

## Identificación molecular de bacterias presentes en la lechuga (*Lactuca sativa*) y su efecto en la inocuidad alimentaria

A.N. Rodríguez-Arredondo<sup>1</sup>, M.E. López-Pérez<sup>2</sup> y M.C Del Rincón-Castro<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Licenciatura en Ingeniería en Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato. <sup>2</sup>Posgrado en Biociencias, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato. <sup>3</sup>Departamento de Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato. cdelrincon@ugto.mx

**RESUMEN:** Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA), constituyen un problema de salud a nivel mundial, diversos estudios demuestran la alta contaminación microbiológica que presentan diversas hortalizas en la cadena de producción, causando una reducción económica importante. El objetivo del presente trabajo, fue evaluar la contaminación microbiológica de la lechuga (*Lactuca sativa*) en la etapa de cosecha y en el proceso de distribución (expendio de alimentos y supermercado) en la región de Irapuato, Guanajuato. A partir de las muestras recolectadas, se logró aislar un total de 21 cepas de bacterias y a partir de ellas se extrajo DNA de buena calidad, se realizó la amplificación por PCR del gen 16S rDNA para su posterior secuenciación, con la finalidad de identificar el género y especie de los aislados. Los resultados obtenidos demostraron una importante contaminación microbiológica en las muestras, identificándose bacterias como *Pseudomona sp.*, *Bacillus cereus*, diversas especies de *Pantoea* como *P. agglomerans* y *P. vagans relacionadas* con la utilización de agua y abono contaminados, además de la manipulación inadecuada de la lechuga en la cadena alimentaria desde su producción, comercialización y consumo en puestos de venta populares.

**Palabras clave:** Lechuga, bacterias, gen 16S rDNA.

**ABSTRACT:** Foodborn diseases, are considered a public health issue, several studies shown the high microbiological contamination of the letucce in particular (*Lactuca sativa*) causing a significant reduction in economic production. The aim of this study was to evaluate the contamination of letucce in three points of its chain (harvest stage and in process of distribution), at Irapuato province of Guanajuato. It was obtained twenty-one strain of bacterium, was obtained the DNA of each strain, also the polymerase chain reaction (PCR) was done by the gene 16S rDNA for their future sequencing, in order to identify the genus and species of the strains. Results shows contamination of lettuce with *Pseudomona sp.*, *P. agglomerans*, *Bacillus cereus*, *P. vagans*, related with the use of water and soil contaminated, besides inadequate manipulation in the production chain. That indicated the inadequate manipulation and it can cause a different kind of disease, these set of controls may include Good Agricultural Practices (GAP), must be considered to reduce a public health risk.

**Keywords:** Lettuce, bacterium, gen 16S rDNA.

**Área:** Microbiología y biotecnología

### INTRODUCCIÓN

Las hortalizas han sido asociadas en repetidas ocasiones, con Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA), al ser un alimento que se consume en fresco, los microorganismo patógenos puede ser introducidos en verduras frescas en cualquier momento durante su línea de producción (Gu *et al.*, 2011). Por ello, se deben adoptar medidas específicas, tomando en cuenta la diversidad de productos y prácticas agrícolas, con la finalidad de que puedan ser efectivas en la reducción de la contaminación microbiológica. Sin embargo, poco se sabe acerca de la contaminación de la lechuga durante su cadena de producción que incluye: precosecha, cosecha y los procesos de distribución y empaque (Monge *et al.*, 2011).

La OMS (2015), determinó que las ETA afectan cada año a 77 millones de personas, de las cuales 9 000 mueren a causa de diversas enfermedades, de ellas, 31 millones son menores de 5 años, siendo las enfermedades diarreicas las que representan el 95% de las enfermedades transmitidas por alimentos. Existe un factor de riesgo potencial a enfermedades causadas por el consumo de diversas hortalizas

