

MRAMA 2019

Ponencia 27.11.19; 12:10 – 12:45 (Dr. Oscar J. Esteban Cabornero -oscaresteban@entrepinares.es-, Queserías Entrepinares, SAU, Valladolid)

Integración de herramientas moleculares y conceptuales en el control de microorganismos de la industria biotecnológica. Aplicación en el sector quesero

Objetivos

Aportar la visión industrial sobre la necesidad de controlar los sistemas productivos.

Mostrar la necesidad de tener datos fiables para poder predecir los resultados y para verificar que lo ya realizado cumple con lo planificado.

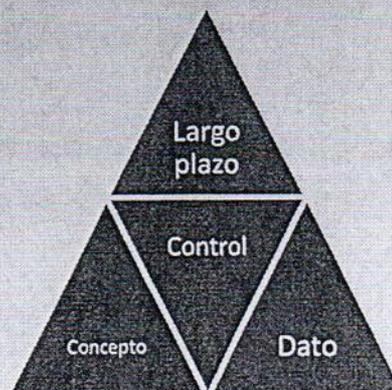
Comentar los diferentes niveles de complejidad y su relación con la incertidumbre para elaborar predicciones exactas y conocer lo sucedido.

Visualizar la necesidad de “ir más allá” de los métodos clásicos empleados en el sector quesero integrando nuevos usos de las herramientas.

Control

En la gestión del día a día, lo que permite ejecutar los procesos de forma exitosa y de realizar mejoras es la posibilidad de disponer de datos fiables y a tiempo. Se desea tener todo bajo control. Nuestra intención es poder aportar una visión científica de la capacidad de control parcial sobre los sistemas biotecnológicos. Por un lado, abordaremos la metodología en sí y por otro lado centraremos en la obtención de los datos que alimentan los sistemas de toma de decisiones.

Figura 1. Esquema del planeamiento



Complejidad: control parte del sistema

Los profesionales de la industria alimentaria y concretamente en la industria quesera han planteado la necesidad de aplicar otra visión en la gestión del control. El proceso de elaboración no ha variado en los últimos siglos (Figura 2) (Columela, 1879 [siglo I]). Cuando abordamos un control exhaustivo de las desviaciones de los resultados se hace patente la idea de abordar el concepto del queso como algo que "está vivo", aunque evidentemente no cumpla con las características propias de un organismo con dicha cualidad. La idea se verbaliza como la idea de que "la fabricación de los alimentos en general y la elaboración de los quesos en particular tienen un nivel de complejidad mayor o por lo menos diferente que la fabricación de otros bienes de consumo". Esta idea, la de aumentar la perspectiva para poder comprender los procesos orgánicos y de organización de la vida no es nueva y ha sido presentada de forma mucho más general y estructurada por numerosos autores (Schrödinger, 1944; Margulis y Sagan, 1995; Watson, 2007; Regis, 2008).

Necesitamos otros abordajes conceptuales y otra mirada. Nos hemos centrado en un caso industrial modelo, la elaboración de queso. Existe una laguna metodológica en la comprensión del concepto propio del alimento en cuanto que es un sistema orgánico que además pasará a formar parte, literalmente, de nuestro propio cuerpo (Figura 3).

