

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA
PROGRAMA DOCENTE DE INGENIERO EN
BIOTECNOLOGÍA



AI SLAMI EN TO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS QUE SE
TRANSMITEN POR ALIMENTOS

Por

JOSÉ ADOLFO MORALES NAVARRO

Como requisito parcial para obtener el título de
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Diciembre 2024

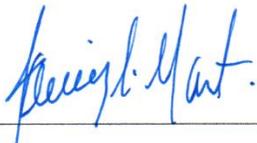
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA
PROGRAMA DOCENTE DE INGENIERO EN
BIOTECNOLOGÍA

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS QUE SE
TRANSMITEN POR ALIMENTOS

Por

JOSÉ ADOLFO MORALES NAVARRO

Comité asesor



Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo

Asesor principal



Dr. Marco Adán Juárez Verdayes

Co-asesor

Diciembre 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA
PROGRAMA DOCENTE DE INGENIERO EN
BIOTECNOLOGÍA

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS QUE SE
TRANSMITEN POR ALIMENTOS

Por

JOSÉ ADOLFO MORALES NAVARRO

Jurado examinador



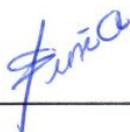
Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo

Presidente



Dr. Marco Adán Juárez Verdayes

Vocal



M.V. Silvia Patricia Acuña Álvarez

Vocal



Ing. Esmeralda Amada Hernández López

Vocal suplente



M.C. Sergio Sánchez Martínez

Coordinador de la División de Ingeniería

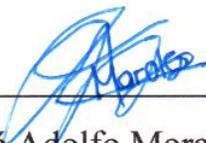
Diciembre 2024

Declaración de no plagio

El autor quien es el responsable directo, jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, graficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente, así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por las autoridades correspondientes.

Por lo anterior me responsabilizo de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaro que este trabajo es original.



José Adolfo Morales Navarro

Pasante de Ingeniero en Biotecnología

Dedicatoria

A mi familia, principalmente.

A mis padres, **Griselda Navarro Hinojosa**, y **Víctor Morales Orozco** por el amor, el apoyo y la educación que me brindaron a lo largo de mi vida, por enseñarme que, aunque la vida no sea fácil tenemos que seguir adelante, con mucho esfuerzo y trabajo duro, hasta lograr lo que queremos.

A mis abuelos, **Ma. Dolores Hinojosa**, y **J. Félix Navarro**, los cuales me han brindado su amor y su cariño sin pedir nada a cambio, por cuidarme y preocuparse por mi como si fuera un hijo.

A mis hermanos, **Víctor Armando Morales**, por ser mi compañero, y cómplices en esta de vida, por todas la vivencia buenas o malas que nos ha tocado vivir, pero que hemos superado para seguir adelante, y a **Shakti Sarahi Morales**, por estar ahí cuando necesito un abrazo, o una sonrisa, por ser la niña que con sus ocurrencias me regala felicidad.

A mis tíos, **Eliseo Hinojosa** y **Patricia López**, por estar ahí cundo lo necesito, por su cariño, apoyo y sobre todo sus consejos que me han servido a lo largo de esta vida. A **Ernesto Navarro** y **Angela Ledesma**, que de cierta forma me enseñaron la complejidad de la vida de adulto, por sus enseñanzas y por todo el apoyo que me han brindado.

Agradecimientos

Quiero agradecer a la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, al **Departamento de Ciencias Básicas** y a la **División de Ingeniería** por proporcionarme la infraestructura y el equipo necesario para el desarrollo de este trabajo.

A todos mis compañeros del **Laboratorio de Bioingeniería Molecular y Bioinformática**, en especial a mis compañeras del servicio social **C. Quetzalli Maricela García Amaro** y **C. Olivia Guadalupe Sánchez Lugo**, las cuales tuvieron una participación de suma importancia en preparación y ejecución de los experimentos.

Agradezco a mi comité asesor y al jurado examinador, principalmente a mi asesor de tesis el **Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo** por otorgarme la oportunidad de trabajar con él y darme la confianza necesaria para realizar este trabajo, de igual forma le agradezco todo el tiempo y conocimiento que me brindo durante este trabajo. Al **Dr. Marco Adán Juárez Verdayes**, por todo el apoyo que me brindo durante la realización de los experimentos, por todos los consejos, sugerencias y correcciones, que fueron puntos claves para el desarrollo de este proyecto, a su vez que sus consejos me servirán en próximos proyectos tanto en mi vida profesional como en la personal. A la **Ing. Esmeralda Amada Hernández López** y a la **M.V. Silvia Patricia Acuña Álvarez** por sus finos comentarios y su trabajo de evaluación durante mi examen de grado.

A mis amigos **Ximena Hernández**, **Vanesa Cruz**, **Valeria Cavazos**, e **Ismael Cavazos**, por todo el apoyo, el cariño y la amistad que me brindaron durante estos años, por sacarme una sonrisa, ya que indirectamente su motivación fue parte importante para la realización de este trabajo. A **Jordán Ramos** y **Alexis Vásquez**, por todas las vivencias, el apoyo y los consejos que me ofrecieron, por volverse como unos hermanos durante esta etapa de mi vida.

Tabla de contenido

Declaración de no plagio	iv
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	ix
Resumen	x
1. Introducción	1
2. Revisión de literatura	3
2.1. Patógenos que se transmiten por alimentos	3
2.2. Enfermedades causadas por alimentos contaminados	5
2.3. Principales rutas de contaminación	7
2.4. Importancia de los bancos de cepas microbianas	8
2.5. Aislamiento e identificación de microorganismos	8
3. Hipótesis	10
4. Justificación	11
5. Objetivos generales y específicos	12
6. Materiales y Métodos	13
7. Resultados y discusión	19
7.1. Evaluación de la densidad microbiana en productos cárnicos obtenidos en dos distribuidoras locales	19
7.2. Evaluación de los métodos de preservación y el origen del producto cárnico sobre la densidad microbiana	22
7.3. Observaciones morfológicas de colonia y observaciones microscópicas	26
7.4. Amplificación del marcador 16S y variabilidad de la secuencia ITS intra-especie en algunos aislados	34
7.5. Identificación de 3 cepas aisladas a partir de productos cárnicos	36
7.6. Análisis fenético restringido de las especies cercanas a las cepas aisladas ..	39
8. Conclusión	42
9. Referencias	43

Lista de figuras

Figura 1. Multicausalidad en enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)	7
Figura 2. Cepario del Banco Nacional de Cultivos de Levaduras.	8
Figura 3. Densidad microbiana presente en productos cárnicos de origen porcino y bovino	20
Figura 4. Evaluación de las variables método de preservación y fuente de carne (porcino o bovino) sobre la densidad microbiana	23
Figura 5. Densidad bacteriana coliforme fecal medida en muestras de carne de origen bovino y porcino	24
Figura 6. Colonias en medio XLD	27
Figura 7. Colonias en medio SS	27
Figura 8. Colonias en medio Müeller-Hinton	28
Figura 9. Contra-selección de las bacterias Gram positivas	29
Figura 10. Electroforesis en gel de muestras de la extracción de ADN de las cepas que aislamos anteriormente	34
Figura 11. Amplificación de la región variable del 16S y el ITS del gen ribosomal	35
Figura 12. Amplificación de la región 16S ribosomal en 20 aislados	36
Figura 13. Variabilidad en la región ITS en dos aislados	39
Figura 14. Resultados del análisis fenético restringido de las secuencias 16S ribosomales de las cepas aisladas en laboratorio	41

Lista de tablas

Tabla 1. Microorganismos encontrados frecuentemente en alimentos	6
Tabla 2. Secuencias de los cebadores de PCR usados en la amplificación de las regiones ribosomales 16S e ITS	17
Tabla 3. Observaciones morfológicas de las colonias y microscópicas de los aislados	30
Tabla 4. Resultados de la búsqueda en base de datos de nucleótidos con BLASTn	37

Resumen

El consumo de alimentos contaminados por bacterias patógenas representa un riesgo significativo para la salud pública, causando enfermedades que afectan a millones de personas anualmente no solo en México si no en el mundo (Bintsis 2017). Para poder enfrentar estos problemas de salud pública es necesario realizar monitoreo periódico y construir bancos de cepas de bacterias que se transmiten por alimentos de interés alimenticio y médico. En este estudio, se analizaron productos cárnicos de origen porcino y bovino de dos distribuidoras locales en Saltillo, Coahuila, (1) Carnicería San Miguel (mercado de abastos Benito Juárez, Luis Echeverría Avenida, No 3241, CP. 25022, Saltillo Coahuila. Lat. 25° 25' 26.8104' Long. 100° 58' 2.3520') y (2) Carnicería Venustiano Carranza (Calzada Antonio Narro No. 2309, CP. 25060, Bellavista Saltillo Coahuila. Lat. 25° 24' 11.8836' Long. 101° 0' 54.9324'). Con el objetivo de evaluar la densidad microbiana, identificar bacterias patógenas que se transmiten por alimentos, para generar el primer banco de cepas patógenas en alimentos útil para la investigación microbiológica y biotecnológica de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Los resultados obtenidos destacaron diferencias significativas entre los métodos de conservación aplicados por las distribuidoras estudiadas. Los productos cárnicos almacenados a temperaturas de congelación (-20 °C) mostraron menores densidades de bacterias coliformes, hongos y bacterias totales en comparación con aquellos refrigerados o mantenidos a temperatura ambiente. Además, se detectó que algunas muestras excedían los límites de contaminación bacteriana establecidos por normativas sanitarias, evidenciando problemas críticos en la cadena de distribución y almacenamiento de alimentos.

A partir del aislamiento de bacterias con medios de selectivos, para bacterias coliformes gramnegativas (SS, XLD, Mueller Hinton, MacConkey), se identificaron cepas pertenecientes a géneros de importancia médica como *Salmonella enterica* y *Klebsiella pneumoniae*, utilizando técnicas moleculares como la amplificación del marcador 16S ribosomal. El análisis fenético restringido corroboró la presencia de variedades específicas de *Salmonella*, lo que resalta su prevalencia en productos cárnicos y su potencial impacto en la salud pública.

Los resultados obtenidos de esta investigación, nos indican la necesidad de implementar medidas más estrictas en cuanto a la conservación y manipulación de alimentos, principalmente de productos cárnicos, en los distintos puntos de venta, que se encuentren en la región de saltillo Coahuila, así como de promover generar programas de vigilancia sanitaria que garanticen la seguridad alimentaria en la región. Este estudio contribuye al conocimiento de los factores de riesgo asociados a la contaminación microbiana y proporciona un recurso valioso para futuras investigaciones en microbiología, biotecnología y control alimentario.

Palabras clave: Alimentos, Bacterias patógenas, Identificación molecular, PCR, Toxicidad.

1. INTRODUCCIÓN

El consumo de alimentos contaminados por bacterias patógenas representa un riesgo significativo para la salud pública, causando enfermedades que afectan a millones de personas anualmente no solo en México si no en el mundo (Bintsis, 2017). Para poder enfrentar estos problemas de salud pública es necesario realizar monitoreo periódico y construir bancos de cepas de bacterias que se transmiten por alimentos de interés alimenticio y médico. En este estudio, se analizaron productos cárnicos de origen porcino y bovino de dos distribuidoras locales en Saltillo, Coahuila, (1) Carnicería San Miguel (mercado de abastos Benito Juárez, Luis Echeverría Avenida, No 3241, CP. 25022, Saltillo Coahuila. Lat. 25° 25' 26.8104' Long. 100° 58' 2.3520') y (2) Carnicería Venustiano Carranza (Calzada Antonio Narro No. 2309, CP. 25060, Bellavista Saltillo Coahuila. Lat. 25° 24' 11.8836' Long. 101° 0' 54.9324'). Con el objetivo de evaluar la densidad microbiana, identificar bacterias patógenas que se transmiten por alimentos, para generar el primer banco de cepas patógenas en alimentos útil para la investigación microbiológica y biotecnológica de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Los resultados obtenidos destacaron diferencias significativas entre los métodos de conservación aplicados por las distribuidoras estudiadas. Los productos cárnicos almacenados a temperaturas de congelación (-20 °C) mostraron menores densidades de bacterias coliformes, hongos y bacterias totales en comparación con aquellos refrigerados o mantenidos a temperatura ambiente. Además, se detectó que algunas muestras excedían los límites de contaminación bacteriana establecidos por normativas sanitarias, evidenciando problemas críticos en la cadena de distribución y almacenamiento de alimentos.