contaminadas con enteropatógenos como *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 que ha provocado recientes brotes de infecciones en seres humanos, de acuerdo a lo reportado por CDC (Centro de Control y Prevención de Enfermedades) en el 2018 (CDC, 2018). En México se han notificado al menos 20 brotes al año, se estima que existen 400 enfermedades que pueden estar relacionadas a las ETA, además de acuerdo con un estudio realizado por Rodríguez y col. en el 2005, se demostró la presencia de enterobacterias en muestras de lechuga, identificándose: *E.coli*, *Shigella spp*, *Salmonella spp*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* entre otros, dicha contaminación puede estar originada por el riego con agua contaminada, así como la manipulación por parte del personal. Debido a lo anterior, en el presente trabajo se buscó identificar microorganismos patógenos presentes en muestras de lechuga, con la finalidad de conocer el género y especie de las mismas, para generar conciencia sobre las Buenas Prácticas de Manufactura y las prácticas de higiene al momento de manipular los alimentos.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de lechuga se adquirieron directamente de distintos supermercados nacionales. Se analizaron tres muestras con la siguiente nomenclatura: *L1*: Lechuga procedente de supermercado, *L2*: Lechuga procedente de expendio de alimentos, *L3*: Lechuga procedente de campo. Las muestras recolectadas se almacenaron a 4 °C.

#### Crecimiento y aislamiento de cepas de bacterias

El crecimiento se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Noguera *et al.*, 2016 con modificaciones. Se preparó una suspensión homogénea de cada muestra de lechuga. Para ello se pesaron 5 g de la muestra y se maceró por un periodo de 2 min, obteniendo un volumen total de 50 mL en agua estéril. Posteriormente se realizó las siguientes diluciones:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  para ser colocadas en cajas Petri con medio de cultivo específico para aislar bacterias (Leche Peptonizada), finalmente se incubarán a 28°C por 72 hrs. La purificación de cada cepa se obtendrá por estría cruzada en caja Petri con su medio de cultivo correspondiente.

#### Extracción de DNA de cepas de bacterias

Las cepas de bacterias fueron recuperadas por centrifugación a 5000 rpm por 5 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en agua destilada. Se agregó 700 µL de tampón glucosa-Tris-EDTA (Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 Mm) y 6 µL de lisozima ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ), se incubó a 37° C por 2.5 hrs. A la mezcla, se le adicionó 10 µL de SDS al 25% y 10 µL de Proteinasa K ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Se añadió un volumen de fenol/ cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante y adicionó 700 µL de isopropanol y 350 µL de volumen de acetato de sodio (3 M, pH 5.2), se incubó a -20°C por 1 h. Finalmente, se centrifugó a 13,000 rpm por 7 min a 4°C y se decantó el sobrenadante, la pastilla se lavó con 500 µL de etanol al 70% centrifugando a 13,000 rpm por 5 min. Se decantó el sobrenadante y el DNA se resuspendió en 30 µL de agua (Shuhaimi *et al.*, 2001).

#### Amplificación del gen 16S rDNA de cepas de bacterias

Se realizó la PCR con la siguiente mezcla: 16.8 µL de agua destilada, 2 µL de Buffer 10x (1x), 1.5 µL de Mg Cl<sub>2</sub> (50mM), 1 µL de dNTP's (10mM), 0.28 µL de oligo R (1492R), 0.28 µL de oligo F (27F), 0.28 µL de Taq (5 U) y 1 µL de DNA. La desnaturalización inicial se realizó a 94 °C por 3 min, seguido de 30 ciclos empleando una temperatura de 94 °C por 30 s, un alineamiento de 50°C por 30 s y una extensión final de 72 °C por 1.10 min (Valenzuela, 2018). Una vez obtenido el producto de PCR, se realizó la purificación por el Kit PureLink™.

### Secuenciación del producto de PCR del gen 16S rDNA

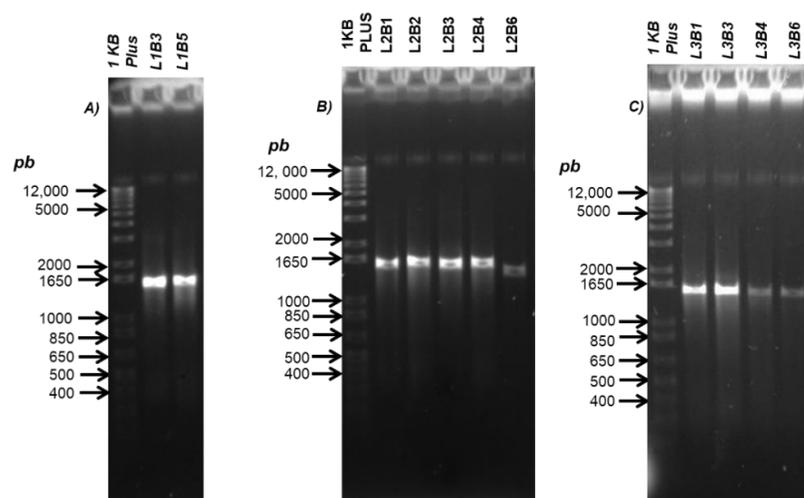
La amplificación obtenida para cada aislado se envió a secuenciar a Macrogen Corea, posteriormente se realizó un ensamble de las secuencias en el programa SeqManTMII, para su identificación en la base de datos NCBI por medio de la herramienta Blast (NCBI, 2018).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Aislamiento de cepas individuales de bacterias