Figura 3. Diagrama de complejidad propuesto para el modelo de estudio: queso

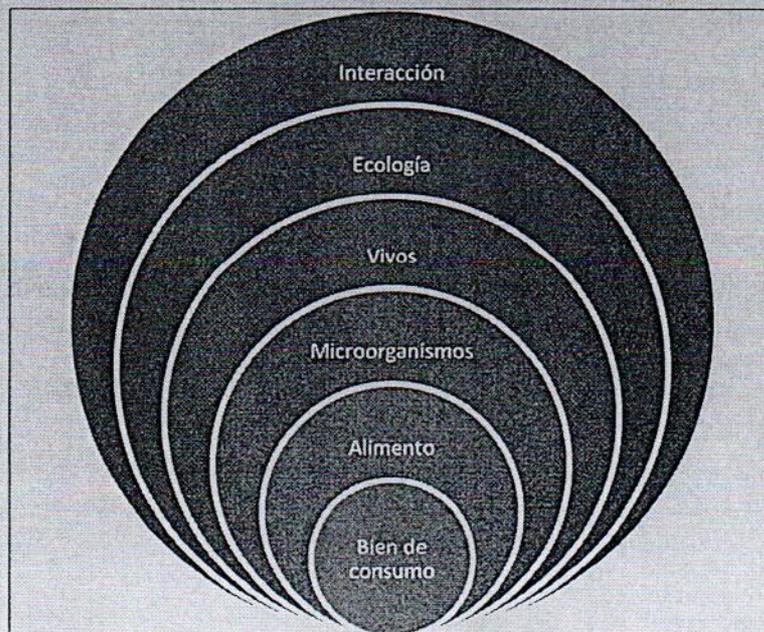
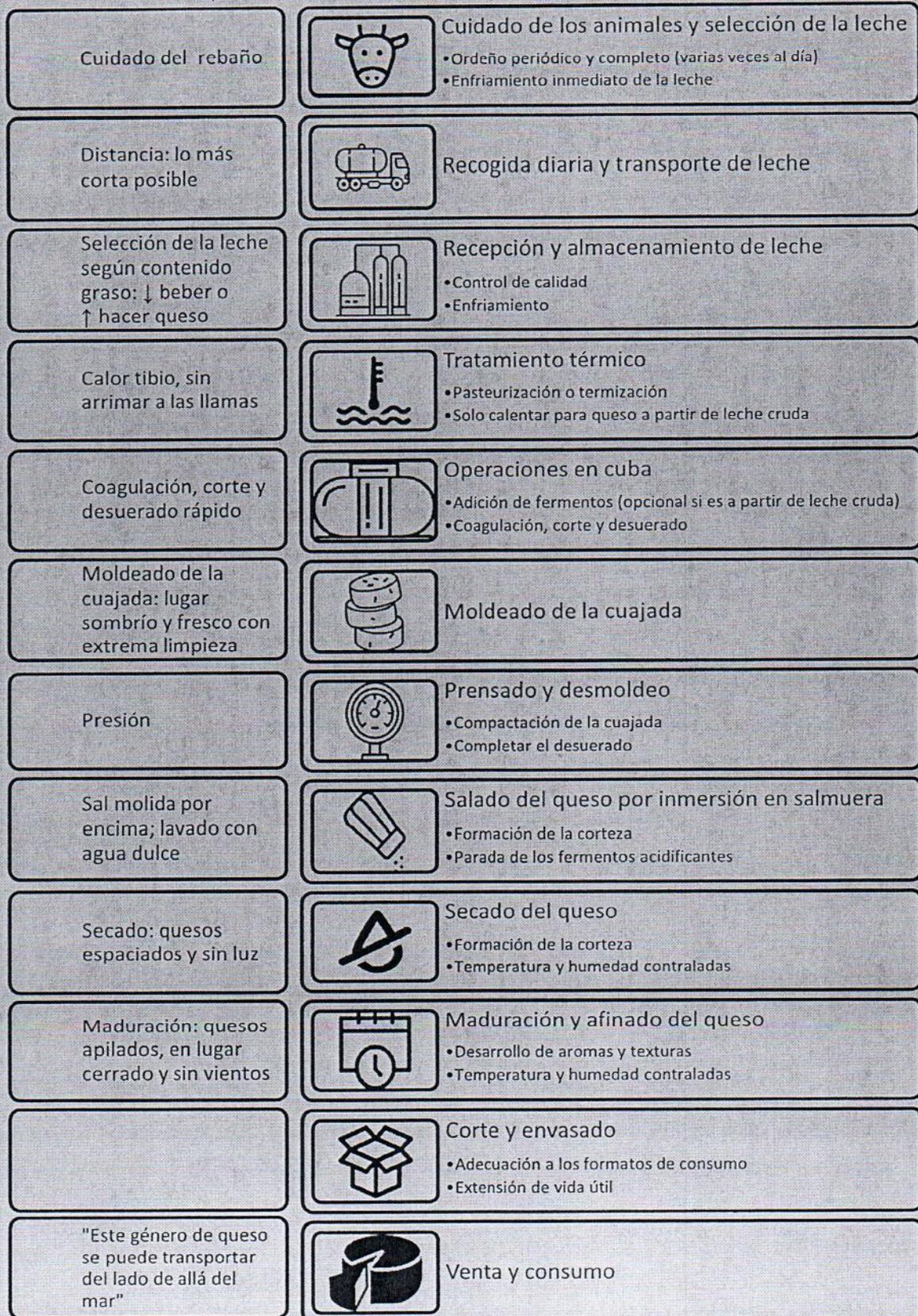