A partir del aislamiento de bacterias con medios de selectivos, para bacterias coliformes gramnegativas (SS, XLD, Mueller Hinton, MacConkey), se identificaron cepas pertenecientes a géneros de importancia médica como *Salmonella enterica* y *Klebsiella pneumoniae*, utilizando técnicas moleculares como la amplificación del marcador 16S ribosomal. El análisis fenético restringido corroboró la presencia de variedades específicas de *Salmonella*, lo que resalta su prevalencia en productos cárnicos y su potencial impacto en la salud pública.

Los resultados obtenidos de esta investigación, nos indican la necesidad de implementar medidas más estrictas en cuanto a la conservación y manipulación de alimentos, principalmente de productos cárnicos, en los distintos puntos de venta, que se encuentren en la región de saltillo Coahuila, así como de promover generar programas de vigilancia sanitaria que garanticen la seguridad alimentaria en la región. Este estudio contribuye al conocimiento de los factores de riesgo asociados a la contaminación microbiana y proporciona un recurso valioso para futuras investigaciones en microbiología, biotecnología y control alimentario.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Patógenos que se transmiten por alimentos

Los patógenos que se transmiten por alimentos, al igual que las enfermedades que dichos patógenos producen, han estado presentes a lo largo de la existencia de la humanidad, no obstante, el primer hombre en relacionar y asociar enfermedades con el consumo de algunos alimentos fue Hipócrates (4600 a.C.), el identificó una conexión entre las personas enfermas y su consumo con ciertos alimentos (Bintsis, 2017). Tiempo después durante el siglo XIX Louis Pasteur reconoció la existencia de microorganismos presentes en alimentos y de su transmisión de enfermedades, ya que en el año 1889 Pasteur fue el primero en cultivar los bacilos (*Vibrio cholerae*) presentes en el pollo, los cuales eran los causantes de la colera, y demostró que se podía transmitir la enfermedad al inyectar una suspensión pura de este bacilo (Bordenave, 2003).

Estos microorganismos patógenos son definidos como agentes biológicos (bacterias, hongos, virus, protozoos y parásitos) que pueden causar un evento de enfermedad, a partir de la ingestión de un alimento contaminado, por lo tanto, un brote de enfermedad transmitida por alimentos se define como la presencia de dos o más casos de enfermedades con síntomas similares como el resultado del consumo de un alimento en común (Bintsis, 2017).

Para hablar de patógenos que se transmiten por alimentos, se deben mencionar principalmente las bacterias ya que son la causa más común de enfermedades. La mayoría de las bacterias patógenas que se transmiten en alimentos son mesófilas, las cuales presentan una temperatura óptima de crecimiento entre 20°C a 45°C. Algunas de ellas (*Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*), son capaces de formar esporas, volviéndolas resistentes a temperaturas mayores (50 °C). Otras bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Campylobacter jejuni*) producen toxinas resistentes a altas temperaturas (Bacon y Sofos, 2003). Las bacterias producen dos tipos principales de toxinas, las “exotoxinas”, las cuales son proteínas liberadas extracelularmente al medio o al sitio

donde se encuentren, y las “endotoxinas”, son LPS (lipopolisacárido) que se encuentran a lo largo de la pared celular bacteriana, pero para ser más exactos se encuentran en la membrana externa en las bacterias Gram negativas (Méndez-León y col, 2021). En el caso de *C. jejuni*, produce “enterotoxinas” las cuales son un tipo de exotoxina, que es desnaturalizadas a temperaturas superiores a 56°C y necesitan un pH de 2.0 u 8.0 para ser destruidas por completo. Otro ejemplo de exotoxinas, son las citotoxinas, las cuales son estables a temperaturas altas y necesitan temperaturas superiores a 60°C para su desnaturalización (Bacon y Sofos, 2003)

Si hablamos de las principales bacterias patógenas transmitidas por alimentos tenemos que hablar de las siguientes bacterias.

Salmonella spp.

La *Salmonella* fue descubierta en 1884, por el Dr. Daniel Elmer Salomón, y en honor a este bacteriólogo fue que la bacteria recibió su nombre. Salomón aisló la primera *Salmonella choleraesuis* del intestino de un cerdo (Popa, 2021). *Salmonella* son un grupo de bacterias gramnegativas en forma de bacilos, que pertenece a la familia de la *Enterobacteriaceae*, su género se divide en dos especies principales que causan enfermedades en humanos las cuales son, *S. enterica* y *S. bongori* (Bintsis, 2017).

Shigella spp.

Shigella, de manera similar a *Salmonella*, pertenece a la familia de *Enterobacteriaceae*, son bacterias en forma de bacillos Gram negativos, inmóviles y anaerobios facultativos. Estas bacterias sobreviven a temperaturas de 6°C hasta 48°C, pero para tener un crecimiento óptimo se necesita una temperatura de 37°C, y un pH de entre 6.0 a 8.0 (Bintsis, 2017).

El género *Shigella* puede ser dividido en cuatro especies de mayor frecuencia, éstas son: *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* y *Shigella sonnei*. Tres de estas especies (*Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* y *Shigella boydii*) cuentan con una gran diversidad de serotipos llegando a alcanzar 38 de éstos cada una, a diferencia de *Shigella sonnei* que solo cuenta con un solo serotipo (Bintsis, 2017).

Bacillus cereus

Bacillus cereus es un tipo de bacteria patógena, que pertenece a la familia *Bacillaceae*, que se describen como, bacilos móviles, Gram positivos, principalmente aeróbicos o anaeróbicos facultativos (Drobniewski, 1993). Este tipo de bacterias cuenta con la capacidad de producir esporas, que poseen apéndices y *pilli*, por lo tanto, esto les da la cualidad a las esporas de ser hidrófobas, lo que permite que estas se adhieran con mayor facilidad en diferentes tipos de superficies y a su vez las vuelve más resistentes en comparación de otras esporas. Estas bacterias pueden sobrevivir en temperaturas de 4°C, hasta 55°C, y en un pH de 4.3, hasta 9.3, pero para un crecimiento óptimo necesitan una temperatura de entre 30°C, a 40°C, a un pH alrededor de 6.0 a 7.0 (Bintsis, 2017).

Campylobacter jejuni

Esta bacteria Gram negativa que no forma esporas, pertenece a la familia de las *Compylobacteriaceae*. Una de sus características principales, es su tamaño ya que mide de 0,2 a 0,9 µm de ancho y de 0,2 a 5,0 µm de largo, lo cual es pequeño comparado con las bacterias antes mencionadas, a su vez su forma icónica en espiral la vuelve fácil de identificar microscópicamente (Bintsis, 2017).

Escherichia coli

E. coli, bacteria Gram negativa con forma de bacilo que no forma esporas. Algunas cepas de esta bacteria cuentan con flagelos lo que le da su propiedad de motilidad. Principalmente es un organismo anaerobio facultativo, también tiene la capacidad de fermentar azúcares simples como la glucosa, para después transformarlo en diversos ácidos (Bintsis, 2017). Para un crecimiento óptimo necesita una temperatura de 37°C a un pH de 6.0 a 8.0 (Rios y col, 2018).

2.2 Enfermedades causadas por alimentos contaminados

Las enfermedades transmitidas por los alimentos se producen, cuando una persona ingiere un alimento contaminado por patógenos, posteriormente los patógenos se establecen (y generalmente se multiplican) en el huésped humano, de forma alterna los patógenos

toxigénicos presentes en los alimentos pueden producir toxinas, las cuales, al ser ingeridas, provocan intoxicación en el huésped humano. Por lo tanto, las enfermedades causadas por alimentos descompuestos son clasificadas en: infección transmitida por los alimentos y, en intoxicación transmitida por los alimentos, esto dependiendo si los patógenos presentes en los alimentos son toxigénicos (Bintsis, 2017).

En el 2017 se identificaron más de 200 enfermedades transmitidas por alimentos, dichas enfermedades atacan principalmente a personas de la tercera edad, infantes, personas que tienen comprometida la función del sistema inmunológico y en personas sanas expuestas a una dosis muy alta de algún patógenos. Los síntomas que produce cada patógeno son muy similares, lo único que cambia es el tiempo de inicio y la duración de cada uno como se muestra en la (Tabla 1) (Bintsis, 2017).

De acuerdo con la OMS (Organización Mundial de la Salud) cada año 600 millones de personas enferman por ingerir alimentos contaminados, en 2010 un tercio de esa cifra eran niños menores de 5 años, que fallecieron por enfermedades como salmonelosis o infección por *Escherichia coli*, y se estima que el número de personas aumenta cada año.

Tabla 1. Microorganismos encontrados frecuentemente en alimentos (Bintsis, 2017).

Tiempo aproximado de inicio para síntomas	Síntomas predominantes	Organismo asociado o toxina
1 a 7h	Náuseas, vómitos, arcadas, diarrea, dolor abdominal, postración.	<i>Staphylococcus aureus</i> y sus enterotoxinas
6 a 96h	Fiebre, calambres abdominales, diarrea, vómitos,	<i>Salmonella spp.</i> , <i>Shigella spp.</i> , <i>E. coli</i>
1 a 10 días	Diarrea (a menudo con sangre), dolor abdominal, náuseas, vómitos, malestar general y fiebre	<i>E. coli</i> <i>enterohemorrágica</i> , <i>Campylobacter spp.</i>
7 a 28 días	Malestar, dolor de cabeza, fiebre, tos, náuseas, vómitos, estreñimiento, dolor abdominal, escalofríos, manchas rosadas, heces con sangre.	<i>Salmonella timpi</i>
8 a 16h	Vómitos o diarrea, dependiendo de si está presente toxina diarreica o emética; abdominal calambre; náuseas	<i>Bacillus cereus</i> (toxina emética)

2.3 Principales rutas de contaminación

La contaminación microbiana se ha vuelto un problema ambiental, ya que en las últimas décadas ha aumentado a tal punto que se considera un problema importante para la seguridad alimentaria, debido a que puede provocar una amplia gama de problemas para la salud (Bintsis, 2018).

La contaminación de alimentos y la producción de enfermedades, depende principalmente a la asociación de los patógenos fecales y orales, hacia los alimentos, esto debido a que los alimentos se encuentran en constante exposición a estos patógenos, esto debido a los mismos desechos de los animales, y a la manipulación que se tiene por parte de las personas que procesan los alimentos, causan esta contaminación como se puede observar en la (Figura 1) (Slifko y col, 2000).

Principalmente las enfermedades transmitidas de animales a humanos, son descritas como enfermedades zoonóticas, por lo tanto, los humanos podemos ser huéspedes finales, intermedios o parénéticos (Slifko y col, 2000).



Figura 1. Multicausalidad en enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Fuente: INAPAM, Gobierno de México. Recuperado de <https://www.gob.mx/inapam/articulos/las-enfermedades-transmitidas-por-alimentos-eta-tienen-mayor-riesgo-de-contraerlas-las-personas-adultas-mayores>

2.4 Importancia de los bancos de cepas microbianas

La importancia de seleccionar y aislar cepas de bacterianas patógenas que se transmiten en alimentos, para la creación de bancos de cepas, son necesarias para distintas áreas de investigación con enfoques microbiológicos, biotecnológicos, farmacológicos, y de salud pública. Esto a su vez sirve no solo para una identificación morfológica, microscópica o molecular de diferentes cepas microbianas, si no también ayuda a el seguimiento de diferentes investigaciones científicas, así como en la creación de nuevas tecnologías, capaces de solucionar distintos problemas en el ámbito de la salud pública, esto se logra ya que si se identifica el patógeno se puede buscar o generar un tratamiento eficaz que contrarreste la enfermedad causada por dicho patógeno. (Overmann, 2015).



Figura 2. Cepario del Banco Nacional de Cultivos de Levaduras. Tomado de <https://www.ncyc.co.uk/strain-deposit/confidential-safe-deposit>.

