector productivo o a empresas biotecnológicas.

Pertenezco 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 el año 2017 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, y en la actualidad soy Tesorero electo de la Junta Directiva de SEBIOT. Desde el año 2012 formo parte como miembro experto del FEEDAP Panel de la Autoridad de Seguridad Alimentaria Europea (*European Food Safety Authority*, EFSA). Estoy en mi tercer mandato en el Panel (2018-2021, prorrogado hasta 2024) en el que actúo como Presidente (*Chair*) del Grupo de Trabajo en Microbiología. Este grupo evalúa todos los aspectos de seguridad



alimentaria de los microorganismos que se emplean como probióticos o como cepas productoras de aditivos alimentarios, incluyendo, en su caso, las modificaciones genéticas, en los productos regulados para animales que solicitan su salida al mercado o su renovación en la Unión Europea.

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 abordan 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:

- 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.
- De Filippis, F., E. Parente, y D. Ercolini.** 2107. Metagenomics insights into food fermentations. *Microb. Biotechnol.* **10**:91-102.
- Ferrocino, I., Rantsiou, K., Cocolin, L.** 2021. Investigating dairy microbiome: an opportunity to ensure quality, safety and typicity. *Curr. Opin. Biotechnol.* **73**:164-170. doi: 10.1016/j.copbio.2021.08.009.



- Tilocca, B., Costanzo, N., Morittu, V.M., Spina, A.A., Soggiu, A., Britti, D., Roncada, P., Piras, C.** 2020. Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. *Journal of Proteomics*. **210**:103534. doi: 10.1016/j.jprot.2019.103534.
- Yeluri Jonnala, B.R., McSweeney, P.L.H., Sheehan, J.J., Cotter, P.D.** 2018. Sequencing of the cheese microbiome and its relevance to industry. *Frontiers in Microbiology* **9**:1020. doi: 10.3389/fmicb.2018.01020.

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.
- Bokulich, N.A., Joseph, C.M., Allen, G., Benson, A.K., Mills, D.A.** 2012. Next-generation sequencing reveals significant bacterial diversity of botrytized wine. *PLoS One* **7**:e36357.
- 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.



- Jung, J.Y., Lee, S.H., Kim, J.M., Park, M.S., Bae, J.-I., Hahn, Y., Madsen, E.L., Jeon, C.O.** 2011. Metagenomic analysis of “kimchi”, a traditional Korean fermented food. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**:2264-2274.
- 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.
- Walsh, A.M., Macori, G., Kilcawley, K.N., Cotter, P.D.** 2020. Meta-analysis of cheese microbiomes highlights contributions to multiple aspects of quality. *Nature Food* **1**:500-510. Doi: 10.1038/s43016-020-0129-3.

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 el curso.

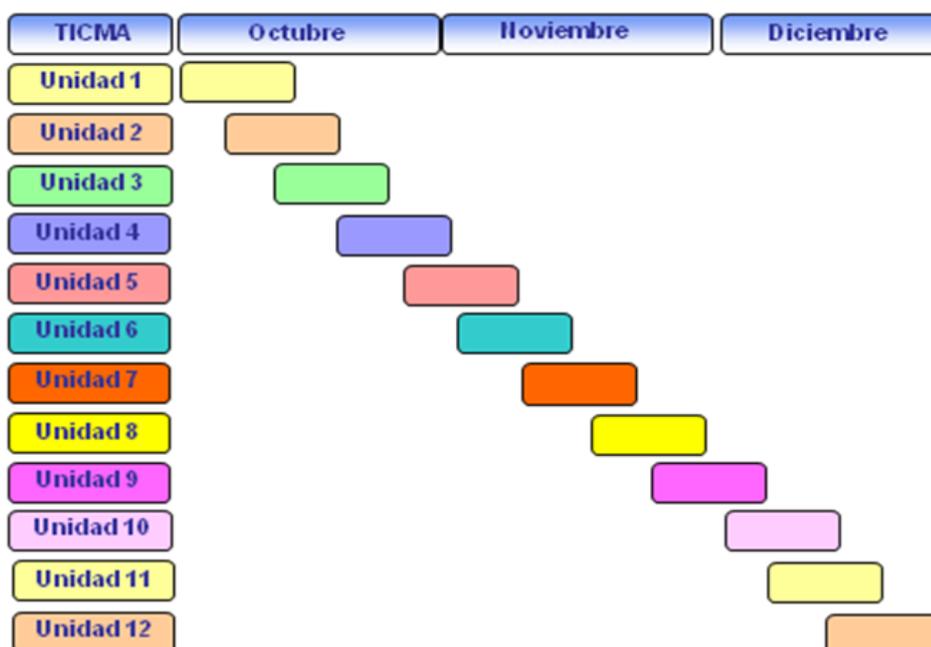
8. Evaluación



Después de cada Unidad Didáctica, los alumnos realizarán un examen de tipo test para una 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 puntos). 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, en lo que podamos tal y como se indica en el siguiente cronograma:



Se dispondrá de unos diez días para completar 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 final del Curso, pero no se



podrá acceder a las actividades ni a los exámenes, que, por tanto, tampoco se podrán realizar después de la fecha indicada.