Figura 2. Diagrama de flujo básico de elaboración de queso.
Propuesta de Columela en el siglo I (izquierda) y actual (derecha)



Modelo de organización de la complejidad: Cynefin

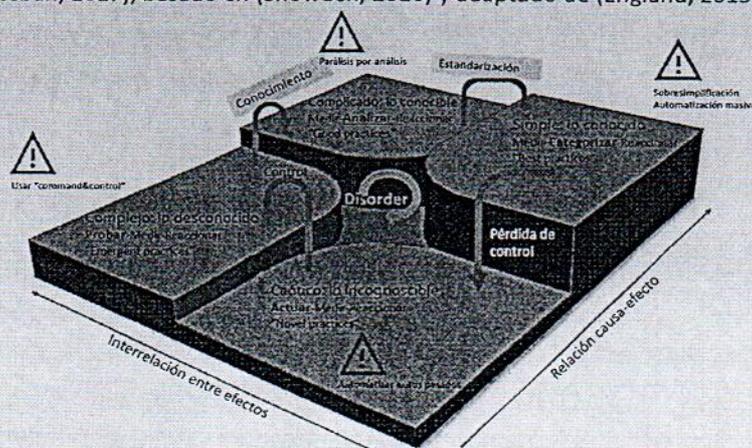
La gestión completa de la elaboración de queso es un proceso sencillo de control complejo. La incertidumbre y la variabilidad deben tenerse en cuenta especialmente en los problemas relacionados con microorganismos (Zwietering, 2015). El marco Cynefin permite establecer de forma sistemática la clasificación de los incidentes de calidad dentro de un dominio de trabajo sobre el que se pueden aplicar herramientas específicas. Originalmente el modelo se presentó para establecer marcos de decisión en la gestión empresarial estratégica y general (Snowden and Boone, 2007).

El marco Cynefin tiene cinco dominios:

- IIIIO Simple, en el que la relación entre causa y efecto es obvia para todos.
- ⚙️ Complicado, en el que la relación entre causa y efecto requiere análisis o alguna otra forma de investigación y/o la aplicación de conocimiento experto.
- 🧪 Complejo, en el que la relación entre causa y efecto sólo puede ser percibida en retrospectiva, pero no de antemano y además no se da reproducibilidad, son problemas o situaciones nuevas nunca vistas.
- 👍 Caótico, en el que no hay relación entre causa y efecto a nivel de sistemas.
- 👉 El quinto dominio es el Desorden, no sabemos qué tipo de causalidad existe.

La transición de un dominio a otro es posible y son los gestores los que deben aplicar conocimiento y herramientas para la correcta transición. La Figura 4 representa dichos pasos mediante el conocimiento y la estandarización.

Figura 4. Representación esquemática del marco de trabajo Cynefin aplicado a entornos biotecnológicos (Esteban, 2017), basado en (Snowden, 2010) y adaptado de (England, 2015)



Cambio de visión

El paradigma clásico se instala en la mente del gestor de la calidad como “controló todo el sistema”. Este modelo ha demostrado su eficacia en dominios simples y complicados. El abordaje de problemas clasificados dentro del dominio complejo requiere de una visión complementaria: “controló parte del sistema”.