2.5 Aislamiento e identificación de microorganismos

Inicialmente para la identificación de bacterias coliformes se pueden utilizar de preferencia, distintos medios de cultivos selectivos, los cuales permiten identificar morfológicamente

distintas sepas bacterianas de interés, por lo tanto, existen distintos medios de cultivo selectivos como lo pueden ser, SS (*Salmonella-Shigella*), XLD (Xilosa Lisina Desoxicolato), y MacConkey. Por ejemplo, el agar MacConkey es un medio selectivo, el cual se utiliza para el aislamiento de bacilos Gram negativos, principalmente a bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, a su vez se pueden identificar fácilmente bacterias que fermentan lactosa, ya que dichas bacterias una vez sembradas en este agar, formaran colonias de color rosa, a diferencia de bacterias que no fermentan lactosa, las cuales formaran colonias opacas de color blanquecino, o transparente (Corry, Curtis y Baird, 1996).

En cuanto a la identificación taxonómica y molecular de las bacterias, a lo largo de los años se ha utilizado la región del 16S rRNA, además de otros marcadores, por lo tanto después de un aislamiento de bacterias utilizando medios de cultivo selectivos, es necesario realizar una extracción de ADN bacteriano, esto con el fin de amplificar por medio de una PCR (reacción en cadena de la polimerasa), y con cebadores específicos para el marcador seleccionado, que en este caso fue la región 16S del gen ribosomal, y obtener la secuencia de nucleótidos mediante secuenciación automatizada de Sanger e identificar al organismo en cuestión mediante una búsqueda en bases de datos empleando el buscador BLASTn (Janda y Abbott, 2007).

3. HIPÓTESIS

Los alimentos de origen animal como los productos cárnicos, lácteos, además de otros son vectores que transmiten bacterias patógenas de humanos debido a que éstas encuentran en esos alimentos un ambiente favorable para permanecer quiescentes o para proliferar, por lo tanto, pensamos que podemos aislar e identificar microorganismos de interés médico y de la industria alimenticia a partir de alimentos de origen animal que se han estropeado. Esto permitirá la creación de un banco de cepas de importancia médica, así como de importancia para las instituciones dedicadas a la investigación en microbiología.

4. JUSTIFICACIÓN

El consumo de alimentos contaminados por bacterias patógenas representa un riesgo significativo para la salud pública, causando enfermedades que afectan a millones de personas anualmente no solo en México si no en el mundo (Bintsis, 2017). Para desarrollar estrategias para monitorear y disminuir la incidencia de bacterias patógenas que se transiten por alimentos es necesario conocer al patógeno.

Para diseñar experimentos en investigación científica con la finalidad de descubrir los mecanismos moleculares de la infección con bacterias patógenas, así como encontrar y probar nuevos productos biotecnológicos que inhiban el crecimiento y proliferación de estos bichos, es necesario contar con material biológico para realizar dichos experimentos.

En consecuencia, la creación de un banco de cepas bacterianas representa un recurso invaluable para futuras investigaciones en microbiología y biotecnología, En este trabajo creamos un pequeño banco de cepas que no solo permitirá el estudio detallado de patógenos transmitidos por alimentos, sino que también contribuirá al desarrollo de estrategias para mejorar la seguridad alimentaria en el país.

5. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

- 5.1 Realizar un estudio de densidad microbiana en productos cárnicos de origen bovino y porcino.

- 5.2 Aislar e identificar microorganismos patógenos de humanos con el objetivo de crear un banco de cepas a partir de alimentos de origen animal como productos cárnicos.
 - 5.2.1 Realizar un muestreo de productos cárnicos de origen porcino y bovino en distribuidoras locales de Saltillo Coahuila.
 - 5.2.2 Realizar un estudio de la densidad poblacional de coliformes totales, bacterias totales y hongos en las muestras de los productos cárnicos obtenidos.
 - 5.2.3 Evaluar el efecto de las variables tipo de carne y método de preservación sobre la densidad microbiana.
 - 5.2.4 Aislar bacterias que forman colonias características, realizar observaciones de la morfología de la colonia y de la célula, además de la clasificación de Gram.
 - 5.2.5 Cultivar bacterias, extraer ADN genómico y amplificar por PCR los marcadores 16S ribosomal y el espaciador interno ITS para secuenciar dichos amplicones por el método automatizado de Sanger.
 - 5.2.6 Limpiar las secuencias obtenidas y realizar una búsqueda mediante BLAST en las bases de datos EST / refseq_rna / refseq_select / core_nt del NCBI.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Muestreo de productos cárnicos de distribuidoras locales

Muestras de carne empaquetada de 250 a 500 gramos fueron obtenidas a partir de dos distribuidoras locales en Saltillo Coahuila (1) Carnicería San Miguel (mercado de abastos Benito Juárez, Luis Echeverría Avenida, No 3241, CP. 25022, Saltillo Coahuila. Lat. 25° 25' 26.8104' Long. 100° 58' 2.3520') y (2) Carnicería Venustiano Carranza (Calzada Antonio Narro No. 2309, CP. 25060, Bellavista Saltillo Coahuila. Lat. 25° 24' 11.8836' Long. 101° 0' 54.9324'). Las muestras fueron empaquetadas en bolsas de poliestireno estériles y llevadas inmediatamente al laboratorio para ser procesadas.

En el laboratorio, las muestras se desempaquetaron en una zona estéril, y con una tabla de plástico y cuchillo estériles se procedió a cortarlas en trozos pequeños, que posteriormente fueron pesados y almacenados por lotes de 25 gramos en bolsas estériles de poliestireno. Estos lotes de muestras fueron utilizados para realizar los estudios de la densidad poblacional de microorganismos, así como para el aislamiento e identificación. Todas las muestras obtenidas y procesadas fueron utilizadas en los estudios en el mismo día de recolección o al día siguiente con previa refrigeración.

6.2 Evaluación de la densidad microbiana

Se tomaron de 4 a 8 lotes de 25 gramos (repeticiones) por tipo de carne (porcino, bovino), por distribuidora (Carnicería San Miguel y Carnicería V. Carranza) y por método de preservación (congelación y refrigeración), y se agregaron en un matraz de 250 mL en donde se agregó 100 mL de Tetrionato de sodio al [10%]. Los matraces fueron incubados por 4 horas en agitación a 110 rpm a 37°C en incubadora. Después de la incubación se tomó 1 mL del líquido con Tetrionato de Sodio incubado con la muestra y se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-9} y se sembraron 100 uL de las diluciones entre 10^{-7} a 10^{-9} en placas de

agar con medios nutritivos como Müeller-Hinton y selectivos como SS y XLD. Se usó placas de agar con medio YPD para aislar hongos. Las placas sembradas fueron incubadas a 35°C en una incubadora construida artesanalmente en casa.

Las colonias que crecieron en las placas de agar con los medios nutritivos y selectivos fueron cuantificadas. El número de colonias contabilizadas fue utilizado para calcular la densidad microbiana por gramo de carne con la siguiente fórmula.

$$\text{UFC/gr} = \frac{C * Fd^{-1} * 1000}{g}$$

En donde C es el número de colonias contadas en placa, Fd^{-1} es la inversa del factor de dilución, esto quiere decir que, si se sembró una dilución 10^{-9} la inversa del factor de dilución será $\frac{1}{10^{-9}}$. El número 1000 es el producto de 10 y 100 debido a que se tiene que considerar que se sembró solo 100 uL de la dilución seleccionada y que el número de UFC en el Tetrionato de Sodio se debe de contabilizar para los 100 mL del volumen empleado. g es el peso de la muestra empleado que rondaba alrededor de 25 gramos. Los conteos en medio nutritivo se utilizaron para medir la densidad de bacterias totales, los conteos en medios selectivos como SS y XLD se utilizaron para medir coliformes totales y el medio YPD se utilizó para medir hongos.

6.3 Observaciones microscópicas y de la morfología de la colonia

Algunas colonias que crecieron en los medios selectivos SS y XLD fueron seleccionadas y almacenadas en medio para crioconserva a temperaturas inferiores a los -75°C. De cada una de esas cepas se resembraron en medios selectivos y nutritivos para realizar las observaciones macroscópicas de la morfología de las colonias.

Las características de la morfología de las colonias evaluadas fueron, el color, la opacidad, la transparencia, el tamaño, la superficie, la forma, la elevación y el margen. Para realizar las observaciones microscópicas y la tinción de Gram, se procedió como sigue. Se tomó una pequeña asada de una colonia aislada de la cepa seleccionada y se resuspendió en

una gota de solución salina 0.8% en un portaobjetos. La suspensión en el portaobjetos se dejó secar a temperatura ambiente y se realizaron las tinciones agregando al portaobjetos las siguientes soluciones de colorantes.

1. Cristal Violeta [0.2%] por 1 minuto, enjuagar con agua destilada estéril.
2. Lugol [0.1%] por 1 minuto, enjuagar con agua destilada estéril.
3. Alcohol etílico [96%] solo por 20 segundos, enjuagar con agua destilada estéril.
4. Safranina [0.25%] por 1 minuto, enjuagar con agua destilada estéril (Committee on Bacteriological Technic, 1957).

Después de realizar la tinción se dejó secar el portaobjetos a temperatura ambiente y se realizaron observaciones bajo el microscopio con el objetivo 100X empleando aceite de inmersión.

6.4 Aislamiento de ADN genómico de bacterias

El método de extracción de ADN genómico que utilizamos, lo modificamos de (Schenk y col., 2023) y se describe a continuación. De las cepas seleccionadas, se sembraron en placas de agar con medio nutritivo Müeller-Hinton para aislar colonias. De las colonias que crecieron, se tomó una muestra generosa de biomasa y se resuspendió en 200 uL de buffer Tris-HCl 10mM y EDTA 1mM (TE). Se agregó 200uL de detergente CTAB al 2% caliente y se mezcló gentilmente. Se agregó 400uL de una mezcla de cloroformo – alcohol isoamílico 25:1 y se agitó vigorosamente en vortex a velocidad máxima por 1 minuto.

Después se transfirió el sobrenadante (aprox. 400uL) a un tubo nuevo, se agregó 40uL de Acetato de Sodio 3M pH 5 y se agregó 1000uL de alcohol etílico al 96% previamente enfriado a -20°C. Se mezcló gentilmente y se centrifugó a 12000rpm por 10 minutos. Después de centrifugar, el pelet se lavó con etanol al 70%. El pelet se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 50uL de TE. Para saber si la extracción fue un éxito, 5uL de

las muestras de ADN genómico extraído se utilizaron en una electroforesis en gel al 1% teñido con “Green Diamond” (referencia).

6.5 Amplificación por PCR de los marcadores 16S e ITS

Amplificamos las regiones 16S e ITS de los genes ribosomales con los cebadores de PCR cuyas secuencias se muestran en la (Tabla 2). La reacción de PCR se realizó como se describe a continuación. Una muestra de 1uL de ADN genómico fue resuspendida en el buffer de reacción “Master Mix 2X for Crystal Taq Polymerase” que contenía las concentraciones suficientes de sales Na⁺ y Mg⁺², así como la concentración óptima de 10mM de dNTPs y 1U de *Thermus aquaticus* DNA dependiente DNA Polimerasa. Los cebadores se agregaron a la reacción a una concentración de 0.1mM por cada uno.

La reacción se llevó a cabo en un Termociclador Axygen 100 y el programa se describe a continuación, un ciclo inicial de desnaturalización por 5 minutos a 95°C, 35 ciclos de 95°C de desnaturalización por 1 minuto, 55°C de alineamiento por 1 minuto, 72°C de extensión por 1 minuto y 30 segundos, y una extensión final de 72°C por 10 minutos. Los productos de la reacción fueron analizados por electroforesis en gel al 1.5%. Las bandas de ADN fueron reveladas con tinción “Green Diamond” en transiluminador UV manufacturado artesanalmente en casa.

6.6 Búsqueda en las bases de datos del NCBI mediante BLAST

Las secuencias obtenidas fueron curadas mediante el recorte de las regiones cuya calidad de secuenciación era baja principalmente en las regiones 5' y 3'. Posteriormente todas las secuencias fueron transformadas al formato FASTA para su análisis subsecuente. Esta limpieza y transformación de los datos la realizamos en la suite bioinformática UGENE (Okonechnikov y col, 2012).

Tabla 2. Secuencias de los cebadores de PCR usados en la amplificación de las regiones ribosomales 16S e ITS.

