



UACAM
Universidad Autónoma de Campeche



CONAHCYT
CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS



Centro de Investigación en
Materiales Avanzados, S.C.



UNIVERSIDAD DE
GUADALAJARA

Análisis microbiológico de muestras de filete de pescado, secados mediante energía termosolar

GRUPO DE TRABAJO DEL PROYECTO: “Planta comunitaria para el secado de productos pesqueros operada con energía termosolar para su integración en comunidades rurales”, número de aprobación CONAHCYT 319524



ÍNDICE

CONTENIDO

3	PRESENTACIÓN	1
4	INTRODUCCIÓN	2
5	MÉTODOS	3
5.1	CUENTA DE MICROORGANISMOS COLIFORMES TOTALES EN PLACA	3
5.1.1	<i>Cuenta de microorganismos coliformes totales en placa</i>	3
5.1.2	<i>Preparación de la dilución primaria y diluciones de las muestras</i>	3
5.1.3	<i>Preparación de medio de cultivo para la detección de coliformes totales en placa</i>	5
5.1.4	<i>Pruebas bioquímicas adicionales: prueba de catalasa y oxidasa</i>	6
5.2	MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE <i>SALMONELLA</i> EN ALIMENTOS	7
5.2.1	<i>Preenriquecimiento de las muestras de filete seco de pescado</i>	7
5.2.2	<i>Enriquecimiento selectivo de las muestras de filete seco de pescado</i>	8
5.2.3	<i>Selección en medios sólido para la identificación de Salmonella en las muestras de filete seco de pescado</i>	8
5.2.4	<i>Identificación bioquímica de Salmonella en las muestras de filete seco de pescado</i>	10
5.2.5	<i>Serotipificación de las colonias sospechosas de Salmonella de las muestras de filete seco de pescado</i> . 12	
5.3	MÉTODO APROBADO PARA LA ESTIMACIÓN DE LA DENSIDAD DE <i>E. COLI</i> POR LA TÉCNICA DEL NMP, PARA PRODUCTOS DE LA PESCA.	13
6	RESULTADOS	15
6.1	COLIFORMES TOTALES EN PLACA	15
6.2	DETERMINACIÓN DE <i>SALMONELLA</i>	17
6.3	DENSIDAD DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> EN FILETE SECO DE PESCADO.	29
7	CONCLUSIÓN	31
8	REFERENCIAS	32

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Diagrama del proceso de la preparación de diluciones primarias y diluciones para el análisis microbiológico de las muestras de filete seco de pescado.....	5
Figura 2 Diagrama del proceso para la inoculación de cada muestra en el medio de cultivo Agar Bilis y Rojo Violeta (ABRV)	6
Figura 3 Esquema generalizado de los pasos para la determinación de Salmonella en alimentos.....	7
Figura 4 Diagrama generalizado del preenriquecimiento de las muestras de filete seco de pescado.	8
Figura 5 Diagrama general del proceso de siembra en placa para el aislamiento de Salmonella de las muestras de filete seco de pescado	10
Figura 6 Diagrama general del proceso de inoculación para las pruebas bioquímicas de colonias sospechosas de Salmonella de muestras de filete seco de pescado.....	12
Figura 7 Diagrama general del proceso de serotipificación de las colonias sospechosas de Salmonella de las muestras de filete seco de pescado	13
Figura 8 Diagrama general del proceso de estimación de la densidad de Escherichia coli de las muestras de filete seco de pescado.....	14
Figura 9 UFC/g de muestra analizada en placa de agar rojo violeta bilis, incubados a 35°C durante 24 h, obtenidas para coliformes totales de las muestras de filete seco de pescado. 15	
Figura 10 Morfología colonial de coliformes totales en placas de Agar Rojo Violeta Bilis.	16
Figura 11 a) Prueba catalasa positiva realizada de manera directa sobre la colonia bacteriana y b) prueba oxidasa negativa realizada sobre papel filtro	16
Figura 12 Colonias bacterianas aisladas en los medios selectivos de la muestra 1 de filete seco de pescado.	18
Figura 13 Pruebas bioquímicas de la muestra 1 de filete seco de pescado, aisladas de los medios a) Agar Xilosa Lisina Desoxicolato, b) Agar Verde Brillante y c) Agar Salmonella y Shigella.	19
Figura 14 Colonias bacterianas aisladas en los medios selectivos de la muestra 2 de filete seco de pescado.	21
Figura 15 Pruebas bioquímicas de la muestra 2 de filete seco de pescado, aisladas de los medios a) Agar Xilosa Lisina, b) Agar Verde Brillante y c) Agar Salmonella y Shigella... 22	
Figura 16 Colonias bacterianas aisladas en los medios selectivos de la muestra 3 de filete seco de pescado.	23

Figura 17 Colonias bacterianas características de Salmonella aisladas en a) Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) y b) Agar Verde Brillante (AVB) provenientes del medio de enriquecimiento caldo tetracionato. Las flechas de color negro indican las colonias desarrolladas	24
Figura 18 Pruebas bioquímicas de la muestra 3 de filete seco de pescado de las colonias aisladas de los medios diferenciales: a) Agar Xilosa Lisina Desoxicolato, b) Agar Verde Brillante y c) Agar Salmonella y Shigella.	25
Figura 19 Colonias bacterianas aisladas en los medios selectivos de la muestra 4 de filete seco de pescado.	26
Figura 20 Pruebas bioquímicas de las colonias bacterianas provenientes de la muestra 4 de filete seco de pescado de los medios selectivos a) Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD), b) Agar Verde Brillante (AVB) y c) Agar Salmonella y Shigella.	27
Figura 21 Prueba de aglutinamiento para la determinación de Salmonella en filete seco de pescado.	28
Figura 22 Confirmación de Escherichia coli en placas de Agar TBX (Tryptona-Bilis-X-Glucurónido).	30

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Nomenclatura empleada para la clasificación de las muestras de pescado seco.	3
Tabla 2 Descripción de colonias típicas de Salmonella esperadas de acuerdo con el medio de cultivo sólido empleado. Establecida en la NOM-242-SSA1-2009.	9
Tabla 3 Resultados esperados de las pruebas bioquímicas para Salmonella de acuerdo con el medio de cultivo sólido empleado. Establecida en la NOM-242-SSA1-2009.	11
Tabla 4 Contraste de la densidad bacteriana de coliformes totales obtenidos para las muestras analizadas ante los límites máximos permisibles.	17
Tabla 5 Número Más Probable obtenido de los filetes secos de pescado contrastado con los valores máximos de la NOM-210-SSA1-2014.	29

1 PRESENTACIÓN

El presente protocolo para el análisis de muestras de filete de pescado secado mediante tecnología solar representa uno de los entregables del proyecto “Planta comunitaria para el secado de productos pesqueros operada con energía termosolar para su integración en comunidades rurales” con clave 319524.

El presente informe se basa de manera fundamental en la implementación de metodologías selectas enunciadas por las Normas Oficiales Mexicanas: NOM-242-SSA1-2009 Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba y la NOM-210-SSA1-2014: Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos, para el análisis microbiológico de carne pescado. El objetivo del presente informe fue el de implementar estas metodologías selectas para analizar las muestras de filete de pescado obtenido mediante el proceso de tecnología de secado solar. Para ello, se seleccionaron y se utilizaron tres de las metodologías propuestas por las normas mexicanas previamente mencionadas, siendo el primero método la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa, el segundo, el método para la determinación de Salmonella en alimentos y el tercero la estimación de la densidad de Escherichia coli por la técnica del NMP para productos de la pesca.

Por lo anterior, el presente informe describe los análisis microbiológicos realizadas a las muestras de filete de pescado secados por tecnología solar, así como también los resultados de estos análisis.

2 INTRODUCCIÓN

La calidad sanitaria es un factor primordial para el aseguramiento de la calidad alimentaria, y en la mayoría de los casos esta calidad dependerá en gran medida de la higiene a la que está sometida la cadena productiva del alimento. Si no se regula o se controla, la calidad de los productos alimenticios se ve mermada y como consecuencia se producen enfermedades causadas por la ingesta de alimentos mal procesados o pobremente preparados (Vásquez-Ampuero et al., 2018; Rondón et al., 2020). Se estima que todos los años alrededor del mundo 48 millones de personas contraen una enfermedad transmitida por los alimentos, de los cuales 128 000 son hospitalizados y 3000 fallecen. La mayoría de estas infecciones son ocasionadas por microorganismos tales como *Salmonella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, entre otros patógenos al ser humano (CDC, 2023), por lo que el control microbiológico en los alimentos es determinante para reducir los factores de riesgo que influyen en la transmisión de las enfermedades ocasionadas por microorganismos patógenos al ser humano (Félix-Fuentes et al., 2005).

Actualmente, se cuenta con una variedad de métodos de prueba que permiten monitorear los microorganismos presentes en los alimentos, y cada país establece sus propias normas oficiales que rigen la calidad sanitaria de sus productos alimenticios. En México se cuenta con las Normas Oficiales Mexicanas las cuales establecen los límites máximos de los microorganismos permitidos en los alimentos de consumo. Existe una amplia variedad de Normas Oficiales Mexicanas relacionadas a los alimentos, no obstante, la adecuada elección e implementación dependerá de la naturaleza del alimento a analizar (COFEPRIS, 2023). Una de las normas de interés primordial es la relacionada a los productos de la pesca, ya que el consumo de recursos marinos desempeña una función importante en la soberanía alimentaria y la nutrición al proporcionar alimentos e ingresos económicos de la población (Flores Monter y Crespo Guerrero, 2023). Además, el consumo de productos marinos como el pescado en mal estado puede ocasionar serios problemas a la salud de los consumidores. Por ejemplo, se ha registrado que en la carne de pescado los microorganismos bacterianos patógenos causantes de enfermedades para los humanos que se transmiten frecuentemente son *Escherichia coli* y *Salmonella* sp., principalmente debido a la contaminación con material fecal del agua asociada al proceso de manipulación que sufre el pescado posterior a su captura (Rondón et al., 2020). Las normas oficiales que atienden la calidad de los productos de la pesca son varias de las cuales se destaca la NOM-129-SSA1-1995 para los límites permisibles de coliformes totales, la NOM-242-SSA1-2009 que establece los límites permisibles para *Salmonella*, y la NOM-210-SSA1-2014 para los límites máximos permisibles para *E. coli*.

Dicho lo anterior, haciendo uso de las Normas Oficiales Mexicanas enunciadas, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar la cuantificación de coliformes totales, la presencia de *Salmonella* y de la estimación de la densidad de *E. coli* a través de la técnica del Número Más Probable para filetes de pescado secados a través de tecnología termosolar.

3 MÉTODOS

3.1 CUENTA DE MICROORGANISMOS COLIFORMES TOTALES EN PLACA

3.1.1 *Cuenta de microorganismos coliformes totales en placa*

De manera inicial, para el procesado de las muestras de filete seco de pescado fue requerida la preparación de soluciones diluyentes, una solución reguladora de fosfato y una de agua peptonada. Estas soluciones fueron preparadas de la siguiente manera: para la solución reguladora de fosfato se pesaron 34 g de fosfato de sodio monobásico y se diluyó en 500 ml de agua destilada, posteriormente se ajustó el pH a 7.2 con hidróxido de sodio 1 N. Posteriormente se aforó a 1 L con agua destilada y se esterilizó durante 15 minutos a $121^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$. A la solución resultante se le denominó como “Solución concentrada”. De la solución concentrada se tomaron 1.25 ml y se llevó a 1 L para obtener la “Solución de trabajo”. De la solución de trabajo se tomaron 90 ml y se colocaron en matraces Erlenmeyer para después mantenerlos en refrigeración hasta su uso. Similar a este proceso se obtuvo la solución diluyente de agua peptonada. Para ello, se pesó 1 g de peptona de caseína, 8.5 g Erlenmeyer forrados con papel aluminio. Se esterilizó a $121^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ durante 15 minutos, se dejó enfriar y se mantuvo en refrigeración entre 0 a 5 °C hasta su uso. de cloruro de sodio (NaCl) y se disolvieron en 1 L de agua destilada. Se ajustó el pH a 7 ± 0.1 con hidróxido de sodio 1 N y/o ácido clorhídrico 1 N y se dividió en 90 ml en matraces

3.1.2 *Preparación de la dilución primaria y diluciones de las muestras.*

Se trabajó con 4 muestras de filete seco de pescado, las cuales se denominaron de la siguiente manera:

Tabla 1 Nomenclatura empleada para la clasificación de las muestras de pescado seco.