Retroceso, pausa, avance

Hasta ahora hemos planteado un escenario no es posible hacer predicciones 100% fiables. Bajo esta mirada existe la necesidad de obtener datos del proceso y del producto que permitan establecer con la máxima fiabilidad el estado actual concreto (pausa); que permitan elaborar predicciones (avance) sobre un estado futuro concreto, así como poder hacer conjeturas (retroceso) sobre lo sucedido en un estado pasado concreto. Este último estado es clave especialmente para la investigación de incidentes y cuando se detectan desviaciones sobre lo planificado. Nos centraremos en este último punto de las herramientas conceptuales para conectar con las herramientas analíticas.

Elaborar conjeturas: razonamiento abductivo

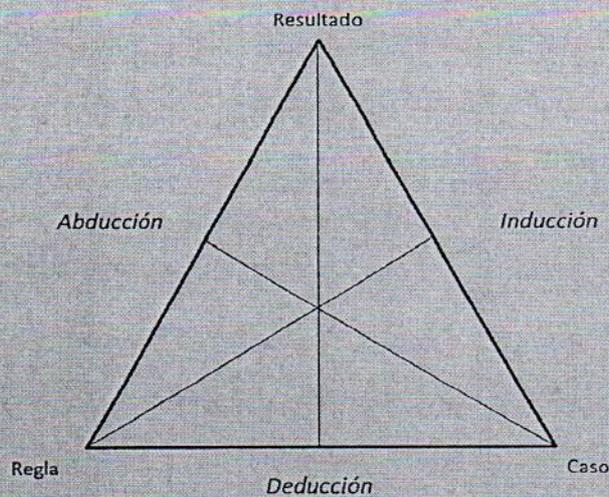
Los métodos de razonamiento lógico básicos reconocidos comúnmente son la deducción y la inducción. La deducción concluye hechos, la inducción habla de lo posible. Un caso especial de inferencia comúnmente incluida dentro del modelo inductivo es el método abductivo. El método abductivo fue desarrollado por Peirce a finales del siglo XIX (Peirce, 1974). Si en la inducción se amplía el conjunto de los individuos semejantes, en la abducción se amplía el alcance de la semejanza (Genova, 1996). Este tipo de razonamiento científico permite la generación de hipótesis o conjeturas. En la Tabla 1 se presentan esquemáticamente los tres tipos de razonamientos, la explicación gráfica se representa en la Figura 5 (Eco and Sebeok, 1989).

Tabla 1. Distinción entre los métodos de razonamiento.
(Esteban, 2017) basado en Bonorino Ramírez (2012)

Deducción	Inducción	Abducción
Regla	Caso	Resultado
Caso	Resultado	Regla
Resultado	Regla	Caso

Es un método que aplicamos en el dominio complejo donde las soluciones a los problemas necesitan de creatividad, analogías y correlación de ideas diversas.

Figura 5. Triángulo de Peirce
Esquema basado en (The Pennsylvania State University, 2017) de (Eco and Sebeok, 1989)



Caso: las levaduras presentes en las instalaciones de elaboración de queso

Se presenta a continuación nuestro trabajo sobre los microorganismos asociados a defectos encontrados en quesos de diferentes queserías (Esteban, 2017). Se analizaron 34 muestras de las cuales se han aislado 165 cepas microbianas; el análisis se ha realizado sobre 98 tipos tras el descarte de los tipos asociados morfológicamente a las bacterias ácido lácticas empleados por las queserías y los morfotipos que no han sido identificados. De los 98 tipos el 82 % son levaduras y el 18 % mohos. Se han identificados 78 cepas pertenecientes a 8 géneros. La levadura predominante con el 74 % sobre el total de levaduras identificadas es *Debaryomyces hansenii* seguida de *Yarrowia lipolytica* y *Kluyveromyces marxianus* con un 8 % y un 4 % respectivamente. Las especies son idénticas a las descritas en trabajos sobre quesos en buen estado y, en el caso de *K. marxianus* y *Y. lipolytica*, también en alteraciones por hinchazón y por producción de pigmentos, respectivamente. La presencia de estas especies ya está descrita en varios estudios previos en los que se analiza la presencia de levaduras en quesos (Viljoen y Greyling, 1995; Welthagen y Viljoen, 1998, 1999; Law, Barry A., Tamime, 2000; Fleet, 2003; Fuquay, Fox y McSweeney, 2011).