DB-ID	Nombre*	Secuencia 5'-3'
29	8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
30	1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT
34	1492-2R	CTACGGCTACCTTGTTACGA
35	1492F	AAGTCGTAACAAGGTAACC
36	L1	CAAGGCATCCACCGT
37	G1	GAAGTCGTAACAAGG

* Referencia: (Ndahebwa Muhonja y col, 2018; Jensen, Webster y Straus, 1993)

6.6 Búsqueda en las bases de datos del NCBI mediante BLAST

Las secuencias obtenidas fueron curadas mediante el recorte de las regiones cuya calidad de secuenciación era baja principalmente en las regiones 5' y 3'. Posteriormente todas las secuencias fueron transformadas al formato FASTA para su análisis subsecuente. Esta limpieza y transformación de los datos la realizamos en la suite bioinformática UGENE (Okonechnikov y col, 2012).

Una vez limpias y en formato FASTA, las secuencias fueron utilizadas como consulta en BLAST para nucleótidos en servidor del NCBI en donde se utilizó las bases de datos de ARN (est / refseq_rna / refseq_select) adicionalmente de la base de datos core_nt. Por cada secuencia se seleccionó el mejor hallazgo con un valor esperado (e-value) cercano a cero, con una cobertura de secuencia consulta cercana a 100%, y una puntuación (score) mayor a 200.

6.7 Análisis fenético restringido.

Este análisis se realizó con las herramientas del servidor del NCBI. Las secuencias encontradas en las bases de datos consultadas fueron seleccionadas para el análisis. Fueron alineadas con “Constraint-Based Multiple Alignment Tool” (COBALT). Las distancias fueron calculadas con el método Kimura, Las distancias de las ramas y la topología del árbol se computó con el algoritmo Neighbor Joining.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Evaluación de la densidad microbiana en productos cárnicos obtenidos en dos distribuidoras locales

Problemas de salud pública en diversos países, alrededor del mundo, están relacionados con el consumo de alimentos contaminados con microorganismos. Esto es debido a que los alimentos estropeados o podridos transportan microorganismos que pueden infectar al ser humano y desencadenar una enfermedad, también se debe al consumo de alimentos que transportan un compuesto tóxico producido por algún microorganismo durante su proliferación en el alimento ocasionando una intoxicación en el humano (Bintsis 2017; Bintsis 2018).

Existen muchos estudios que evidencian esta problemática. Madoroba y colaboradores (2021) mostraron resultados en donde pudieron aislar una variedad considerable de especies de bacterias de interés médico como *Bacillus spp*, *Yersinia spp*, *Listeria spp*, *Campylobacter spp*, *Clostridium spp*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*, en productos cárnicos de varias empresas o distribuidoras en diversas provincias de Sudáfrica.

Estos géneros de bacterias son comúnmente encontrados en alimentos de procedencia animal, principalmente carnes, en muchos lugares del mundo, por ejemplo, carne de origen porcino en Italia (Peruzy y col., 2019). En EE.UU. se reportó pérdidas del 31% de todos los alimentos producidos debido al estropeo causado por microorganismos que se transmiten y proliferan en alimentos (Zwirzitz y col., 2020). En Etiopía se reporta una alta incidencia de mortalidad por enfermedades causadas por patógenos que se transmiten en productos cárnicos, esto debido a la práctica del consumo de carne cruda, y muchos de los géneros monitoreados pertenecen a patógenos comunes Gram positivos como *Staphylococcus spp* y *Streptococcus spp* y Gram negativos como las Enterobacterias y Coliformes (Atlabachew y Mamo, 2021).

En México, la carne de pollo y los huevos, son la principal ruta de transmisión de patógenos como *Salmonella spp* y *Shigella spp* así como de variantes genotípicas que son resistentes a múltiples fármacos (MDR por sus siglas en inglés) (Godínez-Oviedo y col., 2022). La carne de puerco y res son principales transportadores de bacterias Coliformes fecales de importancia médica como *Escherichia coli* entero-hemorrágica, diarreica y otras variedades genéticas resistentes a múltiples fármacos (Navarro y col., 2018).

En consecuencia, es de suma importancia realizar de manera rutinaria estudios de la estimación de densidades poblacionales de microorganismos que se transmiten por alimentos. Regionalmente, realizamos estudios de la estimación de la densidad poblacional de bacterias y hongos que se transmiten por alimentos en productos cárnicos de dos distribuidoras locales que mostraron una gran diferencia en la aplicación de los métodos de preservación correctos, siendo la carnicería San Miguel la que mostró las mejores prácticas en comparación con la carnicería P. Venustiano Carranza.

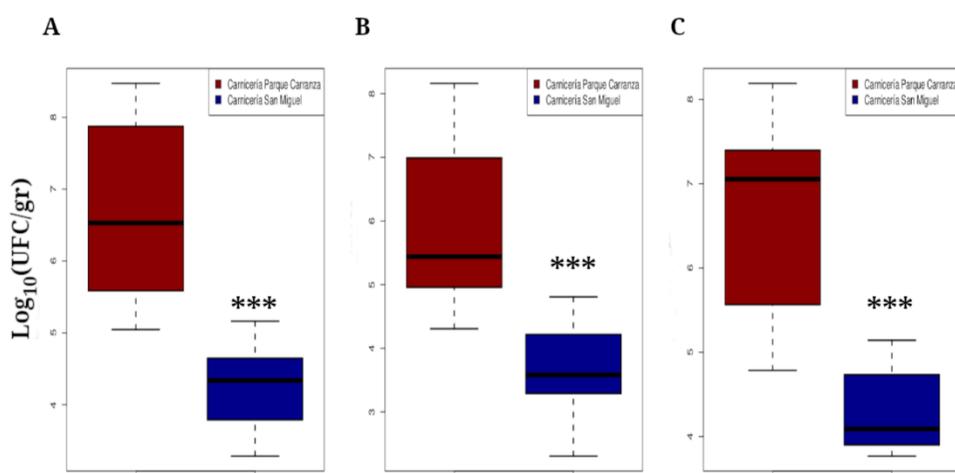


Figura 3. Densidad microbiana presente en productos cárnicos de origen porcino y bovino.

En (A) mostramos el logaritmo base 10 (\log_{10}) de las UFC por gramo de producto cárnico de bacterias totales, en (B) \log_{10} de UFC/gr de carne de coliformes totales y en (C) el \log_{10} de UFC/gr de carne de hongos y levaduras. El cálculo de la significancia estadística de las medias se realizó con el estadístico “t” y la distribución de la “t” de “Student”.

En la (Figura 3) mostramos la densidad microbiana que estaba presente en muestras de productos cárnicos de origen porcino y bovino de dos distribuidoras locales (carnicería Parque V. Carranza, cajas rojas y carnicería San Miguel, cajas azules). Los valores de la densidad poblacional de microorganismos los expresamos en logaritmo base 10 de las unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de carne.

El método de preservación entre ambas carnicerías fue diferente, la carnicería Parque V. Carranza mantenía los cortes de carne a temperatura ambiente o en algunos casos en refrigeración a una temperatura cercana a los 4°C. A diferencia de esta carnicería, la San Miguel mantenía sus productos cárnicos siempre en condiciones de congelación por debajo de los -20°C. Estas observaciones correlacionan con los datos de las densidades poblacionales medidas en este estudio.

Pues las medias de las densidades poblacionales de bacterias totales, coliformes totales y hongos observadas en productos cárnicos de origen porcino y bovino procedente de la carnicería Parque V. Carranza fueron significativamente mayor que las medias observadas en los mismos tipos de productos cárnicos obtenidos de la carnicería San Miguel (Figura 3). Adicionalmente, podemos observar que la cantidad de bacterias coliformes de las carnes de la carnicería Parque V. Carranza sobrepasa los límites permitidos por la NOM-113-SSA1-1994 ya que se encuentran por encima de 1×10^4 UFC/gr.

Estas observaciones sugieren fuertemente que en tiempos actuales existe todavía la problemática de contaminación y transmisión de microorganismos patógenos que se encuentran en alimentos y que la principal vía de contaminación es la zoonosis y los malos hábitos de procesamiento de los alimentos. Por lo tanto, es de suma importancia el monitoreo continuo en intervalos de tiempo por las entidades que tienen las facultades de realizar este tipo de estudio y de amonestar a las empresas procesadoras y distribuidoras de productos alimenticios de origen animal.

En la literatura se pueden encontrar diversos estudios sobre la diversidad microbiana en productos cárnicos de diversas fuentes en donde evalúan variables como: procedencia del

producto, tipo de carne y corte sobre la diversidad y cantidad de microorganismos de interés médico.

Un estudio conducido en Virginia U.S.A. reveló que los productos cárnicos obtenidos en distribuidoras locales presentaban una mayor densidad poblacional de microorganismos aerobios que cortes de carne obtenidas de distribuidoras accesibles por Internet. También observaron diferencias significativas de la diversidad microbiana entre la carne molida y la chuleta de cordero y cabra, siendo la carne molida un mejor vector de bacterias mesófilas, psicrófilas, coliformes y *Listeria spp.* (Kim, Stein and Pao 2015).

Capouya y colaboradores (2020) mostraron que carnes añejadas en cámaras con muy baja humedad empleando luz UV disminuían casi en su totalidad la carga microbiana en el producto a diferencia de productos cárnicos que no se les daba ese tratamiento. Todos estos estudios científicos nos proporcionan información que nos permiten entender el fenómeno de la contaminación de alimentos y la transferencia de microorganismos patógenos al ser humano, ese conocimiento puede ser empleado para mejorar o innovar los métodos de preservación de los alimentos de origen animal.

Por tal motivo, en este trabajo consideramos de importancia evaluar algunas variables como el uso de la congelación para preservar alimentos de cárnicos y el tipo de origen (porcino o bovino) sobre las densidades poblacionales de bacterias.

7.2 Evaluación de los métodos de preservación y el origen del producto cárnico sobre la densidad microbiana.

Para este caso realizamos un experimento en donde evaluamos las densidades poblacionales a partir de carne de res y puerco que obtuvimos congelada y descongelada. Las muestras de carne que obtuvimos descongeladas fueron separadas en 2 grupos, un grupo de muestras fue procesado en el momento de recolección como se describe en la sección de materiales y métodos, y el otro grupo de muestras fue congelado a -20°C en una nevera de refrigerador de 8 pies marca Mabe.

Como control utilizamos muestras de carne de igual origen pero que permanecieron congeladas antes de manipularlas y se procesaron inmediatamente. La ubicación donde se llevó a cabo el experimento es el laboratorio de Bioingeniería Molecular y Bioinformática que se encuentra en las siguientes coordenadas: latitud norte 25° 21' 14.706'' longitud oeste 101° 1' 50.60136''.

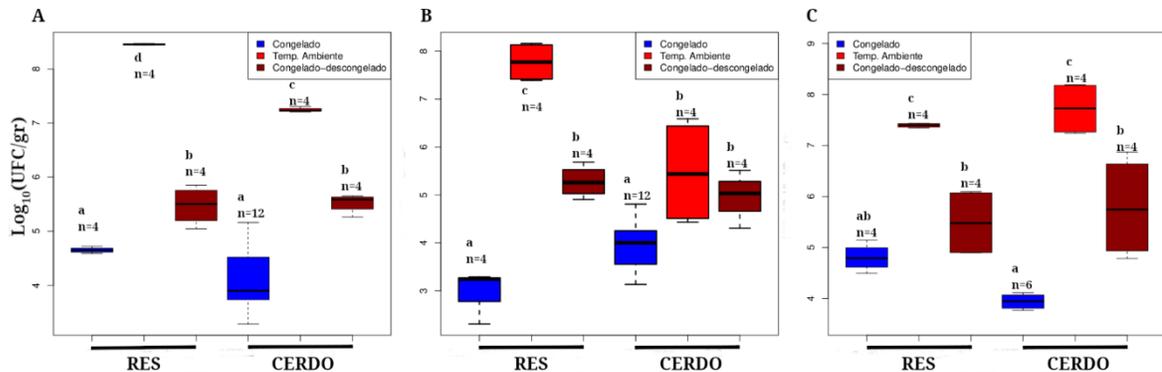


Figura 4. Evaluación de las variables método de preservación y fuente de carne (porcino o bovino) sobre la densidad microbiana. En (A) se muestran las densidades bacterianas totales, en (B) se muestra la densidad de coliformes y en (C) se muestra la densidad de hongos y levaduras. El método de preservación evaluado fue la congelación antes y después de manipularse el alimento, así como la refrigeración. Se realizó el análisis de varianzas y la significancia de las diferencias de las medias se calculó con la prueba de HSD Tukey para un p-value ≤ 0.05 . La diferencia entre medias de las cajas con la misma letra, no son estadísticamente significativas.

