

ANÁLISIS DE BRUCELLA Y SALMONELLA PRESENTES EN LA LECHE DE VACA, EMPLEANDO ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (FTIR).

Pérez Coyotl A.^{a,*}, González Quintero M.^a, Morales Maldonado M.^a, Castañeda Roldan E.^b, Delgado Macuil R.^a, Rojas López M.^a, Zaca Moran O.^a y Orduña Díaz A.^a

a Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (CIBA), IPN, C.P. 72197, Tlaxcala México.

b Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, San Manuel CP 72570 Puebla, Pue. México.

* lauygui0508@gmail.com

RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por alimentos, las cuales son causadas por la presencia de diversos microorganismos patógenos, han tenido repercusiones a la salud humana, así como en la industria alimentaria. Debido a esta razón se requieren estrategias prácticas para la determinación de la presencia de este tipo de contaminación en alimentos. Particularmente la leche de granja es uno de los alimentos que son más susceptibles de contaminarse si no se tienen las condiciones de higiene adecuadas para su manejo. En este trabajo se presenta un análisis de la leche de vaca proveniente de granja, la cual ha sido contaminada intencionalmente con los microorganismos patógenos Brúcela y Salmonella. El análisis de las muestras contaminadas se realizó empleando la técnica de espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier. Los espectros de absorción infrarroja muestran principalmente en las regiones espectrales correspondientes a los carbohidratos ($900-1100\text{ cm}^{-1}$) y las proteínas ($1500-1700\text{ cm}^{-1}$).

ABSTRACT

Diseases transmitted by food, which are caused by the presence of various pathogenic microorganisms, have had an impact to human health, as well as in the food industry. Because of this reason, practical strategies for determining the presence of this type of contamination in food are required. Particularly farm milk is one of the foods that are most likely to be contaminated if the hygiene conditions are not suitable for handling. This paper presents an analysis of cow milk from farm, which has been intentionally contaminated with the pathogenic microorganisms: Brussels and Salmonella. The analysis of the contaminated samples was carried out using Fourier transformed infrared spectroscopy technique. The infrared absorption spectra show mainly in spectral regions corresponding to carbohydrates ($900-1100\text{ cm}^{-1}$) and proteins ($1500-1700\text{ cm}^{-1}$).

Palabras clave: Alimentos, Microorganismos patógenos y espectroscopia FTIR.

Área: Lácteos

INTRODUCCIÓN

Los brotes de enfermedades de transmisión alimentaria han tenido consecuencias sanitarias y económicas importantes en países tanto desarrollados como en desarrollo [1]. Algunos patógenos que afectan a la salud humana, así como a la

industria alimentaria son: *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp.*, *Salmonella spp.*, *Brucella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella*, *Vibrio cholerae.*, *Tuberculosis*, *Yersinia*, *Streptococcus*, *Brucella*, etc. De manera particular, la brucelosis es una de las principales zoonosis a nivel mundial, es causada por coco-bacilos del género *Brucella*. El hombre puede contraer esta enfermedad de varias maneras, una de ellas es por el consumo de alimentos crudos. Otro microorganismo patógeno implicado en infecciones o intoxicaciones alimentarias es *Salmonella spp.* causante de septicemia, además existen más de 2300 serotipos que producen una infección intestinal conocida como salmonelosis. Los alimentos de mayor riesgo de contaminación por *Salmonella* son las carnes crudas, aves de corral, pescado, huevo, leche, productos lácteos, el agua, etc. [2].

Uno de los alimentos naturales más preciados es la leche y ha sido el componente básico de diversos alimentos humanos [3]. Se puede considerar que contiene tres componentes básicos: Agua, Grasa Sólidos no grasos (SNG). La materia orgánica de la porción no grasa consiste principalmente de las proteínas (caseína 80%, albúminas 5% y globulinas 12%), lactosa y ácidos láctico y cítrico. La leche y los productos lácteos que no se producen en las debidas condiciones de higiene pueden ser vulnerables a la contaminación por la presencia de estos microorganismos patógenos causando enfermedades en los seres humanos que los consumen. De acuerdo a la NOM185SSA1200, las medidas de higiene de la leche abarca, la aplicación de los métodos higiénicos apropiados en la producción, manipulación y elaboración de la leche y los productos lácteos, la pasteurización u otras formas de tratamiento térmico para destruir los gérmenes patógenos presente en la leche como son: *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp.*, *Salmonella spp.*, *Brucella spp.*

La espectroscopia vibracional es ampliamente utilizada desde hace varios años por los químicos inorgánicos por ser una técnica analítica instrumental, ya que debido al desarrollo de espectrómetros por transformada de Fourier (FTIR), cualquier muestra tiene algún tipo de espectro vibracional fácil de obtener, ya sea de muestras líquidas, gases, materiales orgánicos e inorgánicos así como sólidos o disoluciones [4]. En este trabajo se presenta un análisis de la leche de vaca en presencia de microorganismos patógenos como la *Brucella* y *Salmonella*, determinados por la técnica de espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron para el análisis, 2 microorganismos (*Salmonella spp.* y *Brucella spp.*)

Leche bronca proveniente de San Pablo del Monte Tlaxcala. La cual se compró un día antes y se mantuvo en refrigeración a 4°C.