Tabla 2. Microbiota levaduriforme en queso. Comparativa de identificación de estudios previos

Especie	Esteban 2016	Viljoen 1995	Welthagen 1998	Welthagen 1999	Fuquay 2011
<i>Debaryomyces hansenii</i>	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Yarrowia lipolytica</i>	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Candida zeylanoides</i>	✓	✓	✓		✓
<i>Rhodotorula sp</i>	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Pichia cactophila</i>	✓				
<i>Candida infanticola</i>	✓				
<i>Pichia norvegensis</i>	✓				
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	✓	✓	✓	✓	✓

Por tanto, las especies identificadas se corresponden con las especies presentes en los quesos de forma natural. Por otra parte, se confirma que son especies ubicuas y presentes en quesos procedentes de diferentes tecnologías y diferentes orígenes geográficos. Además, la prevalencia se mantiene en el tiempo a la vista del mantenimiento de su presencia en los estudios de años sucesivos en la que se incluyen en esta investigación (Tabla 2).

Diversidad intraespecífica de las levaduras del queso: el caso de *D. hansenii*

En este caso se comprobó que las levaduras que producen el deterioro pertenecen a las mismas especies que están presentes en los quesos sin deteriorar. Esta diversidad intraespecífica fue analizada y codificada para poder obtener un índice de peligrosidad de las cepas encontradas. Se realizó un análisis de las características metabólicas que les facilitan el crecimiento en los quesos. Para estudiar el perfil metabólico de cada una de las cepas aisladas, se midió su crecimiento en cada una de las fuentes de carbono seleccionadas: glucosa, lactato, lactosa y galactosa. Los resultados que se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Capacidad combinada de crecimiento de *D. hansenii* sobre lactosa y lactato

		Lactosa	
		+	-
Lactato	+	66%	8%
	-	20%	6%

Más allá

En el caso presentado se aplicaron técnicas microbiológicas clásicas, kits rápidos, determinaciones bioquímicas, y técnicas moleculares basadas en ADN. Con ellas se pudo hacer recuento de microorganismos, determinar ciertas características metabólicas, medir la resistencia a estrés en el medio e identificar las diferentes especies. Con ello se pudo establecer un ranking de nivel de riesgo según unas características y establecer unos niveles de recuentos máximos para entender que el microorganismo estaba bajo control y el nivel de riesgo era asumible. Toda esta información se puede articular en planes de muestreo futuros, establecimientos de límites operacionales y establecimiento de sistemas de vigilancia. Sin embargo, esta información se queda corta para el gestor debido a que no permite el análisis completo de la situación. Continuamos en el dominio complejo. Uno de los pasos necesarios para entrar en el dominio complicado podría ser el uso de otras herramientas moleculares o bien dar otros usos a las ya empleadas.