Se aisló un total de 21 cepas de bacterias correspondiente a las muestras analizadas. Para la muestra L1 se aisló un total de 7 cepas con la siguiente nomenclatura: L1B1, L1B2, L1B3, L1B4, L1B5, L1B6 y L1B7. De la muestra L2 se obtuvo un total de 6 cepas: L2B1, L2B3, L2B4, L2B5, L2B6 y L2B7, finalmente para la muestra L3 se obtuvo un total de 8 cepas: L3B1, L3B2, L3B3, L3B4, L3B5, L3B6, L3B7 y L3B8.

### Extracción de DNA y amplificación del gen rDNA 16S



**Figura 1.** Amplificación del gen 16S rDNA de la cepa bacterias para la muestra L1 (A), muestra L2 (B) y muestra L3 (C).

En la Tabla I, se observan los resultados del análisis de las secuencias obtenidas, identificando a la bacteria *Bacillus cereus* la cual se encuentra presente en las tres muestras de lechuga, esta bacteria desde el punto de vista patológico se ha asociado esporádicamente a intoxicaciones alimentarias debido a la producción de dos tipos de enterotoxinas y una exotoxina, donde presenta un período de incubación de 1 a 6 horas, implica dos manifestaciones, el síndrome diarreico y emético cuando la bacteria alcanza una concentración de  $>10^5$  a  $10^8$  UFC/g (Pérez, 2012). En la muestra L1, se identificó el género *Pseudomonas* sp., caracterizadas por encontrarse en suelo o hábitats acuáticos, así como otras muchas que parasitan y causan enfermedades en plantas, animales y en el ser humano, como es el caso de especie tipo, *Pseudomonas aeruginosa*, es un habitante común del suelo, aunque también se asocia, frecuentemente a infecciones de los tractos urinario y respiratorio, también importantes infecciones hospitalarias (Morales-Valenzuela *et al.*, 2013). Para la muestra L2, se identificó el género *Pantoea*, considerado como un patógeno oportunista, pudiendo ser causante de enfermedades en personas inmunodeprimidas, es decir, afecta a aquellos pacientes hospitalizados, en particular a los que reciben tratamiento con antibióticos, también pueden colonizar las vías respiratorias y urinarias. La bacteria *P. agglomerans*, se ha aislado frecuentemente a partir de muestras de plantas, frutas y vegetales, pero también se ha encontrado en heces humanas y de animales, es un bacilo gram negativo, el cual ha sido asociado a cosas de meningitis neonatal y artritis séptica (Sánchez *et al.*, 2006). Del mismo modo se logró identificar bacterias como *B. pumilis*, *E. acetylicum* y *P. marcusii*, se encuentran principalmente

## Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos

en suelo y agua, son consideradas como bacterias benéficas para el crecimiento de los cultivos, por ejemplo, *B. pumilis* es considerada un organismo promotor del crecimiento, que produce hormonas en el medio de cultivo y tiene influencia en el desarrollo de diversas gramíneas (Silva, 2008) (Tabla I).