No.	Nombre de las muestras secas recibidas	Denominación asignada
1	Bosh 2	Muestra 1
2	Bosh 4	Muestra 2

No.	Nombre de las muestras secas recibidas	Denominación asignada
3	Chac-Chi 5	Muestra 3
4	Chac-Chi 7	Muestra 4

De cada una de las muestras de filete seco de pescado se tomaron de manera aséptica 10 gramos para la cuenta de coliformes totales en placa y para la estimación de la densidad de E. coli por la técnica del NMP (número más probable) y 25 gramos para detección de Salmonella. Todo el material utilizado se esterilizó y desinfectó con Etanol al 70% para evitar la contaminación cruzada. Posteriormente la cantidad pesada se colocó en contenedores de licuadora estériles a los cuales se les agregó 90 ml de la solución diluyente de fosfato (solución de trabajo) y agua peptonada (Ver sec. 3.1.1.). Las muestras fueron licuadas por un periodo de 1 minuto hasta su homogenización y se dejó reposar para permitir la sedimentación de las partículas grandes. Durante este lapso de tiempo, se prepararon un total 6 tubos de ensayo con 9 ml de las soluciones diluyentes estéril (6 para la solución reguladora de fosfato y 6 para la solución de agua peptonada) así como dos tubos adicionales como control. Posteriormente de la mezcla resultante licuada se transfirió 1 ml a dos tubos que contenía 9 ml de la solución diluyente haciendo de esta manera una dilución 10-1 o 10¹, así hasta obtener la dilución final de 10⁶. Los tubos con la dilución resultante se homogeneizaron con 25 movimientos de arriba abajo en un arco de 30 cm efectuados en un tiempo de 7

segundos. Finalmente, una vez homogeneizada la muestra se dejó reposar hasta su uso (Fig. 1).

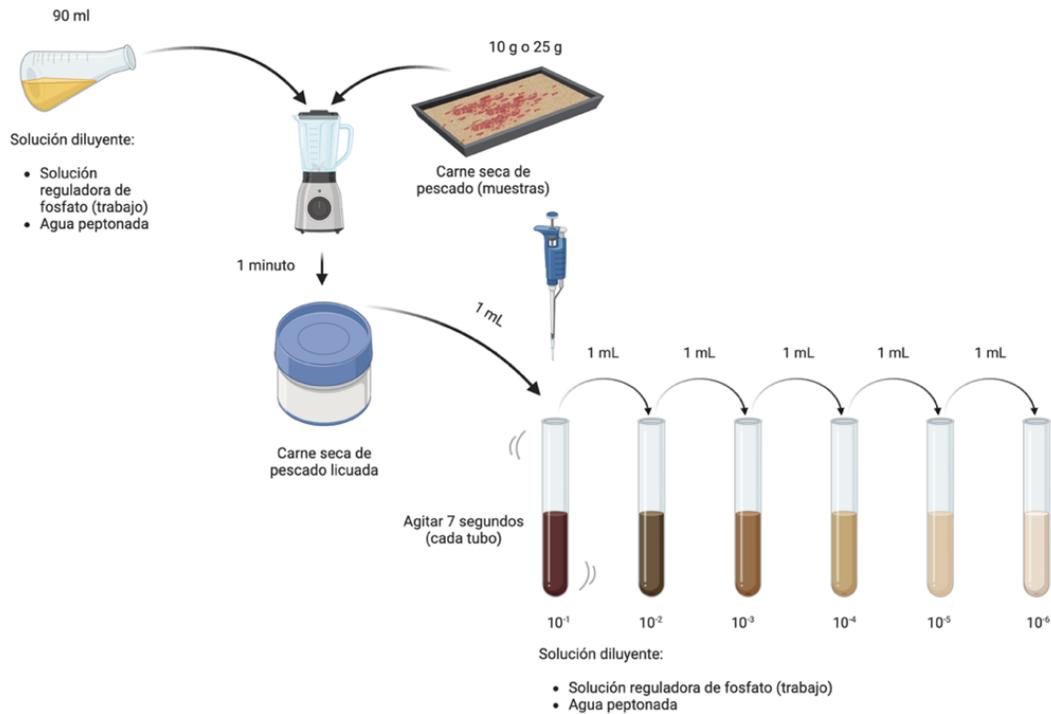


Figura 1 Diagrama del proceso de la preparación de diluciones primarias y diluciones para el análisis microbiológico de las muestras de filete seco de pescado.

3.1.3 Preparación de medio de cultivo para la detección de coliformes totales en placa

El medio de cultivo selectivo para la cuenta de bacterias coliformes totales fue el medio Agar Bilis y Rojo Violeta (ABRV) de la marca MCD LAB S.A. de C.V. La preparación del medio fue acorde a las especificaciones del fabricante. Una vez esterilizado el medio de cultivo se colocó en un baño maría (Shel Lab) a una temperatura de 45 ± 1.0 °C hasta su uso, esto con el objetivo de enfriarlo y asegurar la viabilidad del inóculo microbiano proveniente de la muestra de filete seco licuada y diluida. Posteriormente se colocaron 15 ml de medio en una caja de Petri por triplicado, tratando de no exceder 20 minutos después de preparadas las soluciones primarias y las diluciones (ver sec. 3.1.2.), seguidamente se tomó 1 ml de la dilución y se colocó en el medio de cultivo de la caja de Petri, se mezcló de acuerdo a lo mencionado en la NOM-242-SSA1-2009, con seis movimientos de derecha a izquierda y seis movimientos en el sentido de las manecillas del reloj, seis de atrás hacia delante sobre una superficie lisa y nivelada, esto con el objetivo de homogenizar y dispersar el inóculo en el medio de cultivo. Se repitió el procedimiento para cada una de las diluciones preparadas. Se dejaron reposar las cajas hasta que se solidificaran para después verter nuevamente 4 ml del

medio de cultivo. Finalmente se dejó solidificar para dejar en incubación a 35 °C durante 24 horas. Pasado el tiempo se registró la cantidad de UFCs desarrolladas (Fig. 2).

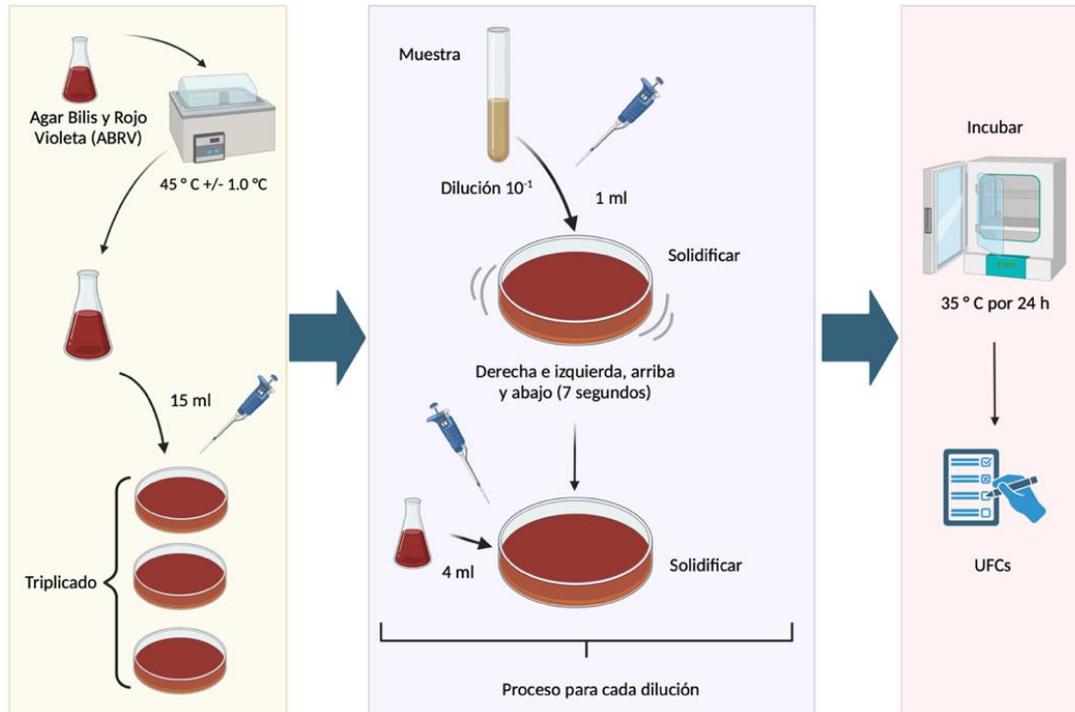


Figura 2 Diagrama del proceso para la inoculación de cada muestra en el medio de cultivo Agar Bilis y Rojo Violeta (ABRV)

3.1.4 Pruebas bioquímicas adicionales: prueba de catalasa y oxidasa.

Una vez desarrollado el crecimiento bacteriano en las placas de Agar Bilis y Rojo Violeta, se realizaron dos pruebas bioquímicas complementarias confirmativas para la detección de integrantes de la familia Entrobacteriaceae: la prueba oxidasa y la prueba catalasa, ya que *E. coli* pertenece a esta familia de bacterias. La prueba catalasa consistió en seleccionar una colonia bacteriana característica y agregarle una gota de agua oxigenada (H_2O_2) a 10 volúmenes, se considera positiva la prueba si se presentó efervescencia y negativa si no hay reacción. Para la prueba oxidasa se cortaron trozos cuadrados de 3 x 1 cm de papel filtro, se añadió una gota de reactivo oxidasa de la marca Sigma Aldrich, se seleccionó una colonia característica de coliformes y con ayuda de un aplicador de madera se depositó sobre el reactivo oxidasa. Se consideró como positiva si se presenta el indicador de color azul-violeta intenso antes de los 10 segundos de su aplicación, si se presenta coloración después de este tiempo se debe de considerar negativa la prueba, ya que el reactivo reacciona al oxígeno y la luz.

3.2 MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE *SALMONELLA* EN ALIMENTOS

La presente técnica para la detección de *Salmonella* en alimentos describe un esquema general que consiste en 5 pasos básicos:



Figura 3 Esquema generalizado de los pasos para la determinación de *Salmonella* en alimentos.

3.2.1 Preenriquecimiento de las muestras de filete seco de pescado.

El preenriquecimiento, es el paso en dónde la muestra es enriquecida en un medio de cultivo no selectivo, lo que permite restaurar las células de *Salmonella* dañadas presentes a una condición fisiológica estable para su detección. Para ello se pesaron 25 g de cada una de las muestras de filete seco de pescado. El pesaje se realizó bajo las mismas condiciones asépticas que las descritas en la *sección 3.1.2.* y se colocó en un contenedor de licuadora previamente esterilizado. Posteriormente se añadieron 225 ml de caldo lactosado de la marca MCD Lab S.A. de C.V., el cual fue preparado de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La muestra se licuó por un minuto y se transfirió a un contenedor de mayor capacidad y de boca ancha con tapa de rosca para dejar reposar durante 60 minutos. Una vez pasado el tiempo de reposo se midió el pH para justar a 6.8 ± 0.2 con hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico 1N estériles. Una vez ajustado el pH de la muestra, se dejó en incubación por 24 h a 35°C (Fig. 3).