Espectrómetro FTIR, marca Bruker, modelo Vertex 70, en la modalidad de muestreo por reflectancia total atenuada (ATR), con accesorios de la marca PIKE. El tiempo de adquisición de cada espectro fue de 120 segundos en la región media (MIR), para conocer mediante la generación de espectros, los posibles cambios estructurales debido a su composición y concentración a causa de la contaminación bacteriana.

METODOLOGÍA

La cepa de *Brucella* se obtuvo del banco de cepas del laboratorio de patogenicidad microbiana perteneciente al centro de investigación ICUAP. Las cepas de referencia de *Salmonella* fueron del banco del Centro de Investigación en ciencias microbiológicas - instituto de ciencias de la Universidad Autónoma de Puebla (CICM-ICUAP). La cepa del género *Brucella* se sembraron de forma masiva en cajas Petri con caldo *Brucella*-BUAP agregando agar al 2% con antibiótico nistatina 2mL x L., bacitracina 1mL x L y ácido nalidixico 1mL x L. Este procedimiento se realizó en una campana de flujo laminar nivel 2. Las placas previamente etiquetadas se metieron a incubar a 37°C, debido a que *Brucella abortus* requiere al menos 5% de CO₂ en la atmósfera para su crecimiento. Se incubaron para mantener esta condición o un mínimo de 48 horas. La cepa de *Salmonella* spp se sembró en medio LB de forma masiva, las placas y se incubaron a 37°C por 24 horas. Se utilizó formaldehído para inmovilizarla las cepas y así no correr ningún riesgo de contaminación en el manejo de las cepas, por lo que todo el crecimiento bacteriano se colocó en un tubo falcón con 5 ml de agua destilada con formaldehído al 5 % previamente esterilizado. Posteriormente se puso en agitación moderada por 48 horas con una temperatura de 20°C. A las muestras se les debe de eliminar cualquier residuo de formaldehído para que no se genere ninguna interferencia en los análisis posteriores por lo que después de las 48 horas de agitación los tubos se pondrán a centrifugar a 4800 rpm durante un tiempo de 30 minutos. El sedimento obtenido se lavará tres veces con agua destilada estéril y por último se centrifugará a 7500 rpm x 20 minutos, el sedimento obtenido se re suspenderá en agua destilada estéril. La densidad óptica obtenida para *Brucella abortus* s19 fue de 2.5 y *salmonella* de 2.4. Una vez aislada y obtenidas las bacterias, se inocularon intencionalmente en la leche bronca, a diferentes concentraciones, para su análisis, tabla 1 y 2.

Una vez realizada la contaminación intencional de leche con distintos volúmenes de las soluciones bacterianas, estas muestras se analizaron mediante espectroscopia FTIR.

Tabla 1. Contaminación intencional de brúcela en leche a diferentes proporciones.

Microorganismo	Numero de Muestra	Volumen de Bacterias (ml)	Volumen de leche bronca (ml)
<i>Brucella abortus</i> s19	B1	0.5	0.5
	B2	0.6	0.4
	B3	0.7	0.3
	B4	0.8	0.2
	B5	0.9	0.1

Tabla 2. Contaminación intencional de salmonela en la leche a diferentes proporciones.

Microorganismo	Numero de Muestra	Volumen de Bacterias (ml)	Volumen de leche bronca (ml)
	S1	0.5	0.5

Salmonella	S2	0.6	0.4
	S3	0.7	0.3
	S4	0.8	0.2
	S5	0.9	0.1

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primeramente se obtuvieron por separado los espectros FTIR de la leche bronca y de las bacterias, los cuales se muestran en la figura 1, observando la región correspondiente a los carbohidratos que se encuentra entre 900 y 1100 cm^{-1} , mientras que la región de las proteínas se encuentra entre 1500 y 1700 cm^{-1} , los picos característicos de los enlaces C-H se sitúan entre 2750 y 3100 cm^{-1} y finalmente la región correspondiente a las moléculas de agua entre 3100 a 3700 cm^{-1} .

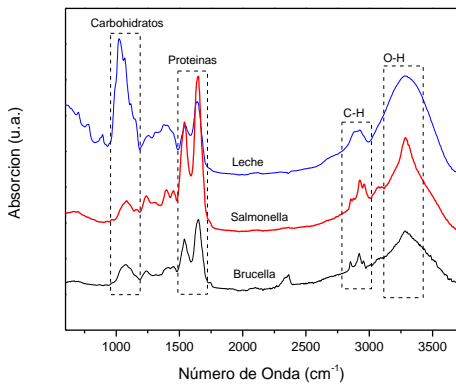


Figura 1. Espectros FTIR de la leche, salmonella y brúcela.