En la (Figura 4) podemos observar la densidad poblacional calculada como logaritmo base 10 de las unidades formadoras de colonias por gramo de alimento de bacterias (Figura 4A), bacterias coliformes (Figura 4B), hongos y levaduras (Figura 4C) en muestras congeladas (cajas azules), muestras descongeladas (cajas rojas) y muestras descongeladas que fueron congeladas de nuevamente (cajas guindas). Observamos que la densidad poblacional fue menor en las muestras congeladas que en las descongeladas para los tres casos (cajas azules Vs cajas rojas en Figura 4A, 4B y 4C).

También podemos observar que la densidad bacteriana total y de coliformes fue estadísticamente superior en carne de res comparado con las medidas observadas en la carne de origen porcino, en muestras descongeladas (cajas rojas en las Figuras 4A y 4B). Esto sugiere que la carne de res es un mejor reservorio para bacterias incluyendo las coliformes. Otra observación interesante es que la congelación parece ser un método eficaz para disminuir la cantidad de bacterias totales, bacterias coliformes, hongos y levaduras en carnes de origen bovino y solo bacterias totales, hongos y levaduras en carnes de origen porcino. Esto se puede apreciar en la diferencia de las medias entre las cajas rojas y guindas de las (Figuras 4A, 4B y 4C).

Para evaluar la higiene de los productos cárnicos decidimos hacer los conteos de coliformes fecales mediante el empleo de medios selectivos y diferenciales como XLD y SS. En estos medios uno puede seleccionar y diferenciar los géneros de algunas bacterias coliformes fecales. En este ensayo solo evaluamos el método de preservación y el procedimiento de congelación y descongelación.

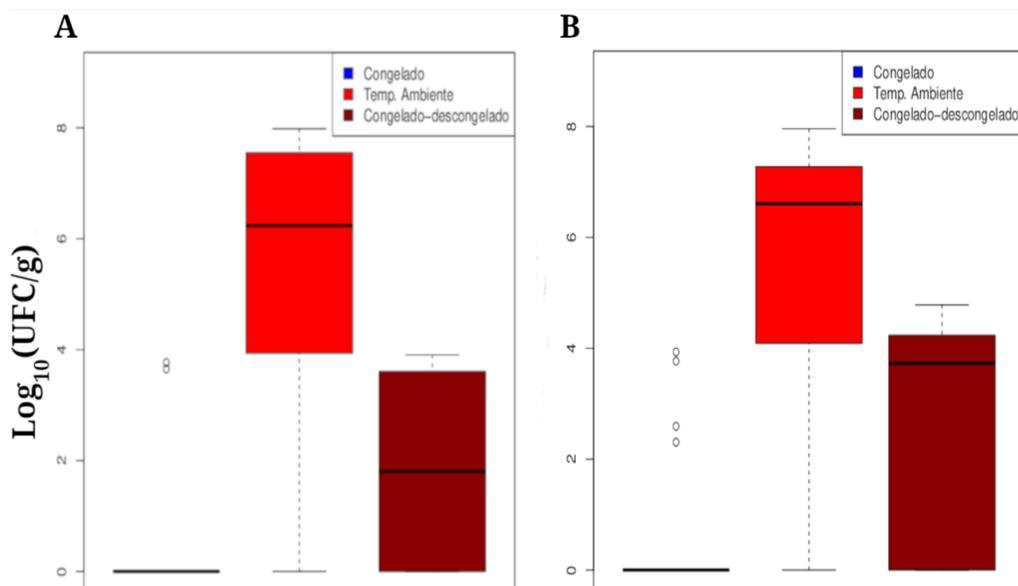


Figura 5. Densidad bacteriana coliforme fecal medida en muestras de carne de origen bovino y porcino. En esta figura mostramos las mediciones de la densidad poblacional calculada a partir de los conteos en (A) medio XLD y (B) medio SS. Muestras obtenidas congeladas (cajas

azules), muestras obtenidas descongeladas (cajas rojas), muestras obtenidas descongeladas que se sometieron a congelación y luego se procesaron (cajas guindas).

En los resultados que mostramos, podemos ver que las muestras de carne que obtuvimos congeladas más del 75% de las veces no crecieron colonias en esos medios selectivos y diferenciales, es por eso que las cajas azules se observan como líneas negras horizontales (Figura 5A y 5B). Por otro lado, las muestras que obtuvimos descongeladas de la distribuidora mostraron la densidad poblacional mayor de coliformes fecales (cajas rojas en Figura 5A y 5B). Cuando sometimos a las muestras que obtuvimos descongeladas a un proceso de congelación a -20°C por 24h, observamos que disminuye significativamente la densidad bacteriana de coliformes fecales, sin embargo, hay alguna cantidad de ellas que sobrevive a la congelación (cajas guindas en Figura 5A y 5B).

Estas observaciones sugieren fuertemente que, la congelación del producto es un método eficaz y barato para conservar productos cárnicos de origen porcino y bovino. Es por eso que este método de conservación es ampliamente utilizado por muchas distribuidoras de alimentos. Adicionalmente, estos datos también sugieren que, a pesar de que existen muchos programas de concientización para productores y distribuidores sobre cómo preservar y manipular los alimentos de manera sanitaria, existen locales distribuidores que no utilizan esas medidas sanitarias y continúan distribuyendo alimentos insalubres que representan un peligro a la salud pública.

Este problema de salud desencadenado por la manipulación y preservación insalubre de los alimentos es común observarlo en países subdesarrollados, pero también hay ejemplos de ocurrencias en países superpotencia. En Taiwan, una vigilancia médica reportó que entre 2012 y 2015 hubo brotes anuales de enfermedades causadas por patógenos que se transmiten por alimentos, siendo los principales agentes etiológicos *Salmonella spp.* no thypi, y Norovirus (Lai y col., 2020).

Las vigilancias médicas de 2004 a 2010, de 2010 a 2017 y de 2009 a 2015 realizadas en Estados Unidos de América, reportan un incremento en los brotes anuales de enfermedades causadas por patógenos que se transmiten por alimentos y dichos brotes

sucedieron en varios estados. Los agentes causales son muchos y variados, por ejemplo, *Cyclospora*, *Aeromonas spp.*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter spp.*, *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *S. enterica*, *Shigella spp.*, *Staphylococcus spp.*, and *Yersinia enterocolitica*, incluyendo a virus como Hepatitis A y Norovirus (Carstens, Salazar y Darkoh, 2019; Dewey-Mattia, 2018).

Como observamos una gran cantidad de bacterias coliformes en las muestras de alimentos, decidimos aislar bacterias de importancia médica como coliformes fecales, entre éstas, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Escherichia coli*, *Enterobacteria spp.*, entre otras para construir un banco de cepas e identificarlas mediante métodos moleculares.

7.3 Observaciones morfológicas de colonia y observaciones microscópicas

Para el aislamiento de cepas coliformes fecales de interés médico, utilizamos medios de cultivo selectivos y diferenciales como MacConkey, SS y XLD. Incubamos muestras de carne en Tetrionato de Sodio durante 4 horas a 37°C y una agitación de 110 rpm, y a partir de la suspensión, después de la incubación, se tomó 100 µL para hacer diluciones seriadas logarítmicas hasta llegar a diluciones de entre 10⁻⁶ a 10⁻⁹. A partir de esas diluciones se tomó una muestra de 100 µL para sembrar en dichos medios.

Las cajas con agar de los medios de cultivo fueron incubadas a 37°C por 24, 48 o 72 horas y se revisaron en búsqueda de colonias características. En la (Figura 6) podemos observar la presencia de colonias características de coliformes fecales como *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *E.coli*, *Pseudomonas spp.* que crecieron en medio selectivo diferencial XLD. Éstas presentan el color amarillo característico. Además *E. coli* presenta colonias aplanadas, y *Enterobacter spp.* y *Klebsiella spp.* presentan colonias mucoides. Otras colonias que crecieron en este medio son de color transparente, y ninguna es característica de *Salmonella spp.* que suelen producir colonias rojizas con un pequeño halo negro en el centro o *Shigella spp.* que suele generar colonias rojizas.

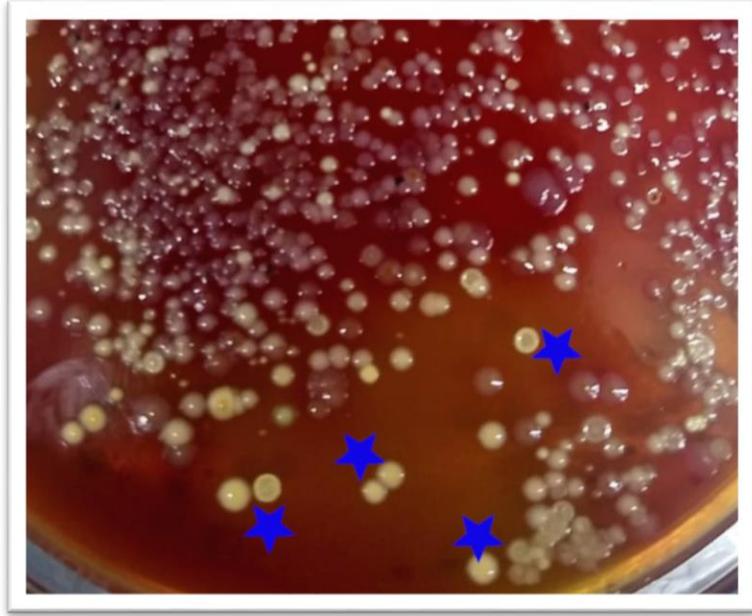


Figura 6. Colonias en medio XLD. Las colonias amarillas son características de bacterias coliformes fecales (estrellas azules).

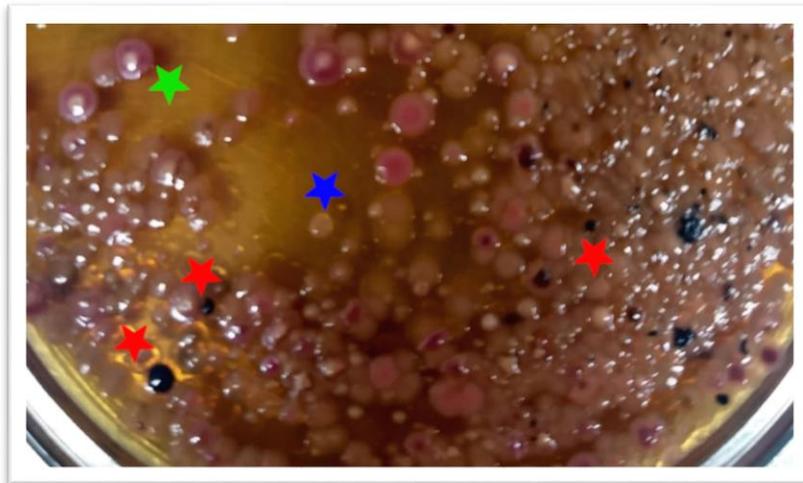


Figura 7. Colonias en medio SS. Colonias características de *Salmonella* spp. (estrellas rojas), colonias características de *Shigella* spp. (estrella azul), colonias características de coliformes fecales (estrella verde).

En la (Figura 7) podemos observar el crecimiento de colonias en medio SS. Algunas son características de *Salmonella spp.* Éstas se muestran en forma de colonias con un centro grande de color negro y una periferia translúcida (estrellas rojas Figura 7) aunque algunas pueden ser *Proteus spp.* ya que el centro negro no es muy grande. También podemos ver colonias sin color translúcidas un poco mucoides, esas con características de *Shigella spp.* (estrella azul Figura 7). También podemos observar colonias que presentan una coloración roja, característica de bacterias coliformes fecales como *Enterobacteria spp.*, *Klebsiella spp.* y *Proteus spp.*, entre otras (estrella verde Figura 7).