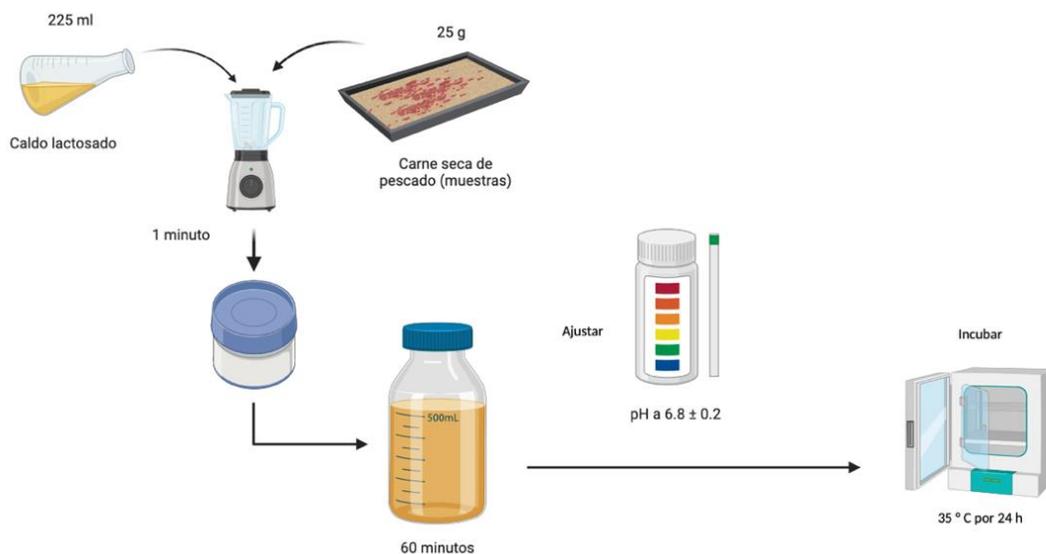


Figura 4 Diagrama generalizado del preenriquecimiento de las muestras de filete seco de pescado.

3.2.2 Enriquecimiento selectivo de las muestras de filete seco de pescado

El enriquecimiento selectivo es empleado con el propósito de incrementar las poblaciones de *Salmonella* presente en las muestras de filete seco de pescado, así como de inhibir otros organismos presentes en la muestra. Para ello, de manera preliminar se prepararon tubos con caldo tetrionato (MDC Lab S.A de C.V.) y caldo selenito cistina (Condalab), ambos como medios de enriquecimiento. Los caldos fueron preparados siguiendo las recomendaciones del fabricante. De manera adicional para el caldo tetrionato fue requerida la preparación de una solución de Yodo-Yoduro y una solución de verde brillante al 0.1%, los cuales fueron añadidos siguiendo la relación de 2 ml de la solución de Yodo-Yoduro y 1 ml de la solución de verde brillante al 0.1 % por cada 100 ml de caldo. Ambos caldos se dispensaron en tubos de ensayo por triplicado con un volumen final de 10 ml. Finalmente, de las muestras incubadas de la *sección 3.2.1.*, se agitaron y se tomó 1 ml de muestra para posteriormente inocular en cada uno de los tubos que contenían el caldo tetrionato y el caldo selenito cistina, dejándolos en incubación por 24 h a 35°C (Fig. 4).

3.2.3 Selección en medios sólido para la identificación de *Salmonella* en las muestras de filete seco de pescado.

En la selección en medio sólido se utilizan medios selectivos que restringen el crecimiento de otros géneros diferentes a *Salmonella* y permite el reconocimiento visual de las colonias sospechosas. Se seleccionaron tres medios de cultivo selectivos sólidos: 1) Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) de la marca Dibico, 2) Agar Verde Brillante (AVB) de la marca MCD Lab S.A. de C.V. y 3) Agar *Salmonella* y *Shigella* (ASS) de la marca MCD Lab S.A.

de C.V. La preparación de los agares se realizó de acuerdo con las especificaciones de cada uno de los fabricantes, para finalmente después de su preparación distribuir en placas de Petri estériles para su solidificación y su posterior uso. Se tomaron los tubos incubados previamente a 24 h en caldo tetrationato y caldo selenito cistina, se agitaron y se tomó un pequeño inóculo con el asa bacteriológica y se estrió en tres placas de agar de cada uno de los agares: XLD, AVB y ASS. Una vez finalizado el estriado, las placas de Petri fueron incubadas durante 24 h a 35°C. y junto a las placas estriadas se dejaron en incubación tres controles de cada agar para asegurar la esterilidad de los medios de cultivo (Fig. 5). Pasado el tiempo el resultado de las colonias desarrolladas fue contrastado con la siguiente tabla:

Tabla 2 Descripción de colonias típicas de *Salmonella* esperadas de acuerdo con el medio de cultivo sólido empleado. Establecida en la NOM-242-SSA1-2009.

Medio de cultivo	Descripción de colonias típicas de <i>Salmonella</i>
Agar Xilosa Lisina desoxicolato (XLD)	Colonias rosas o rojas que pueden ser transparentes con o sin centro negro. En algunos casos las colonias pueden aparecer completamente negras.
Agar Verde Brillante (AVB)	Colonias rojas o rosas que pueden ser transparentes rodeadas por medio enrojecido; las bacterias fermentadoras de la lactosa dan colonias amarillas.
Agar <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> (ASS)	Colonias translucidas, ocasionalmente opacas. Algunas dan centro negro. Las colonias fermentadoras de la lactosa son rojas.

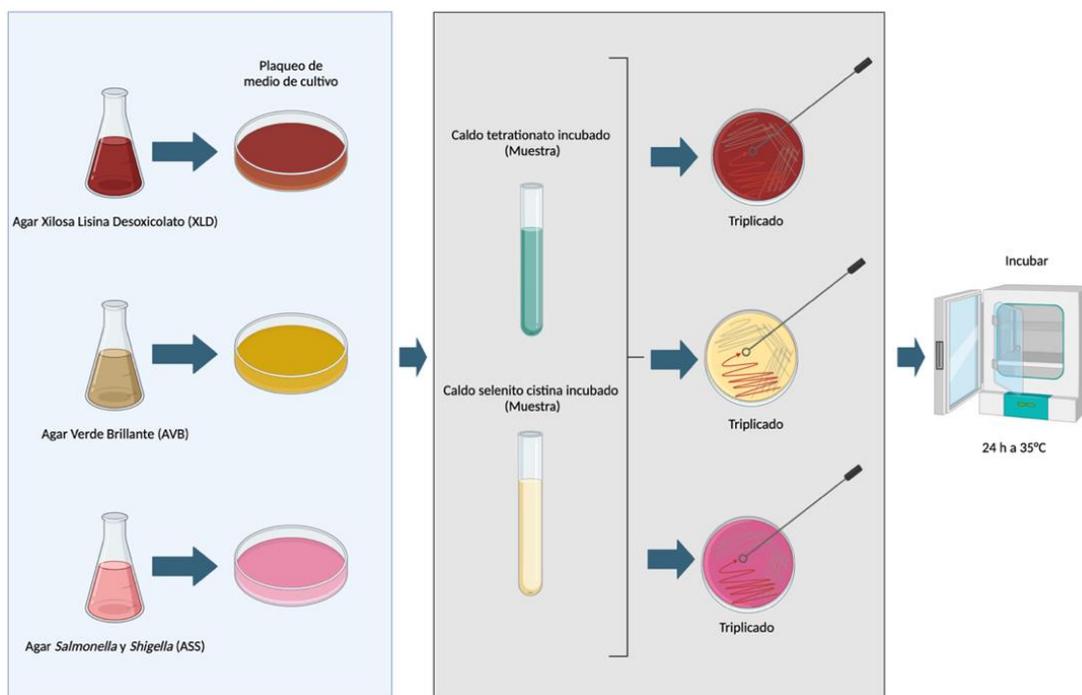


Figura 5 Diagrama general del proceso de siembra en placa para el aislamiento de *Salmonella* de las muestras de filete seco de pescado

3.2.4 Identificación bioquímica de *Salmonella* en las muestras de filete seco de pescado.

La identificación bioquímica permite reconocer de manera genérica los cultivos de *Salmonella* y de la eliminación de cultivos sospechosos falsos. Para la identificación bioquímica se utilizaron los medios de cultivo Agar Triple Azúcar Hierro (TSI) de la marca BD Bioxon y Agar Hierro Lisina (LIA) de la marca MCD Lab S.A. de C.V. Ambos medios se prepararon de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Posteriormente el medio fue dispuesto en tubos de ensayo y se dejó solidificar de manera inclinada. De las colonias desarrolladas en las placas de Petri incubadas (*Sección 3.2.3.*) y que cumplieron con la descripción de colonias sospechosas para *Salmonella* (Tabla 2), se tomaron con ayuda de un asa bacteriológica y se inocularon en los tubos con agar inclinado. Se realizó la punción en el fondo del tubo y el estriado en la superficie inclinada. Este procedimiento se realizó para cada una de las colonias sospechosas provenientes de cada una de las placas de agar XLD, AVB y ASS. Una vez realizada la inoculación y el estriado los tubos fueron incubados por 24 h a 35°C (Fig. 6). Pasado el tiempo de incubación el resultado de los tubos con agar inclinado fue contrastado con la siguiente tabla:

Tabla 3 Resultados esperados de las pruebas bioquímicas para Salmonella de acuerdo con el medio de cultivo sólido empleado. Establecida en la NOM-242-SSA1-2009.

Medio de cultivo (prueba bioquímica)	Descripción de la reacción en tubo con agar inclinado
Agar Triple Azúcar Hierro (TSI)	En el fondo del tubo se observa el vire del indicador debido a la fermentación de la glucosa; en la superficie del medio se observa un color rojo más intenso que el medio original debido a la no fermentación de la lactosa ni de la sacarosa. En la mayoría de los casos se observa colocación negra a lo largo de la punción debido a la producción de ácido sulfhídrico (H ₂ S).
Agar Hierro Lisina (LIA)	Se observa intensificación del color púrpura en todo el tubo por la descarboxilación de la lisina. Considerar negativos aquellos cultivos que produzcan claramente color amarillo en el fondo del agar. La mayoría de las cepas de <i>Salmonella</i> producen ácido sulfhídrico (H ₂ S) con ennegrecimiento a lo largo de la punción.

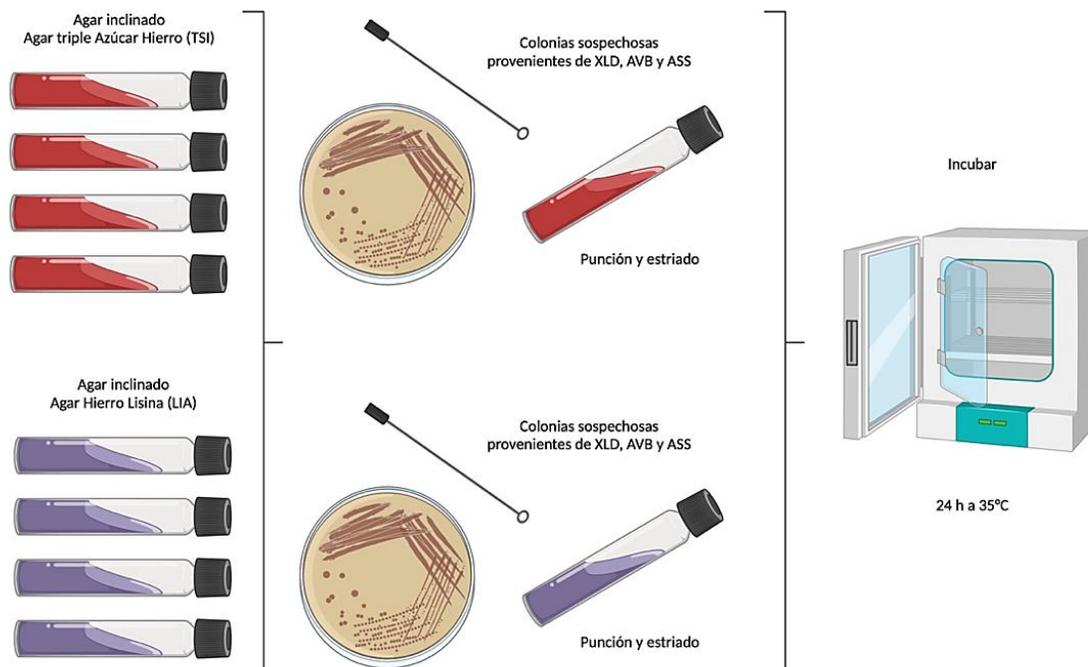


Figura 6 Diagrama general del proceso de inoculación para las pruebas bioquímicas de colonias sospechosas de *Salmonella* de muestras de filete seco de pescado

3.2.5 Serotipificación de las colonias sospechosas de *Salmonella* de las muestras de filete seco de pescado.

La Serotipificación de las colonias sospechosas, es una técnica serológica que permite la identificación específica de un cultivo de *Salmonella*. Como paso final y después de haber realizado el aislamiento en medios de cultivo selectivo y de haber realizado las pruebas bioquímicas, se realizó la serotipificación para confirmar la presencia de *Salmonella* en las muestras de filete seco de pescado. Para ello se empleó el antígeno somático de *Salmonella* (Antisuero polivalente O) de la marca BD Difco. Fue necesaria la reconstitución del antisuero, para lo cual se utilizaron 3 ml de solución salina estéril al 0.85% y se almacenó hasta su uso. Seguidamente en un portaobjetos se colocaron dos gotas de solución salina 0.85% estéril. De cada uno de los tubos donde se confirmó con las pruebas bioquímicas (TSI y LIA) la presencia de *Salmonella*, se tomó una porción de la colonia y se suspendió en las dos gotas de solución salina 0.85% del portaobjetos. A una de las gotas se le añadió una gota del antisuero polivalente somático (O) y con ayuda de un aplicador de madera se mezcló hasta homogeneizar. Seguidamente se agitó el portaobjetos inclinándolo hacia atrás y hacia adelante durante aproximadamente un minuto. Finalmente se dejó reposar y se observó el aglutinamiento de la muestra (Fig. 7).