Se obtuvieron los espectros FTIR de las distintas muestras de leche contaminadas con brúcela, B1, B2, B3, B4, y B5, en los que se puede observar cambios en intensidad y forma de línea principalmente en la región que comprende la huella dactilar de 800 a 1700 cm^{-1} , (ver figura 2) y cambios considerables en la zona de los lípidos de 2800 a 3000 cm^{-1} , figura 3.

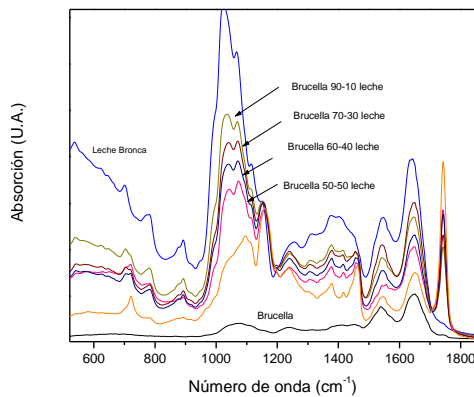


Figura 2. Espectro FTIR de la leche a diferentes concentraciones de brúcela, en la región de 600 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} .

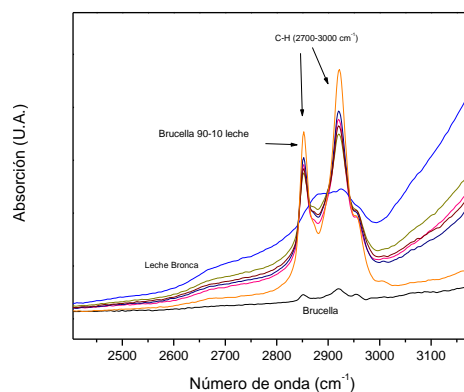


Figura 3. Espectros FTIR de la leche a diferente concentraciones de brúcela, de 2700 cm^{-1} a 3000 cm^{-1} .

Se realizó también, un análisis de los espectros FTIR de las muestras de leche contaminadas con salmonella, S1, S2, S3, S4 y S5. El análisis estuvo basado en el cambio en la forma de línea por la presencia de diferentes grupos funcionales que integran las distintas muestras de leche una vez contaminadas por salmonella. En la figura 4, se muestra también la región de la huella dactilar, dentro de los cambios que se observan, de manera específica podemos señalar la zona de las proteínas de 1500 a 1700 cm^{-1} , figura 5.

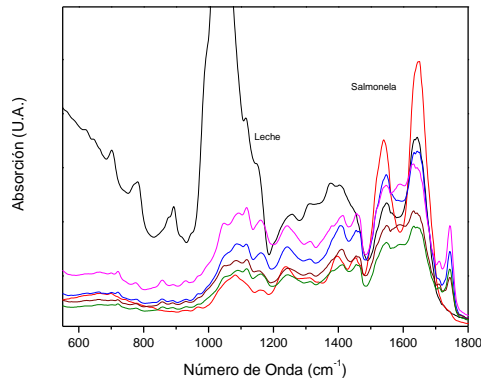


Figura 4. Espectro FTIR de la leche a diferentes concentraciones de salmonella.

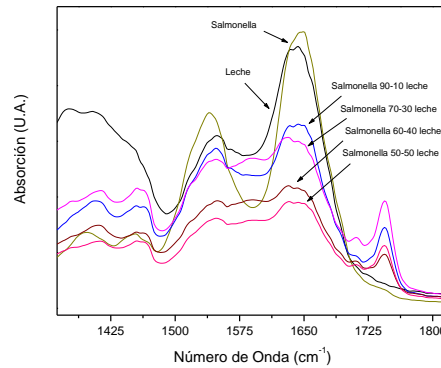


Figura 5. Espectro FTIR de la leche a diferentes concentraciones de salmonella, en la región de 1540 cm^{-1} y 1645 cm^{-1} .

Los espectros muestran la respuesta de la absorción infrarroja a la presencia de contaminación microbiana, principalmente en las regiones espectrales correspondientes a los carbohidratos y las proteínas debido a que se modifica la forma de línea y la intensidad de las bandas de absorción asociadas a los grupos funcionales contenidos en este tipo de compuestos. Estas diferencias son más evidentes para la región de las proteínas de la leche en las que se observan dos bandas ensanchadas en 1540 y 1645 cm^{-1} , a diferencia del espectro de las bacterias puras, que muestran bandas en posiciones muy similares, pero más definidas y un ancho medio menor al de las bandas de la leche cruda.

BIBLIOGRAFÍA

1. Inocuidad de los alimentos, informe de la secretaria, organización mundial de la salud, 63. Asamblea Mundial de la Salud, 2010.
2. A Félix- Fuentes, O. Nydia Campas-Baypoli y M. Meza-Montenegro calidad sanitaria de alimentos disponible al público de ciudad obregón sonora México, revista de salud pública y nutrición, 2005.
3. Codex alimentarius: leche y productos lácteos volumen 12 segunda edición
- 4.- Harold Frederic Walton and Jorge reyes.2005. Análisis químico e instrumental moderno. Reverte S.A. New York,pp 217-219