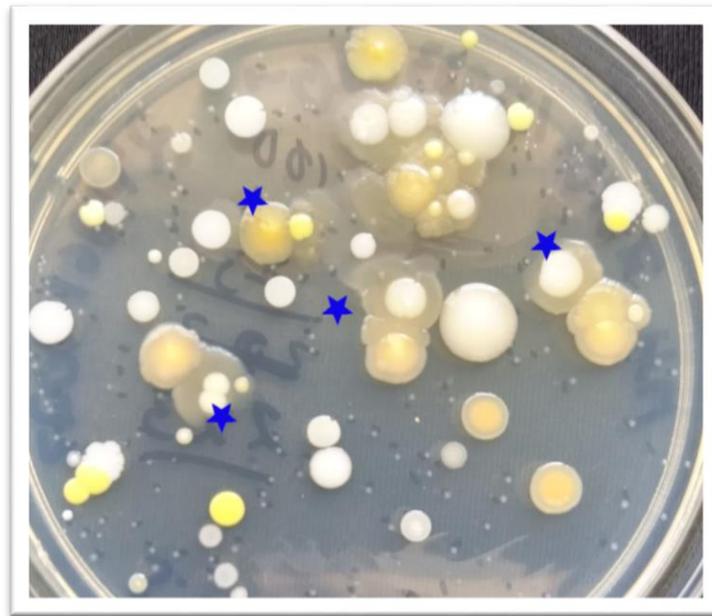


Figura 8. Colonias en medio Müeller-Hinton. Colonias interesantes en forma de huevo frito (estrellas azules).

También aislamos bacterias con morfología de colonia interesante, como las que se muestran en la (Figura 8, estrellas azules). Estas bacterias parecen tener una morfología característica de Mycoplasmas o Ureaplasmas que producen colonias en forma de huevo frito. Es muy interesante y curioso observar que existen dos colonias diferentes en forma de huevo estrellado, una cuyo centro es blanco y otra cuyo centro es amarillento. Ambas parecen crecer

siempre juntas; no parece haber ninguna colonia de esas separadas (estrellas azules en Figura 8).

Este resultado sugiere una posible interacción simbiótica entre bacterias. Aunque afirmar esta sugerencia puede ser errónea debido a que no hemos encontrado reportes sobre interacciones simbióticas entre bacterias, todos los hallazgos en la literatura apuntan a la simbiosis de bacterias con organismos más complejos como hongos, levaduras y plantas. Otra hipótesis es que esa colonia pertenezca a *Burkholderia spp.*, ya que en algunas especies se ha reportado la forma de huevo estrellado/frito como característica de la morfología de la colonia.

Para aislar bacterias Gram positivas decidimos realizar el siguiente procedimiento de contra-selección. Sembramos las diluciones seriales logarítmicas entre 10^{-6} y 10^{-9} en cajas Petri con agar nutritivo, a partir de muestras de carne incubadas con Tetracionato de Sodio. De las colonias que crecieron se pinchó una cantidad pequeña de biomasa y se resembró en forma de parche en medios selectivos como XLD que solo permiten el crecimiento de bacterias Gram negativas principalmente. Entonces seleccionamos aquellas colonias que crecieron en medio nutritivo pero que no crecieron en el parche en los medios selectivos mencionados anteriormente. De esta forma fue como aislamos bacterias Gram positivas.

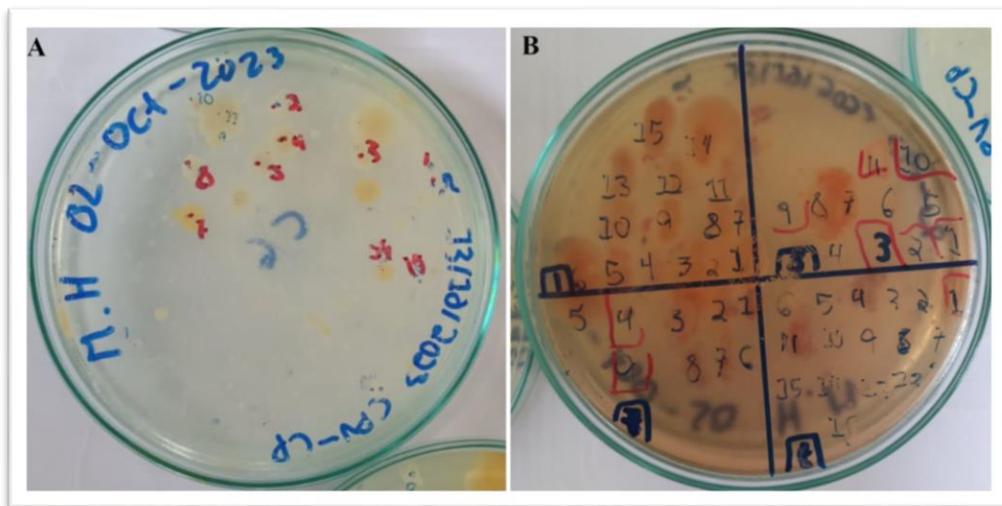


Figura 9. Contra-selección de las bacterias Gram positivas. (A) Colonias aisladas de chuleta de cerdo en cajas Petri con agar nutritivo (Müeller-Hinton). (B) Sembrado en parche de colonias crecidas en medio M-H, en medio selectivo de bacterias Gram negativas XLD.

En la (Figura 9) podemos ver un ejemplo de contra-selección. Las colonias que crecieron en medio nutritivo (M-H) (Figura 9A) son pinchadas para obtener un poco de biomasa y sembrar en forma de parche en el medio selectivo XLD (Figura 9B). Se puede observar que algunos parches en medio XLD como las clonas 3, 2, 4 y 9 no crecieron en ese medio selectivo (Figura 9B), por lo tanto, seleccionamos esas clonas, pero del medio nutritivo Müeller-Hinton (Figura 9A). Esas clonas son probables bacterias Gram positivas.

Decidimos aislar 20 cepas entre las colonias que crecieron en medios selectivos, así como aquellas que crecieron en medio nutritivo Müeller-Hinton y fueron contra-seleccionadas (ver Figuras 6, 7, 8 y 9). Una vez que aislamos las bacterias y preparamos las crioconservas en medio líquido nutritivo Müeller-Hinton con 15% glicerol, se procedió a realizar las observaciones de la morfología de la colonia y las observaciones microscópicas.

La morfología de las colonias se realizó en cajas Petri con agar nutritivo Müeller-Hinton. A partir de las crioconservas se tomó una muestra de biomasa y se sembró en el medio nutritivo para obtener colonias aisladas. Las cajas se incubaron a 37°C por 24, 48 o 72 horas. Las observaciones se realizaron cada 24h y mantuvimos los datos que permanecieron consistentes. Los resultados de estas observaciones se muestran en la (Tabla 3).

Tabla 3. Observaciones morfológicas de las colonias y microscópicas de los aislados.

Clave	S1-MH^A	S2-MH^A	H	UA4	UA5
<i>Color</i>	Mantequilla	Mantequilla	Amarillo verdoso	Blanca	Amarilla
<i>Opaco</i>	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
<i>Transparente</i>	No	No	No	No	No

<i>Tamaño^B</i>	Grande	Grande	Grande	Medio	Medio
<i>Superficie</i>	Lisa, Brillosa	Lisa, Brillosa	Lisa, Brillosa	Lisa, Mucoide	Lisa, Brillosa
<i>Forma</i>	Irregular	Circular	Circular	Circular	Circular
<i>Elevación</i>	Aplanada	Elevada	Aplanada	Elevada	Crateriforme
<i>Margen</i>	Entero	Entero	Entero	Entero	Entero
<i>Gram</i>	Negativo	Negativo	Negativo *	Pendiente	Positivo
<i>Forma celular</i>	Bacilo	Bacilo	Bacilo *	Pendiente	Bacilo
Clave	UA6	UA7	UA8	UA9	UA10
<i>Color</i>	Amarillo	Amarillo	Mantequilla	Amarillo	Amarillo Mantequilla
<i>Opaco</i>	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
<i>Transparente</i>	No	No	No	No	No
<i>Tamaño</i>	Pequeña	Medio	Medio	Grande	Grande
<i>Superficie</i>	Lisa, Esparcida	Lisa, Brillosa, Mucoide	Lisa, Brillosa	Lisa, Brillosa, Mucoide	Lisa, Brillosa
<i>Forma</i>	Irregular	Circular	Circular	Circular	Circular
<i>Elevación</i>	Aplanada	Elevada	Elevada	Elevada	Aplanada
<i>Margen</i>	Irregular, Filamentoso	Entero	Entero	Entero	Entero
<i>Gram</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
<i>Forma celular</i>	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo
Clave	UA11	C-5M-5	C-6M-2	C-7M-11	C-4M-9
<i>Color</i>	Blanco	Salmón	Amarillo	Verdoso	Verde amarillo
<i>Opaco</i>	Sí	Sí	Sí	No	Sí
<i>Transparente</i>	No	No	No	Sí	No

<i>Tamaño</i>	Medio	Pequeño	Pequeño	Medio	Medio
<i>Superficie</i>	Lisa, Brillosa	Lisa, Brillosa	Lisa, Brillosa	Lisa, Brillosa, Mucoide	Lisa, Brillosa
<i>Forma</i>	Circular	Circular	Circular	Irregular	Circular
<i>Elevación</i>	Plana	Aplanada	Aplanada	Aplanada	Aplanada
<i>Margen</i>	Entero	Entero	Entero	Irregular	Entero
<i>Gram</i>	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
<i>Forma celular</i>	Bacilo	Cocos	Cocos	Streptococos	Cocos
Clave	C-5M-2	C-6M	UA1	UA2	UA3
<i>Color</i>	Naranja	Blanca	Amarillo Mantequilla	Amarillo	Blanco
<i>Opaco</i>	Sí	Sí	Sí	Sí	No
<i>Transparente</i>	No	No	No	No	Sí
<i>Tamaño</i>	Medio	Medio	Grande	Grande	Grande
<i>Superficie</i>	Lisa, Brillosa	Lisa, Brillosa	Lisa, Brillosa	Aspera, Brillosa	Lisa, Brillosa
<i>Forma</i>	Circular	Circular	Circular	Circular	Irregular
<i>Elevación</i>	Aplanada	Aplanada	Elevada	Embonada	Aplanada
<i>Margen</i>	Entero	Entero	Curveado	Curveado	Irregular
<i>Gram</i>	Positivo	Pendiente	Pendiente	Pendiente	Pendiente
<i>Forma celular</i>	Cocos	Pendiente	Pendiente	Pendiente	Pendiente
Clave	S1-XLD^C	S2-XLD^C			
<i>Color</i>	Negro, bordes transparentes	Negro			
<i>Opaco</i>	Sí	Sí			
<i>Transparente</i>	No	No			

<i>Tamaño</i>	Grande	Grande
<i>Superficie</i>	Lisa, dentro del medio	Arrugada
<i>Forma</i>	Concéntrica	Concéntrica
<i>Elevación</i>	Elevada	Aplanada
<i>Margen</i>	Ondulado	Ondulado
<i>Gram</i>	Negativo	Negativo
<i>Forma celular</i>	Bacilo	Bacilo

^A. Posibles cepas de *Salmonella spp.* evaluadas en medio Müeller-Hinton.

^B. Tamaño: pinpoint (<0.5 mm), pequeñas (0.5 mm – 1 mm), medio (aprox. 1 mm), grandes (> 1 mm).

^C. Posibles cepas de *Salmonella spp.* evaluadas en medio XLD.

*. Resultados inconclusos.

Todas las cepas identificadas con clave UAX, SX o H fueron aisladas a partir de medios selectivos para coliformes fecales, y las cepas con clave C-XM-X fueron contra-seleccionadas para aislar bacterias Gram positivas. Lo que podemos observar es que todas las cepas coliformes fecales fueron muy consistentes en sus características morfológicas de colonia aún y cuando se sembraron en medio nutritivo Müeller-Hinton.

Las características morfológicas de las cepas aisladas que probablemente son del género *Salmonella spp.*, fueron también evaluadas en medio XLD y los resultados observados concuerdan con las características de ese género. Y aunque parecen pertenecer al mismo género, hay unas pocas discrepancias en la morfología de la colonia entre ellas, que nos hacen pensar que pertenecen a diferente especie.

Una vez aisladas las cepas seleccionamos 3 de ellas S1, S2 y UA6, dos cepas que posiblemente sean *Salmonella spp.* y 1 cepa que posiblemente sea *Proteus spp.* Para identificar de forma molecular dichas cepas, amplificamos por PCR la región variable del 16S y la región espaciadora con los cebadores descritos en la (Tabla 2).

7.4 Amplificación del marcador 16S y variabilidad de la secuencia ITS intra-especie en algunos aislados.

Para amplificar por PCR la región variable del marcador 16S del gen ribosomal y la región espaciadora ITS, primero extrajimos el ADN de las cepas de bacterias que aislamos anteriormente. La extracción se realizó como se describe en la sección de materiales y métodos. Visualizamos el ADN extraído mediante electroforesis en gel al 1% y las bandas se pueden observar en la (Figura 10).