De acuerdo con la *NOM-242-SSA1-2009* se consideró positiva la prueba cuando se presenta aglutinamiento en la gota con el cultivo y el antisuero y no aglutinamiento en la gota que contiene el cultivo y la solución salina 0.85%.

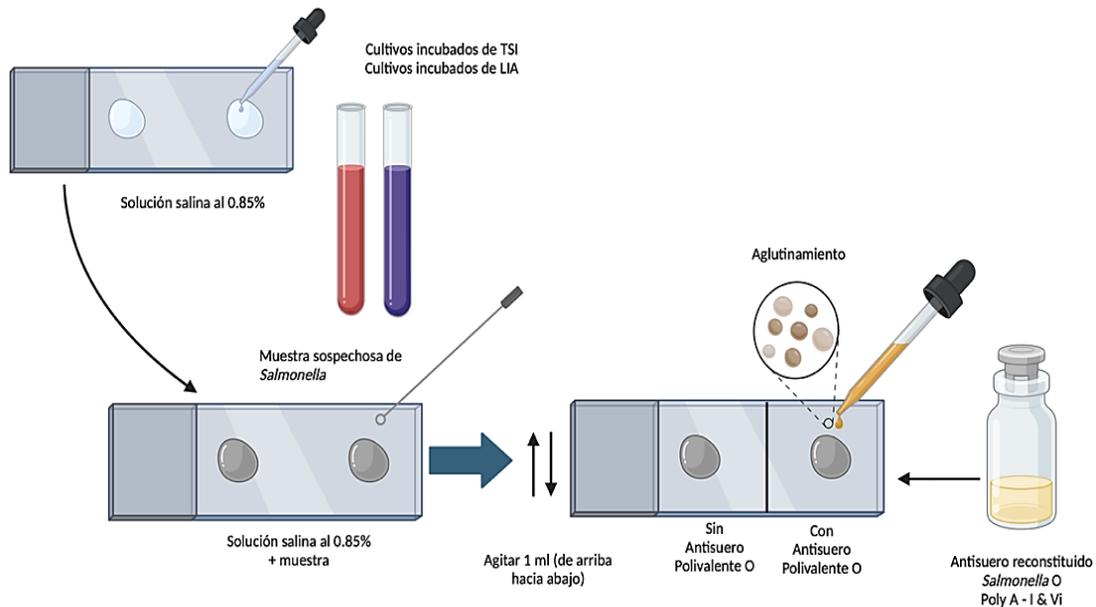


Figura 7 Diagrama general del proceso de serotipificación de las colonias sospechosas de *Salmonella* de las muestras de filete seco de pescado

3.3 MÉTODO APROBADO PARA LA ESTIMACIÓN DE LA DENSIDAD DE *E. COLI* POR LA TÉCNICA DEL NMP, PARA PRODUCTOS DE LA PESCA.

La estimación de la densidad de *Escherichia coli* en filetes secos de pescado consistió en dos etapas. La primera correspondió en el enriquecimiento de las muestras. Para ello se pesaron 10 g de filete seco de pescado de cada una de las muestras. El material utilizado se desinfectó con etanol al 70% así como los contenedores de licuadora utilizados fueron esterilizados a 121°C por 15 minutos para evitar la contaminación cruzada. Una vez pesadas las muestras se les agregó 90 ml de agua peptonada estéril y se licuó por un máximo de 1 minuto. Posteriormente se dejó sedimentar las partículas más grandes y de la superficie se tomaron 10 ml los cuales se mezclaron en un tubo de ensayo que contenía 10 ml de Caldo Glutamato con Minerales Modificado (MMGB) a doble concentración de la marca Sigma-Aldrich (dilución primaria). De la dilución primaria se obtuvieron 3 diluciones secundarias, para ello se tomó 1 ml de la dilución primaria y diluyó en 9 ml de MMGB a doble concentración. Este procedimiento se repitió hasta obtener una dilución 1:2000. De cada una de las diluciones secundarias a doble concentración se inocularon 3 tubos. Se tomó 1 ml de la dilución secundaria y se diluyó en 9 ml de MMGB a concentración simple. Se repitió el procedimiento para las diluciones secundarias restantes. Se mezclaron los tubos con el inóculo

cuidadosamente y se incubó a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 h. La segunda etapa correspondió a la comprobación de la presencia de *E. coli*, la cual consistió en observar la coloración de los tubos incubados y de los que mostraron presencia de coloración amarilla se estriaron en placas de Agar TBX (Triptona-Bilis-X-Glucurónico) de la marca Millipore, para obtener colonias aisladas. Las placas se incubaron a $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Después del periodo de incubación se registró la coloración de las colonias bacterianas desarrolladas. Se tomó como positivo para *E. coli* cuando las colonias presentaron una coloración azul-verdoso (oscuro o pálido) lo cual indicó la presencia de b-glucuronidasa (Fig. 9). Finalmente, con los datos obtenidos se estimó el Número Más Probable (NMP) por gramo de muestra analizada con base en la tabla de intervalos de confianza I.1 de la *NOM-210-SSA1-2014*.

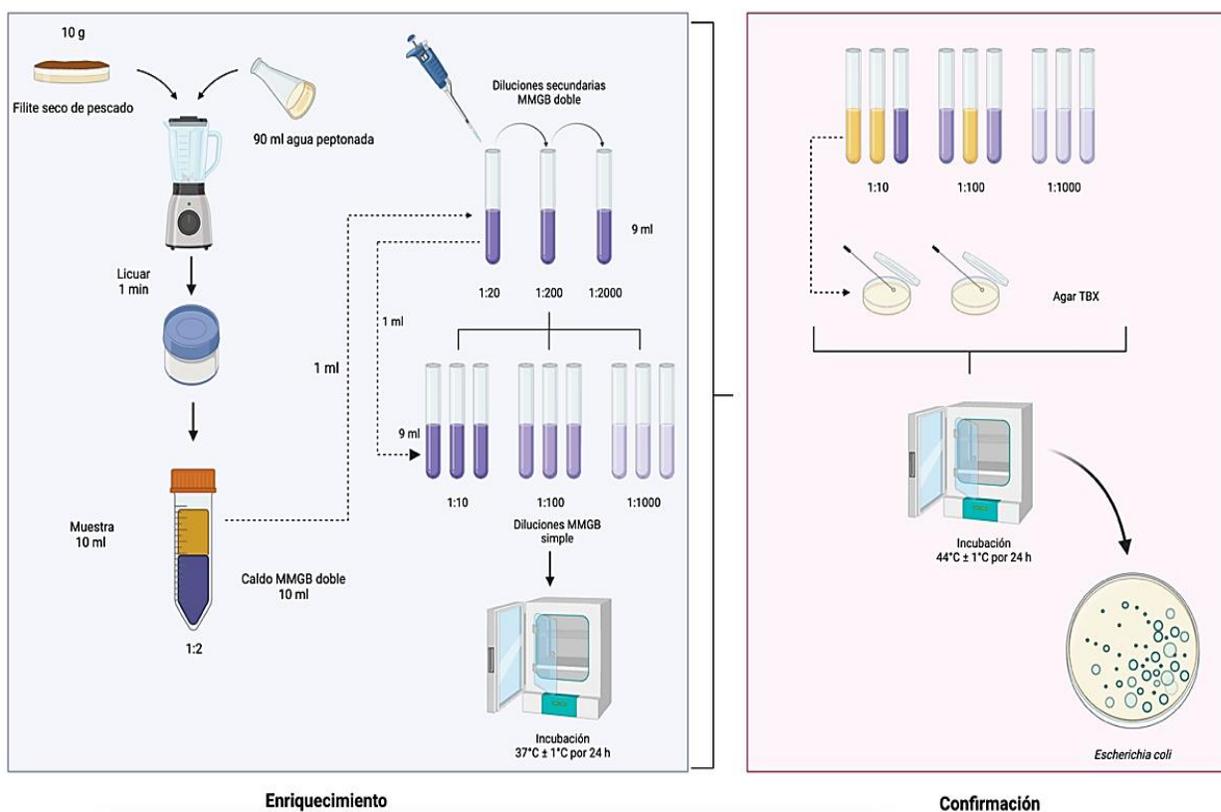


Figura 8 Diagrama general del proceso de estimación de la densidad de *Escherichia coli* de las muestras de filete seco de pescado.

4 RESULTADOS

4.1 COLIFORMES TOTALES EN PLACA.

Los resultados permitieron identificar que la densidad bacteriana de coliformes totales obtenidos para la **muestra 1** fue de 2.40×10^5 UFC/g de muestra analizada. Para la **muestra 2** se obtuvo una densidad celular bacteriana de 1.10×10^5 UFC/g de muestra analizada. La **muestra 3** presentó valores de 9.00×10^4 UFC/g de muestra analizada y la densidad bacteriana para la **muestra 4** fue de 3.53×10^4 UFC/g de muestra analizada (Fig. 10).

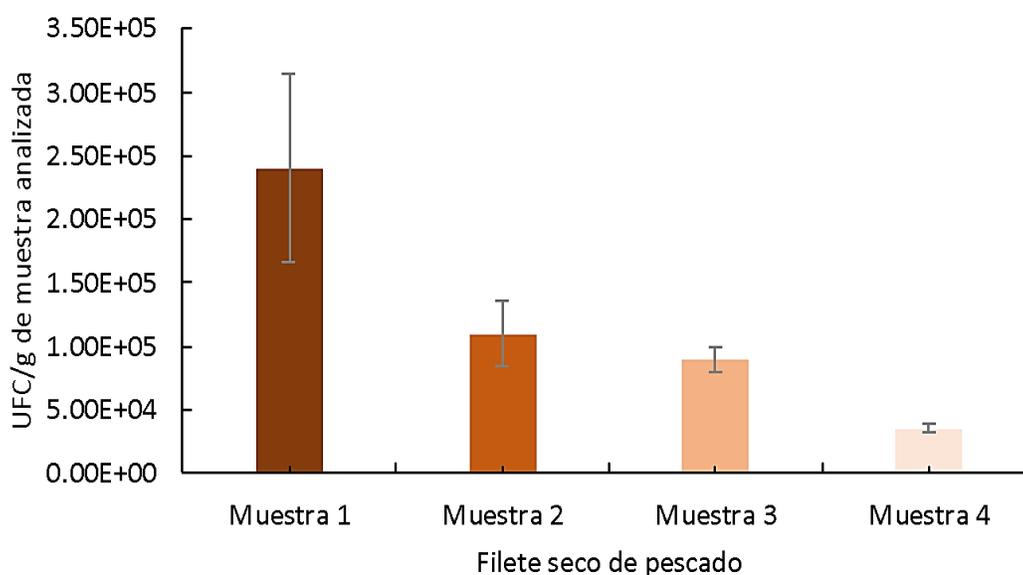


Figura 9 UFC/g de muestra analizada en placa de agar rojo violeta bilis, incubados a 35°C durante 24 h, obtenidas para coliformes totales de las muestras de filete seco de pescado.