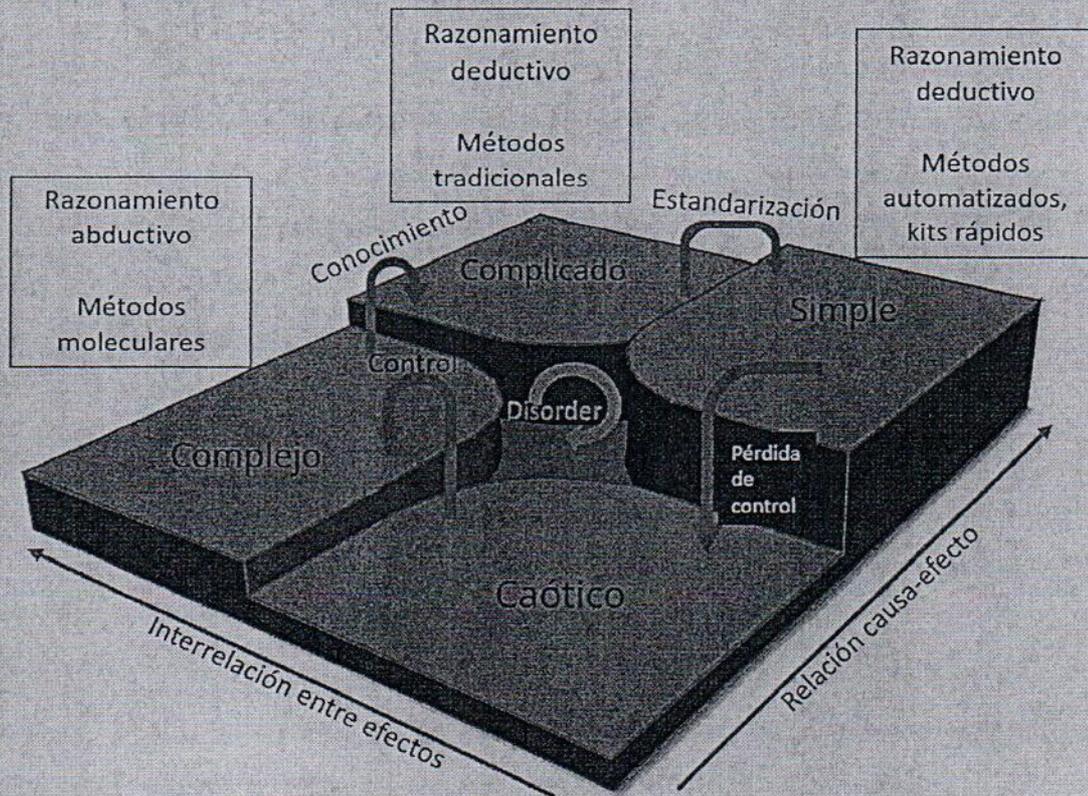
En el caso presentado para la identificación de levaduras el ADN genómico se aisló mediante el método descrito por (Løoke, Kristjuhan y Kristjuhan, 2011). Para la identificación de *Debaryomyces hansenii* se emplearon cebadores específicos descritos por Wrent *et al.* (2015). Esta información permitió poder comparar con estudios anteriores y establecer las ratios de prevalencia dentro de las poblaciones. Esto nos permite englobar dentro de un género la muestra recopilada, sin embargo no permite segmentar los diferentes genotipos.

Tras el análisis del caso mostrado como ejemplo se puso de manifiesto la necesidad de ir más allá. ¿Cómo conocer qué serotipo o genotipo concreto está presente? Para un determinado genotipo, ¿en qué partes de la instalación se encuentra? ¿Es el mismo que el que aparece en el producto?

Tener una información completa de qué microorganismo concreto es, dónde está, en qué momento, en qué proporción, si se "mueve" por la instalación es clave para la reconstrucción la historia completa de un incidente, para establecer mejores niveles de riesgo y verificar la eficacia los sistemas de control. Para ello, realizamos investigación por técnicas de secuenciación masiva que permiten por un lado establecer la microbiota total del queso, pasando de unos pocos géneros identificados (decenas) por técnicas de microbiología clásica, a centenas de taxones microbianos diferentes utilizando la amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S. Así mismo el aislamiento y posterior cultivo axénico de un microorganismo concreto permite la secuenciación de su genoma y nos proporciona información de su genotipo y genes relacionados con la capacidad de formación de biofilms, virulencia, resistencia a antimicrobianos, así como una relación filogenética con otros aislados de su misma especie. Son técnicas que ayudan a la calidad del producto y contribuyen a garantizar la seguridad alimentaria del mismo.

La unión del marco de complejidad, el tipo de razonamiento y los métodos preferibles para cada dominio se representan en la Figura 6.