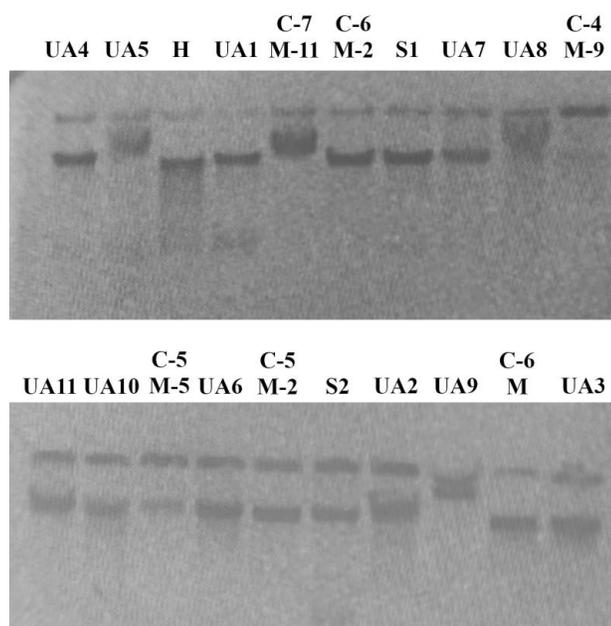


Figura 10. Electroforesis en gel de muestras de la extracción de ADN de las cepas que aislamos anteriormente. En esta figura se observa 2 bandas por carril, pero realmente la banda del ADN genómico es la segunda, la primera es el poso donde se cargó la muestra. Debido al sistema de captura de imagen que utilizamos en el laboratorio se aprecia de esa manera.

Las bandas que observamos sugieren una concentración óptima de ADN genómico para realizar la amplificación por PCR de las regiones de los marcadores del gen ribosomal

16S e ITS con los cebadores descritos en la (Tabla 2). Antes de realizar la amplificación primero realizamos una prueba con el ADN genómico de la cepa S1 y lo desafiamos con los pares de cebadores 8F – 1492R (16S), 8F – 1492R-2 (16S), 1492F – L1 (ITS) y 1492F – G1 (ITS) (ver Tabla 2). Los tamaños del amplicón esperado son de aproximadamente 1250 pb para el 16S y 400 pb para el ITS, aunque el tamaño específico dependerá de la especie en cuestión. En la (Figura 11) podemos observar los amplicones de tamaño esperado para los marcadores seleccionados (16S o ITS).

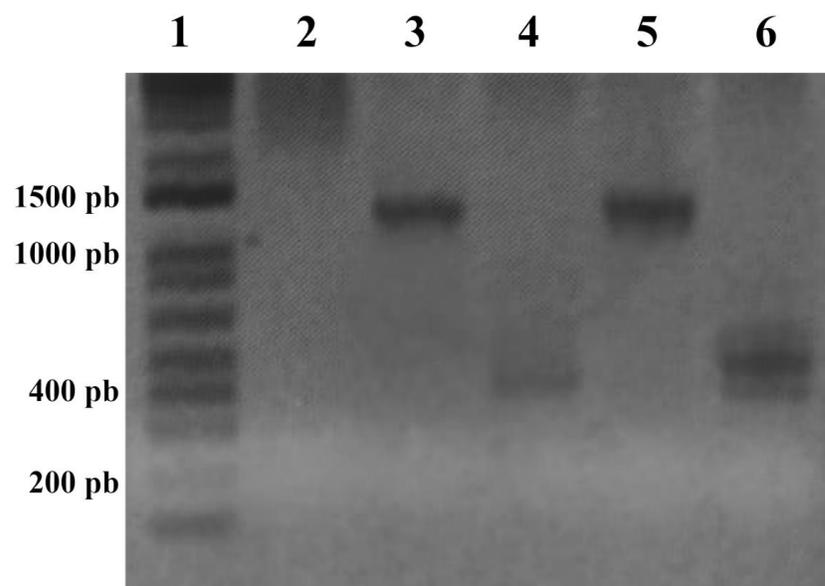


Figura 11. Amplificación de la región variable del 16S y el ITS del gen ribosomal. Los carriles 3 y 5 muestran el amplicón de 1250pb del 16S y los carriles 4 y 6 muestran la amplificación de la región espaciadora del gen ribosomal de un tamaño aproximado de 400pb. El carril 2 es el control negativo en donde se agregó toda la mezcla de reacción excepto el ADN genómico. En el carril 1 cargamos el marcador de peso molecular de 1kb plus de ThermoFisher.

La amplificación de la región del 16S mostró una banda única de tamaño esperado de 1250pb al utilizar el par de cebadores 8F – 1492R (Figura 11 carril 3) y 8F – 1492R-2 (Figura 11 carril 5). El amplicón del ITS amplificado con los cebadores 1492F – L1 mostró una banda única de tamaño cercano a 400pb (Figura 11 carril 4), pero el amplicón obtenido con el par

de cebadores 1492F – G1 mostró un triplete de bandas de un tamaño entre 300 a 500pb (Figura 11 carril 6). El control negativo mostró ausencia de banda (Figura 11 carril 2).

Como los cebadores que amplifican el ITS generan tripletes, decidimos secuenciar solo la región 16S aplicada con los cebadores 8F – 1492R-2. Los amplicones del 16S que obtuvimos por PCR a partir de ADN genómico de las cepas que aislamos y evaluamos morfológicamente, y que se muestran en la (Figura 12), fueron purificados por una segunda precipitación y utilizados para obtener la secuencia de nucleótidos mediante el método de secuenciación automatizada de Sanger.

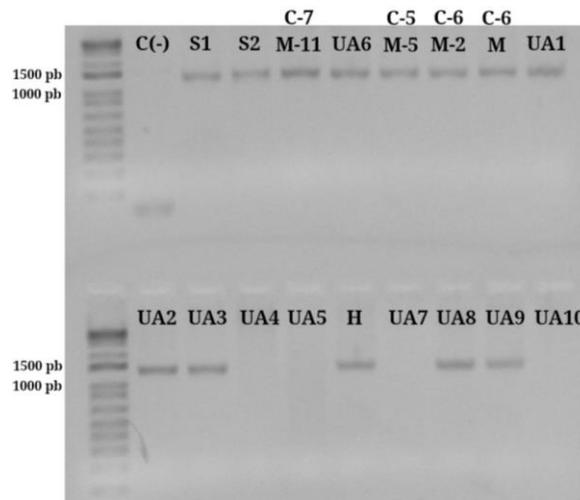


Figura 12. Amplicones de la región 16S del gen ribosomal amplificado con los cebadores 8F y 1492R-2. Carriles 1 de ambos pisos son la escalera de pesos moleculares ThermoFisher 1kb plus. El carril marcado con C(-) es el control negativo. Los amplicones observados son del tamaño esperado, cercano a 1500 pb.

7.5 Identificación de 3 cepas aisladas a partir de productos cárnicos.

Los amplicones del 16S del gen ribosomal fueron secuenciados mediante el método de secuenciación Sanger empleando el cebador 8F. La secuenciación se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. (LANBAMA – IPICYT).

Las secuencias en formato *.ab1 fueron analizadas con la suite bioinformática UGENE (Okonechnikov y col, 2012). Con esta herramienta visualizamos la información de la secuencia de las 3 cepas y eliminamos aquellas regiones de baja calidad, quedando con secuencias más cortas, pero con una calidad excelente. Esas secuencias fueron reformateadas de *.ab1 a *.fasta para utilizar la secuencia con la herramienta de búsqueda por alineamiento básico local, conocida como BLASTn por sus siglas en inglés, con el objetivo de buscar secuencias similares en la base de datos de nucleótidos en el NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

La tarea que seleccionamos fue “nucleotide BLAST” con el algoritmo optimizado para encontrar secuencias algo similares, los demás parámetros fueron configurados por defecto. Los resultados obtenidos de la búsqueda se describen en la (Tabla 4). Las secuencias del 16S que más se parecen en comparación con la secuencia de la misma región genómica de la cepa S1, pertenecen a algunas variantes serovar de *Salmonella entérica*, entre ellas la variante Typhimurium. Para el caso de la secuencia 16S ribosomal de la cepa S2, ésta es muy similar con las secuencias 16S que pertenecen a variantes de *S. entérica* como la variante Agona y Hadar. Para el caso de la cepa U6, obtuvimos resultados anómalos debido a que las secuencias encontradas en la base de datos pertenecen a bacterias del género de *Klebsiella pneumoniae*, *S. entérica* sero-variedades Dublin y Indiana, *Pantoea agglomerans* y *Enterobacter ludwigii*. Aunque las secuencias resultaron las más similares, presentan un porcentaje de identidad entre el 77 y 75% con una cobertura del 78 al 79% en comparación con la secuencia del 16S ribosomal de la cepa UA6.

Tabla 4. Resultados de la búsqueda en base de datos de nucleótidos con BLASTn.

Secuencia consulta	Secuencia encontrada	Puntuación	Cobertura	E-value	Porcentaje de identidad
16S - UA6	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain 83-17	343	79%	2×10^{-89}	75.44%

16S - UA6	<i>Salmonella entérica</i> Dublin	312	78%	1×10^{-79}	76.80%
16S - UA6	<i>Salmonella enterica</i> Indiana	311	78%	1×10^{-79}	77.08%
16S - UA6	<i>Pantoea agglomerans</i>	309	78%	5×10^{-79}	77.57%
16S - UA6	<i>Enterobacter ludwigii</i>	309	78%	5×10^{-79}	77.57%
16S - S2	<i>Salmonella enterica</i> 1559	1840	100%	0.0	98.86%
16S - S2	<i>Salmonella entérica</i> Agona	1840	100%	0.0	98.86%
16S - S2	<i>Salmonella enterica</i> 4	1840	100%	0.0	98.86%
16S - S2	<i>Salmonella entérica</i> Hadar	1840	100%	0.0	98.86%
16S - S1	<i>Salmonella entérica</i> Oranienburg	1856	100%	0.0	99.33%
16S - S1	<i>Salmonella enterica</i> <i>subsp. salamae</i> 6	1856	100%	0.0	99.33%
16S - S1	<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium	1856	100%	0.0	99.33%
16S - S1	<i>Salmonella enterica</i> Newport	1838	100%	0.0	98.95%

Estos resultados sugieren que las cepas S1 y S2 son especies de *Salmonella entérica*, pero de diferente serovar, sin embargo, no hay suficientes datos para esclarecer cuál serovar específicamente debido a que en el caso de la cepa S1 se observan similitudes con las variedades Typhimurium y Newport, y para el caso de la cepa S2 son las variedades Agona y Hadar. Estas diferencias se pueden confirmar en los amplicones de PCR obtenidos con los cebadores 1492F y G1, que amplifican la región ITS, ya que la cepa S1 y S2 muestran diferente número de bandas, esto concuerda con la idea de que pertenecen a diferentes variedades (Figura 13).

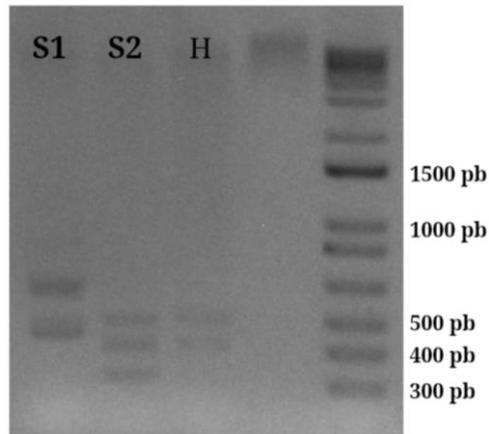


Figura 13. Amplificación de la región ITS con los cebadores 1492F y G1 en muestras de ADN de las cepas S1, S2 y H. El 4to carril es el control negativo y el 5to carril es la escalera de pesos moleculares de 1kb plus de ThermoFisher.