La morfología colonial permitió corroborar que las colonias fueron típicas para coliformes totales, ya que presentaron una forma biconvexa de coloración rojo-oscura, rodeadas por un halo debido a la precipitación de las sales biliares el cual fue de color rojo claro a rosa (Fig. 11).

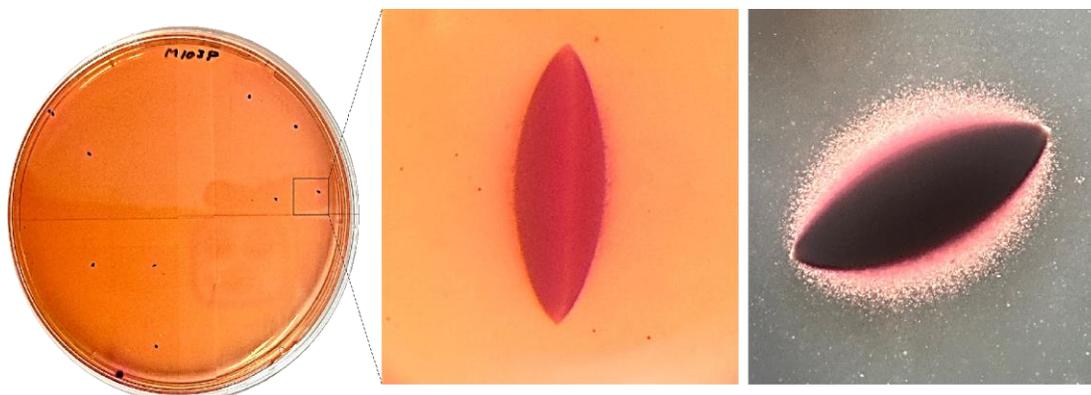


Figura 10 Morfología colonial de coliformes totales en placas de Agar Rojo Violeta Bilis.

Las pruebas bioquímicas adicionales de catalasa y oxidasa permitieron identificar que los coliformes totales aislados en el medio Agar Rojo Violeta Bilis fueron positivo para catalasa con la presencia de efervescencia (Fig. 12a) y negativo para oxidasa (Fig. 12b) debido a que no se presentó una coloración intensa azul-violeta. Con estos resultados se confirmó la pertenencia a bacterias de la familia Enterobacteriaceae (Fig. 11).

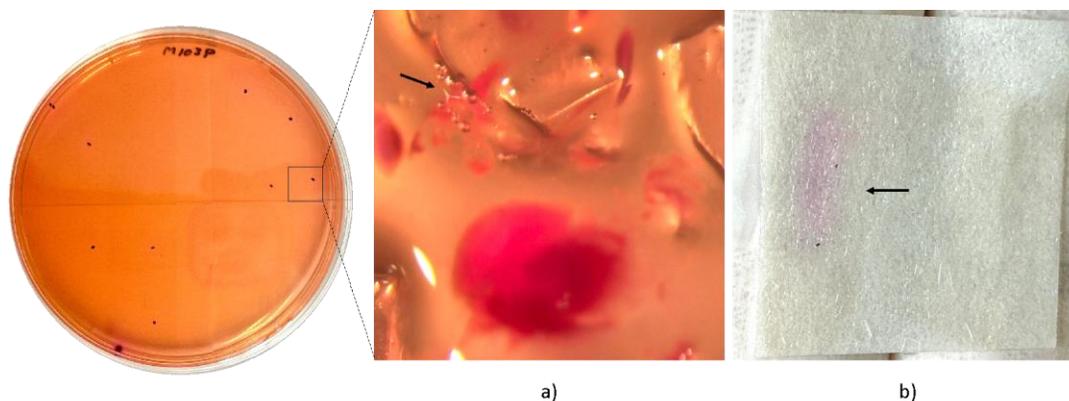


Figura 11 a) Prueba catalasa positiva realizada de manera directa sobre la colonia bacteriana y b) prueba oxidasa negativa realizada sobre papel filtro

Debido a que en la NOM-242-SSA1-2009 (vigente) no se especifica dentro de su estructura los límites máximos y mínimos para coliformes totales en UFC/g de muestra analizada para productos de la pesca, se tomó como referencia lo enunciado por la *NOM-129-SSA1-1995, Bienes y servicios. Productos de la pesca: secos-salados, ahumados, moluscos cefalópodos y gasterópodos frescos-refrigerados y congelados. Disposiciones y especificaciones*

sanitarias que establece el límite máximo permisible para UFC/g de muestra analizada. Con ello se pudo determinar que los valores obtenidos de coliformes totales no sobrepasaron el límite máximo permisible de 500,000 UFC/g o 5.0×10^5 UFC/g de mesófilos aerobios (Tabla 4).

Tabla 4 *Contraste de la densidad bacteriana de coliformes totales obtenidos para las muestras analizadas ante los límites máximos permisibles.*

Muestra	Promedio obtenido UFC/g de muestra	Límite máximo permisible UFC/g de muestra*
Muestra 1	240,000	500,000
Muestra 2	110,000	500,000
Muestra 3	90,000	500,000
Muestra 4	35,333	500,000

*Valor máximo permisible establecido en la *NOM-129-SSA1-1995, Bienes y servicios. Productos de la pesca: secos-salados, ahumados, moluscos cefalópodos y gasterópodos frescos-refrigerados y congelados. Disposiciones y especificaciones sanitarias.*

4.2 DETERMINACIÓN DE SALMONELLA.

Las pruebas para la determinación de *Salmonella* en filete seco de pescado permitieron identificar que para la **muestra 1**, no se presentó desarrollo de colonias típicas de *Salmonella* en ninguno de los medios de aislamiento selectivos Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD), Agar Verde Brillante (AVB) y Agar *Salmonella* y *Shigella* (ASS). Las colonias desarrolladas fueron exclusivamente de color amarillo en el XLD y el AVB, así como amarillo opaco y rosas en el ASS (Tabla 2). Es importante mencionar que este mismo comportamiento se obtuvo en los dos medios de enriquecimiento utilizados: caldo tetracionato y caldo selenito cistina (Fig. 13).

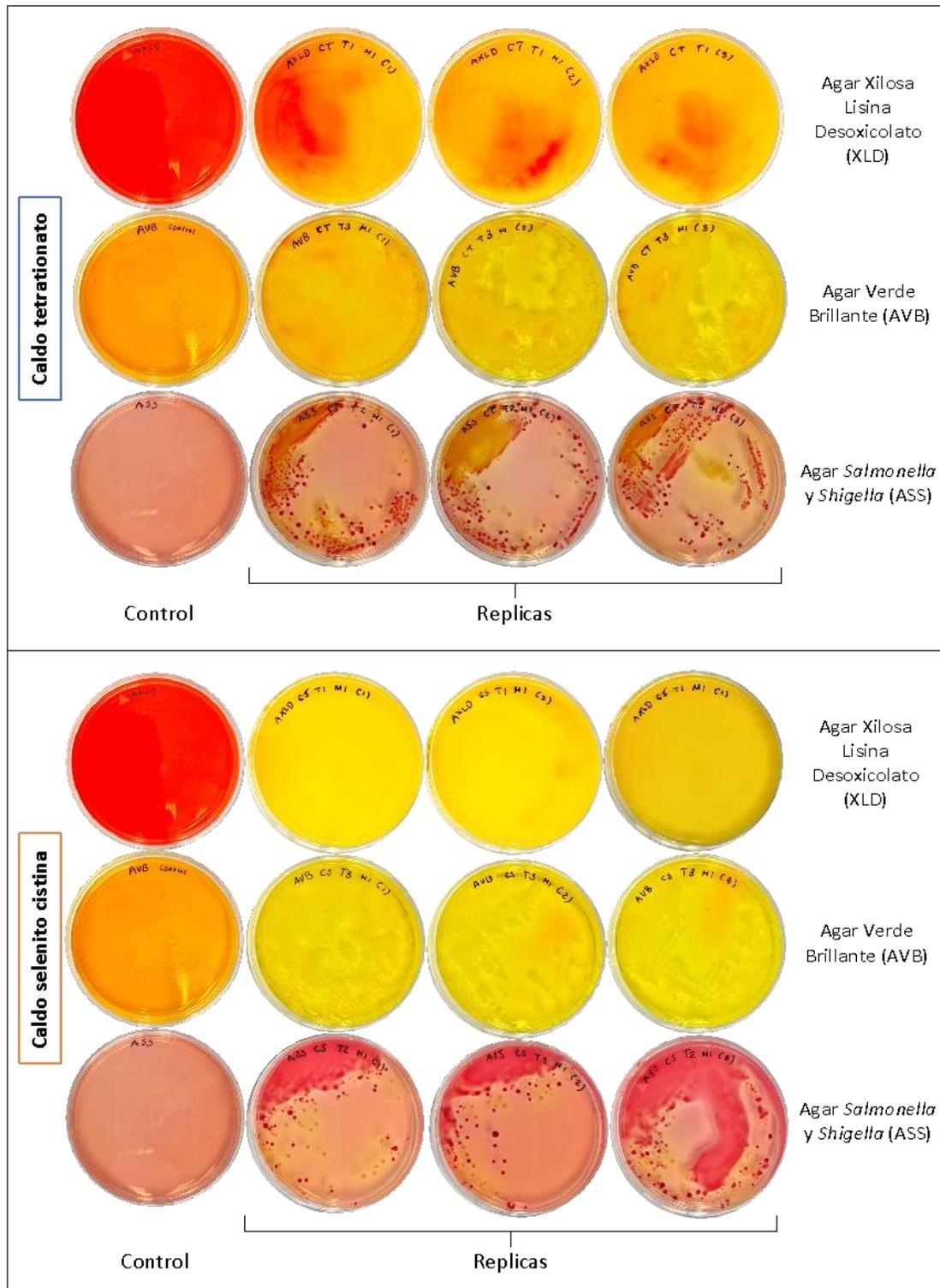


Figura 12 Colonias bacterianas aisladas en los medios selectivos de la muestra 1 de filete seco de pescado.

Las pruebas bioquímicas posteriores permitieron corroborar que las colonias bacterianas desarrolladas en los medios de aislamiento XLD, AVB y ASS de ambos medios de enriquecimiento fueron atípicas para *Salmonella* (Tabla 3), ya que en los medios indicadores Agar Triple Azúcar Hierro (TSI) y el Agar Hierro Lisina (LIA) la coloración de las colonias tanto en el fondo de los tubos como en la superficie inclinada fueron de color amarillo, no característico para *Salmonella*. No obstante, es importante resaltar que las colonias bacterianas desarrolladas son fermentadoras de la glucosa ya que el indicador de pH del medio agar cambió a un amarillo intenso en el fondo y en la superficie en el agar TSI, y amarillo en el fondo del agar LIA (Fig. 14).