Figura 6. Integración del modelo conceptual y el uso de herramientas analíticas



Referencias

- Bonorino Ramírez, P. R. (2012) 'La abducción como argumento 1', *AFD*, XXVIII, pp. 143–162
- Columela, L. J. M. (1879) *De re rustica: Los doce libros de agricultura*. Madrid: Vicente Tinajero. Disponible en: <http://datos.bne.es/edicion/bimo0000689527.html>
- Eco, U. y Sebeok, T. (1989) 'El signo de los tres: Dupin, Holmes, Pierce', en *El signo de los tres: Dupin, Holmes, Pierce*. Lumen, pp. 124–125. Disponible en: <https://www.casadellibro.com/libro-el-signo-de-los-tres-dupin-holmes-pierce/9788426411846/88846>
- Einstein, A. (1934) 'On the Method of Theoretical Physics', *Philosophy of Science*. Williams and Wilkins Co., 1(2), p. 163. doi: 10.1086/286316
- England, R. (2015) *Cynefin and Standard+Case | Basic Service Management*, [en línea]. Disponible en: <http://www.basicm.com/content/cynefin-and-standardcase>
- Esteban, O. J. (2017). *Identificación y control de peligros microbiológicos que afectan a la calidad en la elaboración de queso*. Tesis doctoral inédita. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

- Fleet, G. H. (2003) 'Yeasts: an underestimated role in cheese production', *Microbiology Australia*. CSIRO PUBLISHING, 24(3), pp. 36–37. doi: 10.1071/MA03336
- Fuquay, J. W., Fox, P. F. y McSweeney, P. L. H. (2011) *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/referenceworks/9780123744074>
- Genova, G. (1996) 'Los tres modos de inferencia', *Anuario Filosófico*, 29, pp. 1249–1263. Disponible en: <http://www.unav.es/gep/AF/Genova.html>
- Law, B. A. y Tamime, A. Y. (2000) *Technology of Cheesemaking*. 2ª, *Food Research International*. 2ª. Wiley-Blackwell. doi: 10.1016/S0963-9969(00)00083-1
- Lööke, M., Kristjuhan, K. y Kristjuhan, A. (2011) 'Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications.', *BioTechniques*, 50(5), pp. 325–8. doi: 10.2144/000113672
- Margulis, L. y Sagan, D. (1995) *What is Life?* Editado por University of California Press. Berkeley y Los Ángeles: Simon & Schuster.
- Peirce, C. S. (1974) *Collected papers of Charles Sanders Peirce*. Harvard University Press
- Regis, E. (2008) *What is Life? Investigating the nature of life in the age of Synthetic Biology*. Farrar, Straus and Giroux. doi: 10.1038/452692a
- Schrödinger, E. (1944) '¿Qué es la vida?', en *Lectures on Dublin Insitute for Advances Studies*. Dublin, p. 64
- Snowden, D. (2010) *The Cynefin Framework*, *CognitiveEdge*. Disponible en: <http://cognitive-edge.com/videos/cynefin-framework-introduction/>
- Snowden, D. J. y Boone, M. E. (2007) 'A Leader ' s Framework for Decision Making', *Harward Business Review*, (diciembre 2007)
- The Pennsylvania State University (2017) *Reasoning Patterns | FRNSC 297A*, [en línea]. Disponible en: https://online.science.psu.edu/frnsc297a_sandbox_2391/node/2402
- Viljoen, B. C. and Greyling, T. (1995) 'Yeasts associated with Cheddar and Gouda making', *International Journal of Food Microbiology*, 28(1), pp. 79–88. doi: 10.1016/0168-1605(94)00114-L
- Watson, J. D. (2007) *Avoid boring people : lessons from a life in science*. Alfred A. Knopf. Disponible en: <http://catdir.loc.gov/catdir/enhancements/fy0838/2007015675-s.html>
- Welthagen, J. J. y Viljoen, B. C. (1998) 'Yeast profile in Gouda cheese during processing and ripening', *International Journal of Food Microbiology*, 41(3), pp. 185–194. doi: 10.1016/S0168-1605(98)00042-7
- Wrent, P., Rivas, E.-M., de Prado, E., Peinado, J. y de Silóniz, M.-I. (2015) 'Assessment of the Factors Contributing to the Growth or Spoilage of *Meyerozyma guilliermondii* in Organic Yogurt: Comparison of Methods for Strain Differentiation', *Microorganisms*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 3(3), pp. 428–440. doi: 10.3390/microorganisms3030428
- Zwietering, M. H. H. (2015) 'Risk assessment and risk management for safe foods: Assessment needs inclusion of variability and uncertainty, management needs discrete decisions', *International Journal of Food Microbiology*, 213, pp. 118–123. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.032