7.6 Análisis fenético restringido de las especies cercanas a las cepas aisladas.

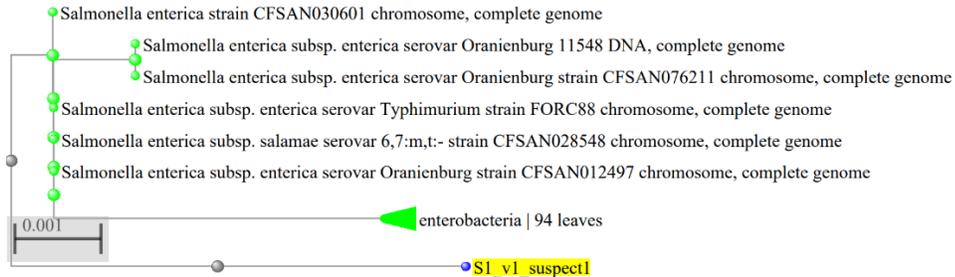
El análisis fenético es un proceso de taxonomización de especies basado únicamente en las similitudes de caracteres sin contemplar un modelo evolutivo de antemano, además es restringido porque solo se incluyeron los taxones cuya secuencia 16S ribosomal es más similar a la secuencia homóloga en las cepas aisladas y secuenciadas. En este caso, la medida de similitud fue el porcentaje de identidad del alineamiento múltiple de las secuencias seleccionadas que fue de un total de 25.

Los resultados del análisis fenético muestran que las cepas S1 y S2 aisladas en el laboratorio son similares a las especies del género de *Salmonella enterica*, pero permanecen fuera del clado. Esto sugiere que las cepas que aislamos en el laboratorio que están etiquetadas como S1 y S2 son especies de *Salmonella entérica* de diferente variedad, pero no se puede saber con seguridad, específicamente a qué variedad pertenecen, y esto es debido a

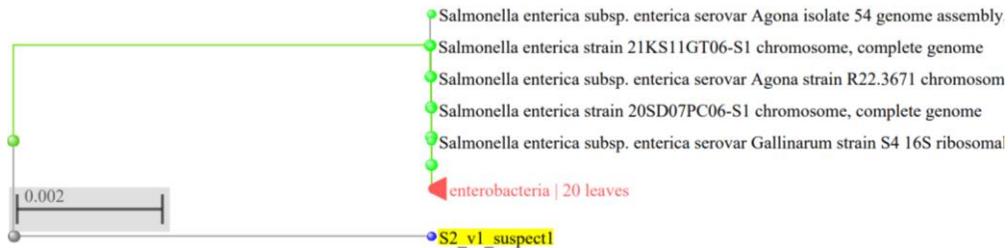
que la información de la secuencia del 16S ribosomal no fue suficiente para determinarlo, se requiere mayor información de otros marcadores moleculares (Figura 14A y 14B).

En el caso de la cepa UA6, ésta parece estar mucho más alejada del género de *Salmonella*, incluso un peldaño fuera del género *Pantoea*. Esto sugiere que la cepa UA6 pertenece a otra especie de otro género que tiene similitud en secuencia del 16S ribosomal con las especies del género *Salmonella*, pero pertenece a otra especie que no se encuentra en las bases de datos. El análisis BLASTn la posiciona cerca de *Klebsiella pneumoniae*, por lo que esa es otra posibilidad. Otra hipótesis es que la cepa no está bien aislada y está contaminada con otras bacterias (Figura 14C).

A



B



C

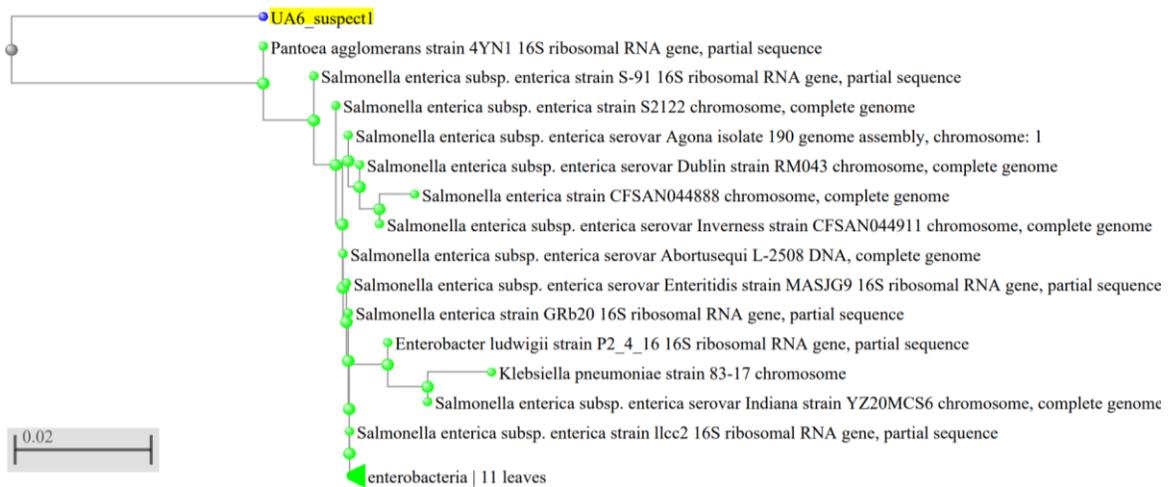


Figura 14. Resultados del análisis fenético restringido de las secuencias 16S ribosomales de las cepas aisladas en laboratorio. En esta figura se muestran los resultados para el análisis de las secuencias 16S ribosomal para (A) la cepa S1, (B) la cepa S2 y (C) la cepa UA6.

8. CONCLUSIÓN

En este trabajo realizamos un estudio de la densidad microbiana en alimentos de varias distribuidoras locales de productos cárnicos en Saltillo Coahuila, México y observamos que se pueden obtener alimentos de origen animal contaminados con bacterias indicadoras de mala higiene. Por ese motivo, es necesario mantener un monitoreo rutinario para identificar puntos críticos de riesgo en la cadena de distribución y almacenamiento de los alimentos.

Aislamos 20 cepas, 15 de ellas Gram negativas y 5 de ellas Gram positivas con morfología de la colonia y detalles microscópicos característicos de bacterias de importancia médica y de la industria alimenticia. Logramos aislarlas e identificamos 3 de ellas a nivel molecular. Dos de ellas pertenecen a la especie de *Salmonella* entérica, y otra cepa es probablemente *Klebsiella Pneumoniae*.

9. REFERENCIAS

- Atlabachew, T., & Mamo, J. (2021). Microbiological quality of meat and swabs from contact surface in butcher shops in Debre Berhan, Ethiopia. *Journal of Food Quality*, 2021, 7520882.
- Bacon, R. T., & Sofos, J. N. (2003). Characteristics of biological hazards in foods. *Food safety handbook*, 10, 157–95.
- Barlow, S. M., Boobis, A. R., Bridges, J., Cockburn, A., Dekant, W., Hepburn, P., . . . others. (2015). The role of hazard-and risk-based approaches in ensuring food safety. *Trends in Food Science & Technology*, 46, 176–188.
- Bintsis, T. (2017). Foodborne pathogens. *AIMS microbiology*, 3, 529.
- Bintsis, T. (2018). Microbial pollution and food safety. *AIMS microbiology*, 4, 377.
- Bordenave, G. (2003). Louis Pasteur (1822–1895). *Microbes and infection*, 5, 553–560.
- Capouya, R., Mitchell, T., Clark, D. I., Clark, D. L., Bass, P., Capouya, R. D., & Bass, P. D. (2020). A survey of microbial communities on dry-aged beef in commercial meat processing facilities. *Meat and Muscle Biology*, 4.
- Carstens, C. K., Salazar, J. K., & Darkoh, C. (2019). Multistate outbreaks of foodborne illness in the United States associated with fresh produce from 2010 to 2017. *Frontiers in microbiology*, 10, 2667.
- Corry, J. E., Curtis, G. D., & Baird, R. M. (1996). *Culture media for food microbiology*. Elsevier.
- Dewey-Mattia, D. (2018). Surveillance for foodborne disease outbreaks—United States, 2009–2015. *MMWR. Surveillance Summaries*, 67.
- Drobniewski, F. A. (1993). Bacillus cereus and related species. *Clinical microbiology reviews*, 6, 324–338.
- García, A., Fox, J. G., & Besser, T. E. (2010). Zoonotic enterohemorrhagic Escherichia coli: a one health perspective. *Ilar Journal*, 51, 221–232.
- Godínez-Oviedo, A., Sampedro, F., Bowman, J. P., Garcés-Vega, F. J., & Hernández-Iturriaga, M. (2022). Genotypic and phenotypic quantitative microbial risk assessment model of human salmonellosis related to the consumption of chicken meat in the central region of Mexico. *Food Research International*, 162, 111901.
- Gourama, H. (2020). Foodborne pathogens. En *Food safety engineering* (págs. 25–49). Springer.
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of clinical microbiology*, 45, 2761–2764.

- Jensen, M. A., Webster, J. A., & Straus, N. (1993). Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Applied and environmental microbiology*, *59*, 945–952.
- Kim, C., Stein, R. A., & Pao, S. (2015). Comparison of the microbial quality of lamb and goat meat acquired from internet and local retail markets. *Journal of food protection*, *78*, 1980–1987.
- Lai, Y.-H., Chung, Y.-A., Wu, Y.-C., Fang, C.-T., & Chen, P.-J. (2020). Disease burden from foodborne illnesses in Taiwan, 2012–2015. *Journal of the Formosan Medical Association*, *119*, 1372–1381.
- Madoroba, E., Magwedere, K., Chaora, N. S., Matle, I., Muchadeyi, F., Mathole, M. A., & Pierneef, R. (2021). Microbial communities of meat and meat products: An exploratory analysis of the product quality and safety at selected enterprises in South Africa. *Microorganisms*, *9*, 507.
- Méndez-León, J. I., Bellanti, J. A., Leyva-Rendón, A., & Majluf-Cruz, A. (2021). *Inmunoglobulina Humana*. Ergon.
- Navarro, A., Cauich-Sánchez, P. I., Trejo, A., Gutiérrez, A., Díaz, S. P., Díaz C, M., . . . Eslava, C. (2018). Characterization of diarrheagenic strains of *Escherichia coli* isolated from cattle raised in three regions of Mexico. *Frontiers in microbiology*, *9*, 2373.
- Ndahebwa Muhonja, C., Magoma, G., Imbuga, M., & Makonde, H. M. (2018). Molecular characterization of low-density polyethylene (LDPE) degrading bacteria and fungi from Dandora dumpsite, Nairobi, Kenya. *International journal of microbiology*, *2018*, 4167845.
- of American Bacteriologists. Committee on Bacteriological Technic, S., Pelczar, M. J., Bard, R. C., & Burnett, G. W. (1957). *Manual of microbiological methods*. McGraw-Hill Book Company.
- Overmann, J. (2015). Significance and future role of microbial resource centers. *Systematic and applied microbiology*, *38*, 258–265.
- Peruzy, M. F., Murru, N., Yu, Z., Kerkhof, P.-J., Neola, B., Joossens, M., . . . Houf, K. (2019). Assessment of microbial communities on freshly killed wild boar meat by MALDI-TOF MS and 16S rRNA amplicon sequencing. *International journal of food microbiology*, *301*, 51–60.
- Popa, G. L., & Papa, M. I. (2021). *Salmonella* spp. infection-a continuous threat worldwide. *Germs*, *11*, 88.
- Rios, E. A., & others. (2018). Incidencia y control de tipos patógenos de *Escherichia coli* (STEC y EPEC) en leche de vaca y quesos derivados en Castilla y León= Occurrence and control of pathogenic types of *Escherichia coli* (STEC and EPEC) in cow's milk and cheese in Castilla y León.
- Saito, D., de Toledo Leonardo, R., Rodrigues, J. L., Tsai, S. M., Höfling, J. F., & Gonçalves, R. B. (2006). Identification of bacteria in endodontic infections by sequence analysis of 16S rDNA clone libraries. *Journal of medical microbiology*, *55*, 101–107.

- Schenk, J. J., Becklund, L. E., Carey, S. J., & Fabre, P. P. (2023). What is the “modified” CTAB protocol? Characterizing modifications to the CTAB DNA extraction protocol. *Applications in Plant Sciences*, *11*, e11517.
- Slifko, T. R., Smith, H. V., & Rose, J. B. (2000). Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *International journal for parasitology*, *30*, 1379–1393.
- Zwirzitz, B., Wetzels, S. U., Dixon, E. D., Stessl, B., Zaiser, A., Rabanser, I., . . . others. (2020). The sources and transmission routes of microbial populations throughout a meat processing facility. *npj Biofilms and Microbiomes*, *6*, 26.