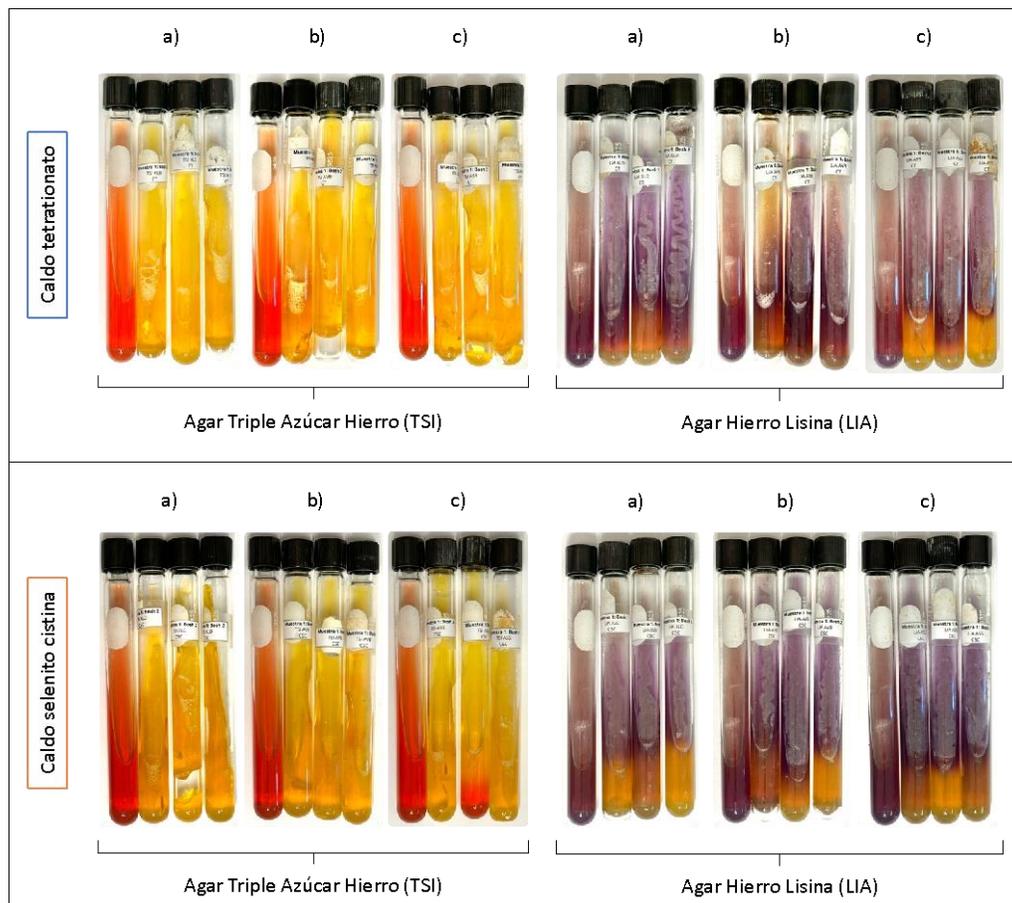


Figura 13 Pruebas bioquímicas de la muestra 1 de filete seco de pescado, aisladas de los medios a) Agar Xilosa Lisina Desoxicolato, b) Agar Verde Brillante y c) Agar Salmonella y Shigella.

Las colonias bacterianas aisladas de la **muestra 2** presentaron el mismo patrón de coloración que la muestra 1. En el Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) y el Agar Verde Brillante (AVB) fueron atípicas para *Salmonella*, ya que presentaron una coloración amarilla, no característica. Por su parte las colonias bacterianas desarrolladas en el Agar *Salmonella* y *Shigella*, presentaron una coloración rosa y amarilla opaca. Este patrón de coloración se presentó para los aislados de ambos medios de enriquecimiento: caldo tetracionato y caldo selenito cistina. Es importante destacar que las colonias bacterianas provenientes del caldo selenito cistina fueron menos abundantes que las del caldo tetracionato, en algunos casos ausentes como en el Agar *Salmonella* y *Shigella* donde no se presentó desarrollo bacteriano (Fig. 15).

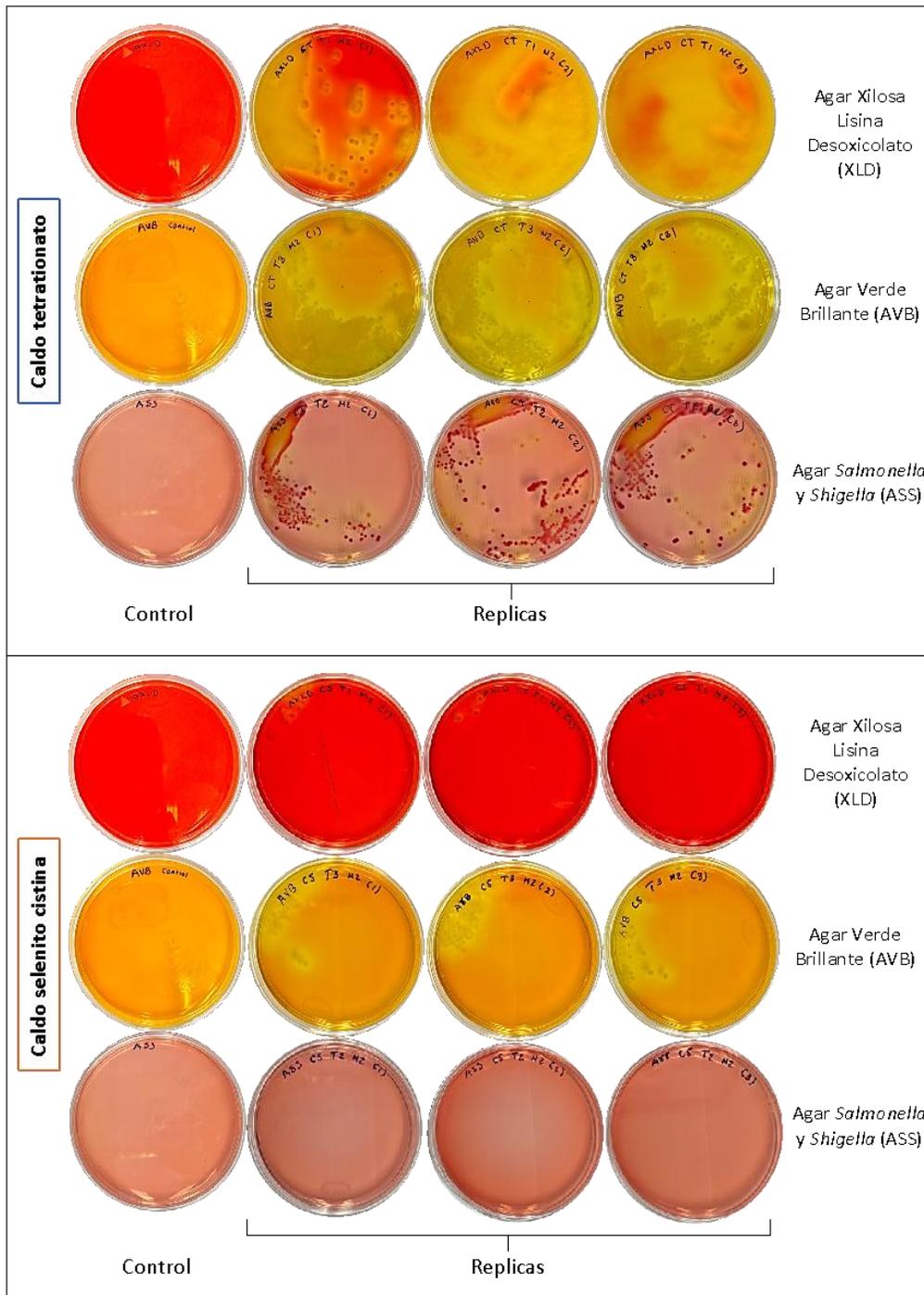


Figura 14 Colonias bacterianas aisladas en los medios selectivos de la muestra 2 de filete seco de pescado.

Las pruebas bioquímicas evidenciaron que las colonias bacterianas aisladas en los medios XLD, AVB y ASS a pesar de presentarse en algunos casos muy escasa, estas no fueron características para *Salmonella* (Tabla 3), por lo que se descartó su presencia en la muestra 2 (Fig. 16).

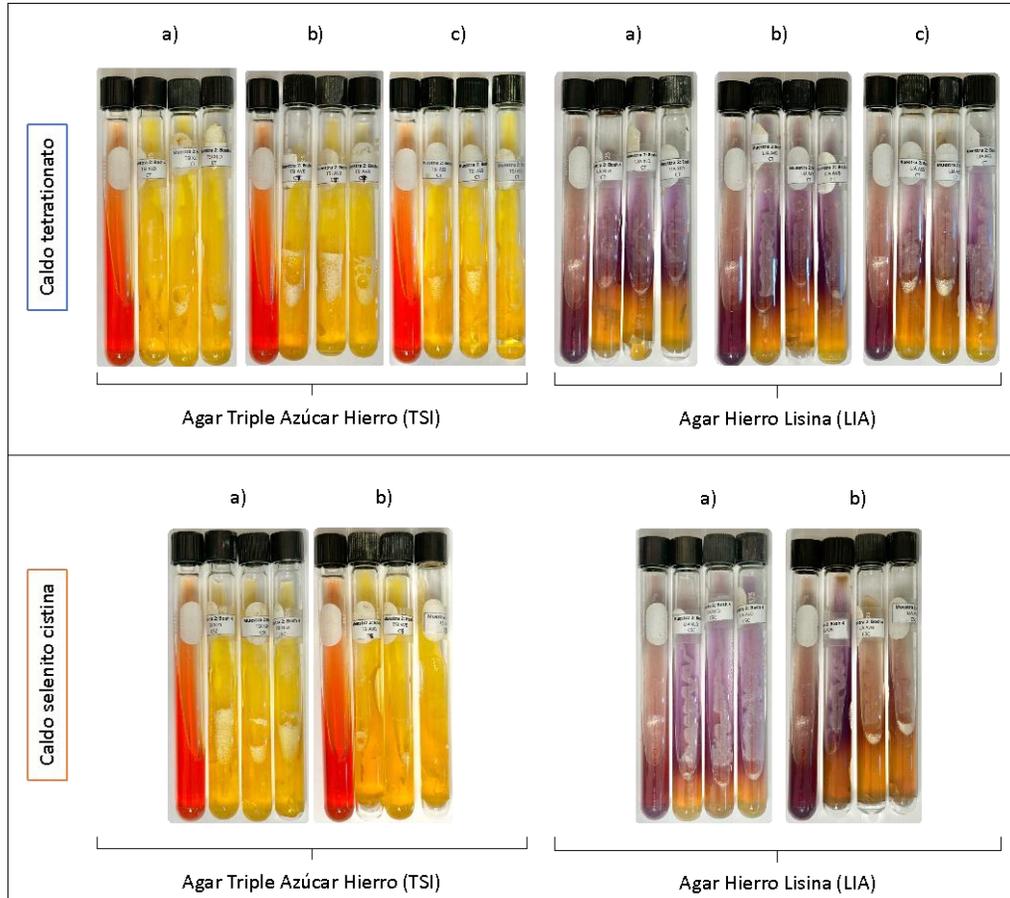


Figura 15 Pruebas bioquímicas de la muestra 2 de filete seco de pescado, aisladas de los medios a) Agar Xilosa Lisina, b) Agar Verde Brillante y c) Agar *Salmonella* y *Shigella*.

Es aislamiento de las colonias bacterianas provenientes de la **muestra 3** de filete seco de pescado permitieron evidenciar que la muestra enriquecida tanto con el caldo tetratonato y el caldo selenito cistina mostraron colonias típicas de *Salmonella* en todos los medios de aislamiento probados: Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD), Agar Verde Brillante (AVB) y Agar *Salmonella* y *Shigella* (ASS) (Fig. 17).