**Tabla I.** Identificación molecular de las bacterias aisladas a partir de muestras de lechuga.

<i>Muestra L1</i>								
Aislado	Dominio	Reino	Filo	Clase	Orden	Familia	Genero	Especie
<i>L1B3</i>	Bacteria	Monera	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i> Acceso:FJ483513 99%
<i>L1B5</i>	Bacteria	Monera	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomona sp.</i> Acceso:KC119121 99%
<i>Muestra L2</i>								
Aislado	Dominio	Reino	Filo	Clase	Orden	Familia	Genero	Especie
<i>L2B1</i>	Bacteria	Monera	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i> Acceso:JX317637 99%
<i>L2B3</i>	Bacteria	Monera	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Pantoea</i>	<i>P. agglomerans</i> Acceso:MH769106 99%
<i>L2B4</i>	Bacteria	Monera	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Pantoea</i>	<i>P. vagans</i> Acceso: CP014129 99%
<i>L2B6</i>	Bacteria	Monera	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea sp.</i> Acceso: MH769106 99%
<i>Muestra L3</i>								
Aislado	Dominio	Reino	Filo	Clase	Orden	Familia	Genero	Especie
<i>L3B1</i>	Bacteria	Monera	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>B. pumilis</i> Acceso: MF662817 99%
<i>L3B2</i>	Bacteria	Monera	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Exiguobacterium</i>	<i>E. acetylicum</i> Acceso:MH719376 99%
<i>L3B4</i>	Bacteria	Monera	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i> Acceso:KF494191 99%
<i>L3B6</i>	Bacteria	Monera	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Paracoccus</i>	<i>P. marcusii</i> Acceso: MH725412 99%

### BIBLIOGRAFÍA

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (2008). Brote de infecciones por *E. coli* vinculado a la lechuga romana (*romaine*). Recuperado de <https://www.cdc.gov/ecoli/2018/o157h7-11-18/index-esp.html>

- Gu, G., Hu, J., Cevallos-Cevallos, J. M., Richardson, S. M., Bartz, J. A., & Van Bruggen, A. H. (2011). Internal colonization of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* in tomato plants. *PLoS one*, 2011, vol. 6, no 11, p. e27340.
- Monge, C., Chaves, C., & Arias, M. L. (2011). Comparación de la calidad bacteriológica de la lechuga (*Lactuca sativa*) producida en Costa Rica mediante cultivo tradicional, orgánico o hidropónico. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 61(1), 69-73.
- Morales-Valenzuela, G., Silva-Rojas, H. V., & Ochoa-Martínez, D. (2017). First report of *Pantoea agglomerans* causing leaf blight and vascular wilt in maize and sorghum in Mexico. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 47.
- NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica). (2018). Basic Local Alignment Search Tool. Recuperado de <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Noguera, M., Ojeda, O., Mejía, R., Martínez, F., Gonzalez, D., & Requena, D. (2016). Microbiological and parasitological quality of lettuce (*Lactuca sativa*) and coriander (*Coriandrum sativum*) expended in the Santa Rita Parish, Aragua, Venezuela. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 7(1), 52-64.
- Pérez-Portuondo, I. (2012). *Bacillus cereus* y su papel en las intoxicaciones alimentarias. *Revista Cubana de Salud Pública*, 38(1), 98-108. Recuperado en 11 de febrero de 2019, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-34662012000100010&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-34662012000100010&lng=es&tlng=es).
- Rodríguez, M., Zapata, M. E., Solano, M. A., Lozano, D., Torrico, F., & Torrico, M. C. (2015). Evaluación de la contaminación microbiológica de la lechuga (*Lactuca sativa*) en la cadena alimentaria, provincia de Quillacollo, Cochabamba, Bolivia 2015. *Gaceta Médica Boliviana*, 38(2), 31-36.
- Sánchez, F., Muñoz-Ruiz, A. I., Barranco, M. J., & Alonso, A. (2006). Bacteriemia por *Pantoea agglomerans*. *In Anales de Medicina Interna*. Arán Ediciones, SL. 23(5), 250-251.
- Shuhaimi, M., Ali, A. M., & Saleh, N. M. (2001). Utilisation of enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequence-based PCR to fingerprint the genomes of Bifidobacterium isolates and other probiotic bacteria. *Biotechnology Letters*, 23(9), 731-733.
- Silva, G. C., & Briones, C. S. (2016). Manual práctico del cultivo de la lechuga. Capítulo, morfología y tipos de lechuga. Mundi-Prensa Libros.17-28.
- Valenzuela, J. O. S. (2018). Caracterización bioquímica y molecular de bacterias asociadas a nódulos de cuatro leguminosas en la provincia de Santa Elena, Ecuador. *CIENCIA ergo-sum*, 25(1).