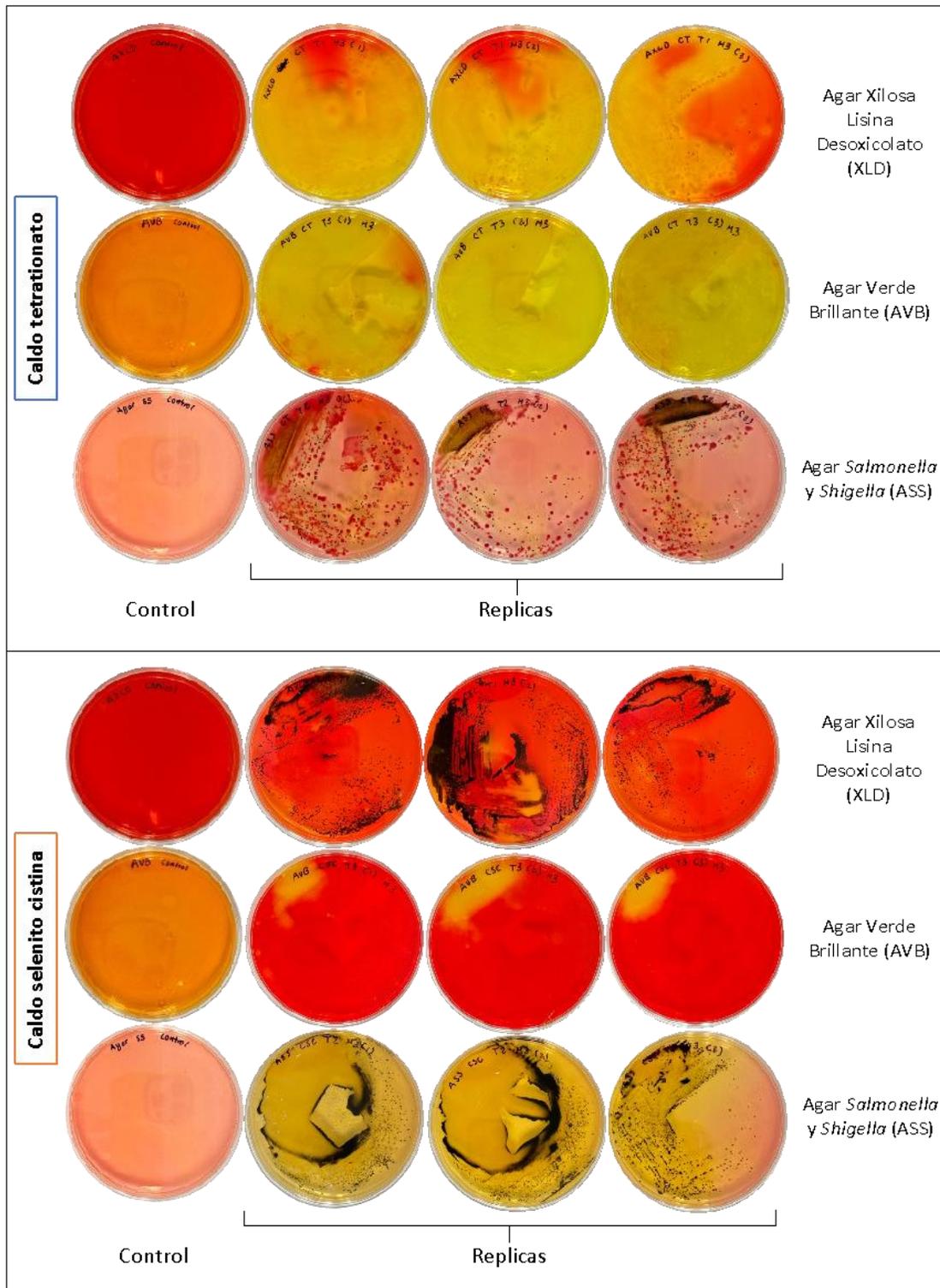


Figura 16 Colonias bacterianas aisladas en los medios selectivos de la muestra 3 de filete seco de pescado.

Cabe destacar las colonias sospechosas para *Salmonella* desarrolladas en el Agar Verde Brillante (AVB) y el Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) provenientes del medio de enriquecimiento caldo tetracionato fueron menos abundantes, sin embargo, la morfología colonial correspondió para *Salmonella* (Fig. 18).

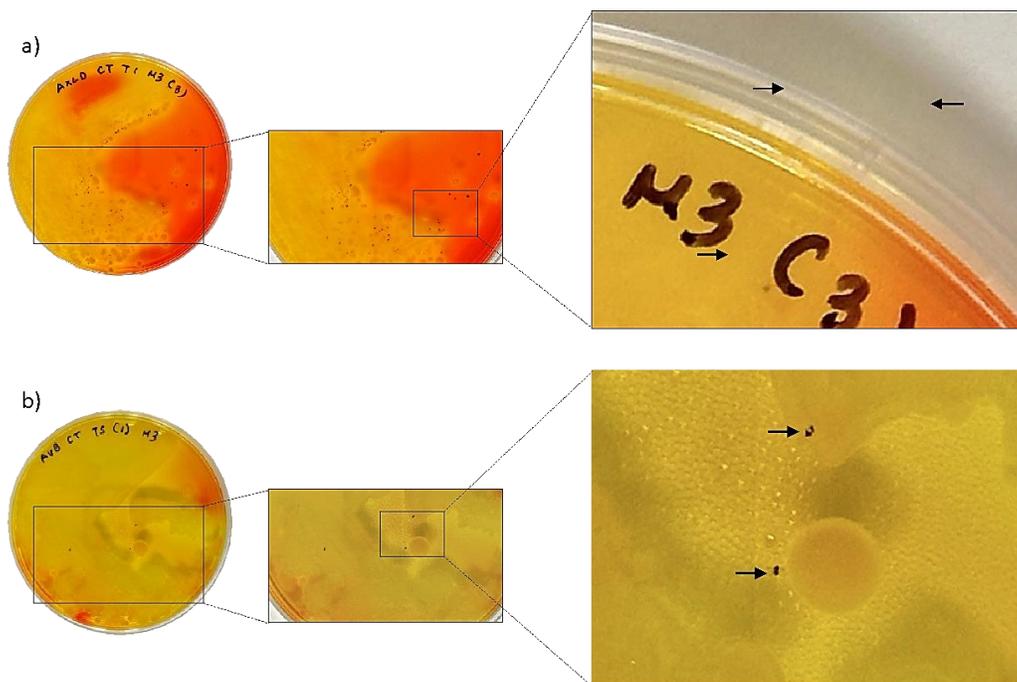


Figura 17 Colonias bacterianas características de *Salmonella* aisladas en a) Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) y b) Agar Verde Brillante (AVB) provenientes del medio de enriquecimiento caldo tetracionato. Las flechas de color negro indican las colonias desarrolladas.

Las pruebas bioquímicas permitieron corroborar que las colonias aisladas sospechosas de *Salmonella* de todos los medios selectivos presentaron las características típicas (Tabla 3) para ser consideradas como positivas, ya que a lo largo de la punción en el Agar Triple Azúcar Hierro (TSI) la coloración observable fue de color negro, indicando la producción de ácido sulfhídrico (H_2S). Así mismo a lo largo de la superficie inclinada se observó la intensificación del color rojo del medio, indicando la no fermentación de la lactosa y la sacarosa característico de *Salmonella*. (Fig. 19). Así mismo, se observó que, en el Agar Hierro Lisina, en el fondo del tubo se observó un ennegrecimiento evidente, así como la intensificación del color púrpura del agar en la superficie inclinada debido a la descarboxilación de la lisina (Fig. 19).

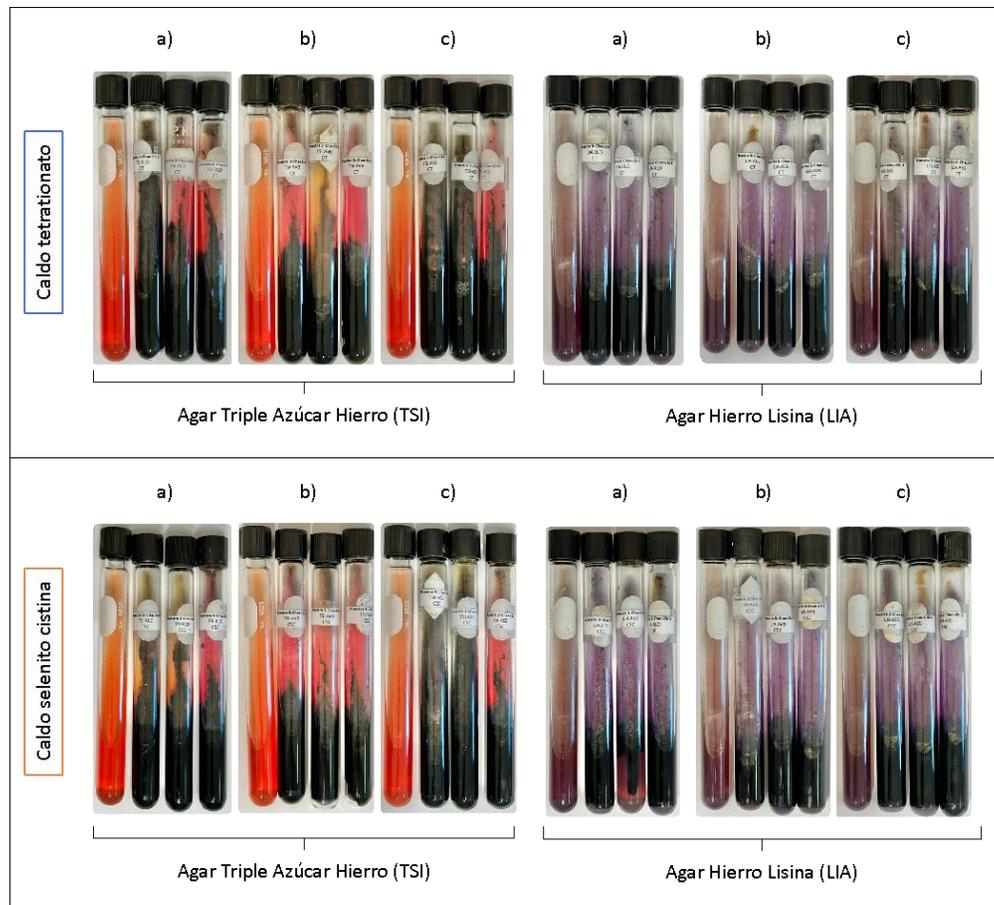


Figura 18 Pruebas bioquímicas de la muestra 3 de filete seco de pescado de las colonias aisladas de los medios diferenciales: a) Agar Xilosa Lisina Desoxicolato, b) Agar Verde Brillante y c) Agar Salmonella y Shigella.

La **muestra 4** de filete seco de pescado analizada, de la misma manera que la muestra 3 evidenció el aislamiento de colonias típicas para *Salmonella*, ya que en el medio XLD las colonias se presentaron completamente negras. Las colonias bacterianas desarrolladas en el AVB fueron rosas transparentes rodeadas por medio enrojecido, mismo que cubrió todo el medio, y el en el ASS se presentaron colonias aisladas translucidas con centro negro (Fig. 20). Este patrón de comportamiento se presentó en los dos medios de enriquecimiento probados: el caldo tetracionato y el caldo selenito cistina.

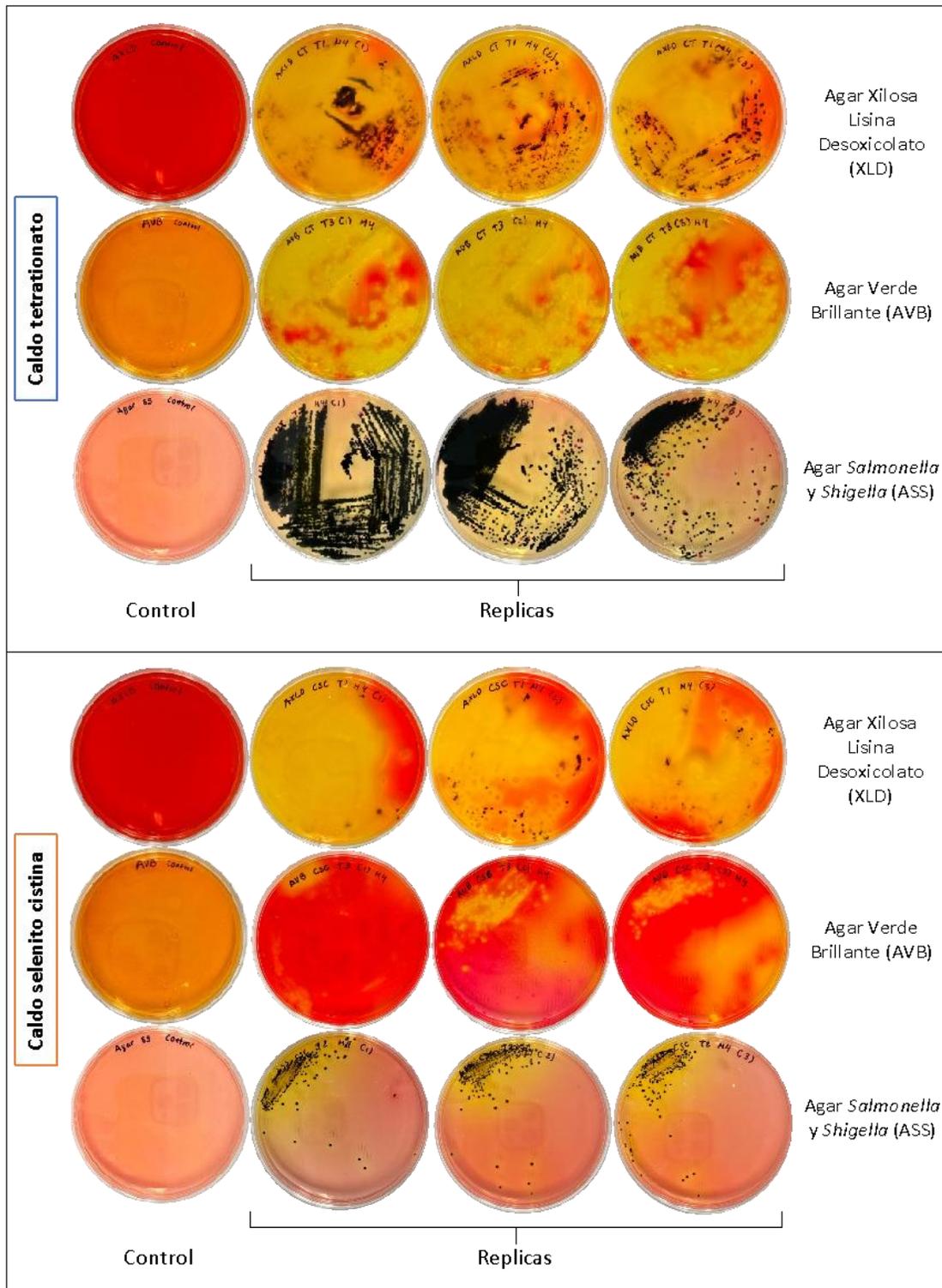


Figura 19 Colonias bacterianas aisladas en los medios selectivos de la muestra 4 de filete seco de pescado.

Las pruebas bioquímicas confirmaron que las colonias bacterianas sospechosas aisladas presentaron las características típicas para *Salmonella*, ya que en el Agar Triple Azúcar Hierro (TSI) se detectó la intensidad del color rojo del medio sobre la superficie inclinada y el obscurecimiento total del fondo en donde se realizó la punción. Este mismo patrón se presentó en el medio Agar Hierro Lisina (Fig. 21).

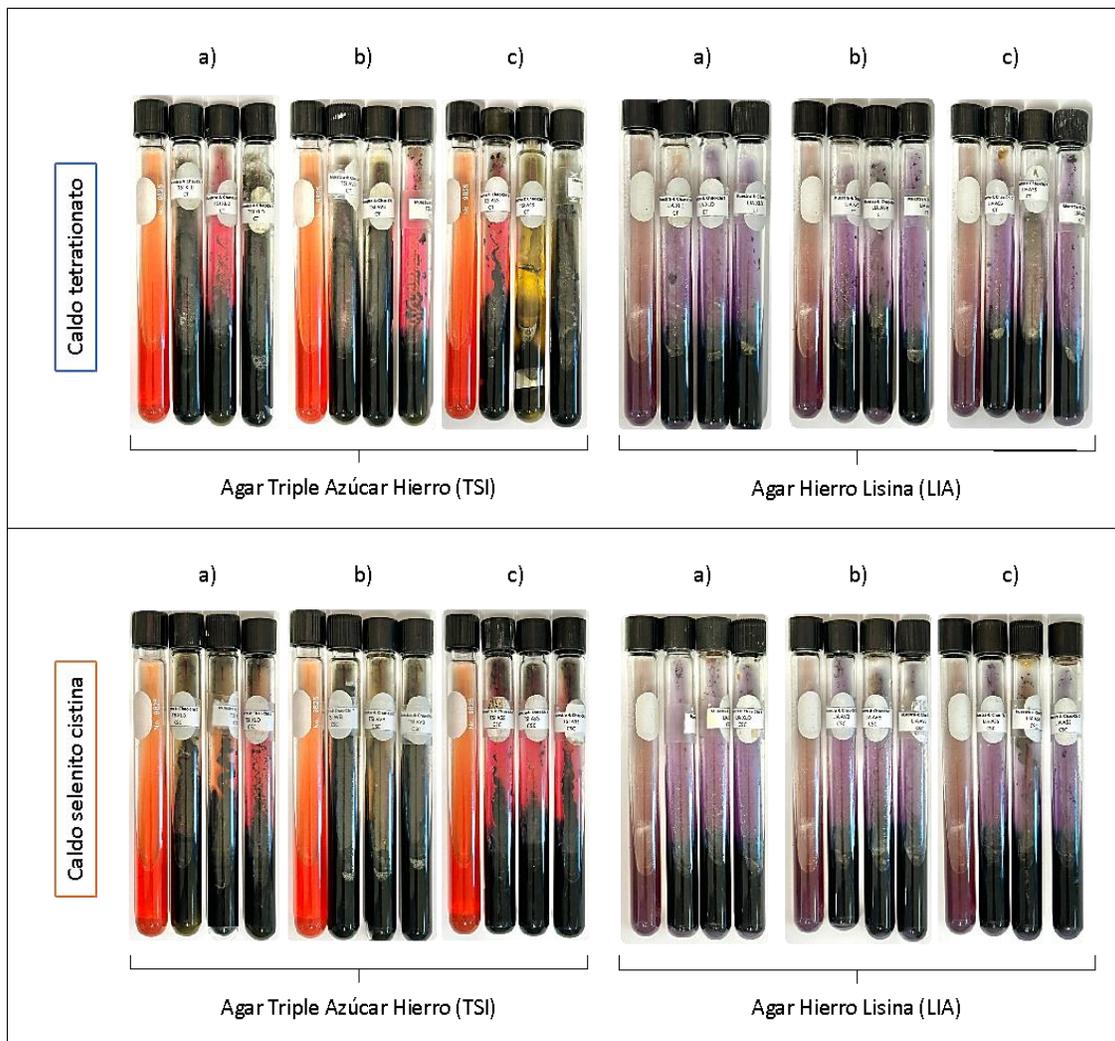


Figura 20 Pruebas bioquímicas de las colonias bacterianas provenientes de la muestra 4 de filete seco de pescado de los medios selectivos a) Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD), b) Agar Verde Brillante (AVB) y c) Agar Salmonella y Shigella.

Finalmente, los resultados del análisis de las colonias bacterianas con el Antisero Somático O para *Salmonella*, corroboraron que todas las colonias aisladas sospechosas dieron positivo para la prueba de aglutinamiento confirmando de esta manera la presencia de *Salmonella* en los filetes secos de pescado de la **muestra 3** y la **muestra 4** (Fig. 22). Es importante mencionar que esta prueba no fue realizada para la **muestra 1** y la **muestra 2**, ya que no se encontró la presencia; en los aislamientos en los medios selectivos y las pruebas bioquímicas, de la presencia de colonias bacterianas sospechosas para *Salmonella* (Fig. 13 y Fig. 15).

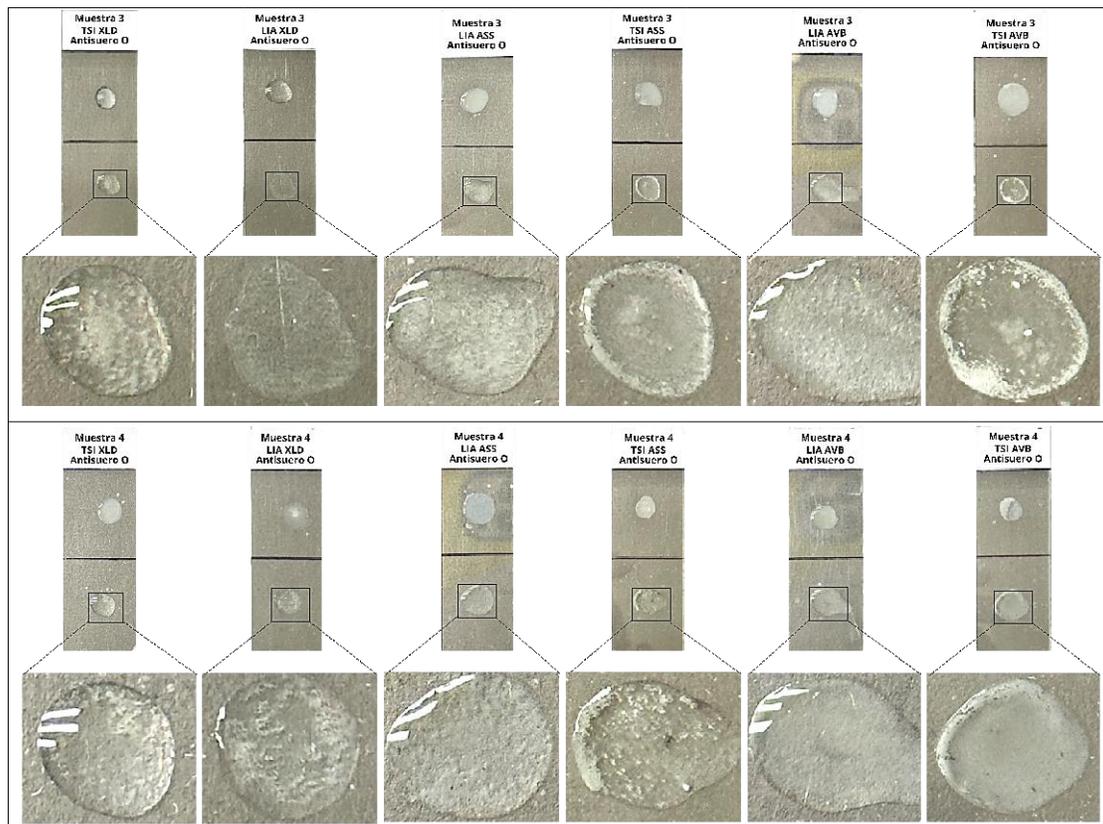


Figura 21 Prueba de aglutinamiento para la determinación de *Salmonella* en filete seco de pescado.

4.3 DENSIDAD DE *ESCHERICHIA COLI* EN FILETE SECO DE PESCADO.

Los resultados para la densidad de *Escherichia coli* permitieron evidenciar que para la **muestra 1** y la **muestra 2** el Número Más Probable fue de < 3.0 NMP/g de *Escherichia coli* por gramo de muestra analizada. La **muestra 3** presentó unos valores de 460 NMP/g de *Escherichia coli* por gramo de muestra analizada. Y finalmente la **muestra 4** presentó unos valores de 43 NMP/g de *Escherichia coli* por gramo de muestra analizada (**Tabla 5**).

Tabla 5 Número Más Probable obtenido de los filetes secos de pescado contrastado con los valores máximos de la NOM-210-SSA1-2014.

Muestra	Dilución	Combinación tubos positivos	Confirmación colonias	NMP/g obtenido	Límite máximo NMP/g*
Muestra 1	0.1	0	-	< 3.0 NMP/g	400 NMP/g
	0.01	0	-		
	0.001	0	-		
Muestra 2	0.1	0	-	< 3.0 NMP/g	
	0.01	0	-		
	0.001	0	-		
Muestra 3	0.1	3	+	460 NMP/g	
	0.01	3	+		
	0.001	1	+		
Muestra 4	0.1	3	+	43 NMP/g	
	0.01	1	+		
	0.001	0	-		

*Valor máximo permisible establecido en la NOM-210-SSA1-2014, *Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.*

En la siguiente figura se puede observar la confirmación de colonias bacterianas desarrolladas para *Escherichia coli* por cada muestra analizada.

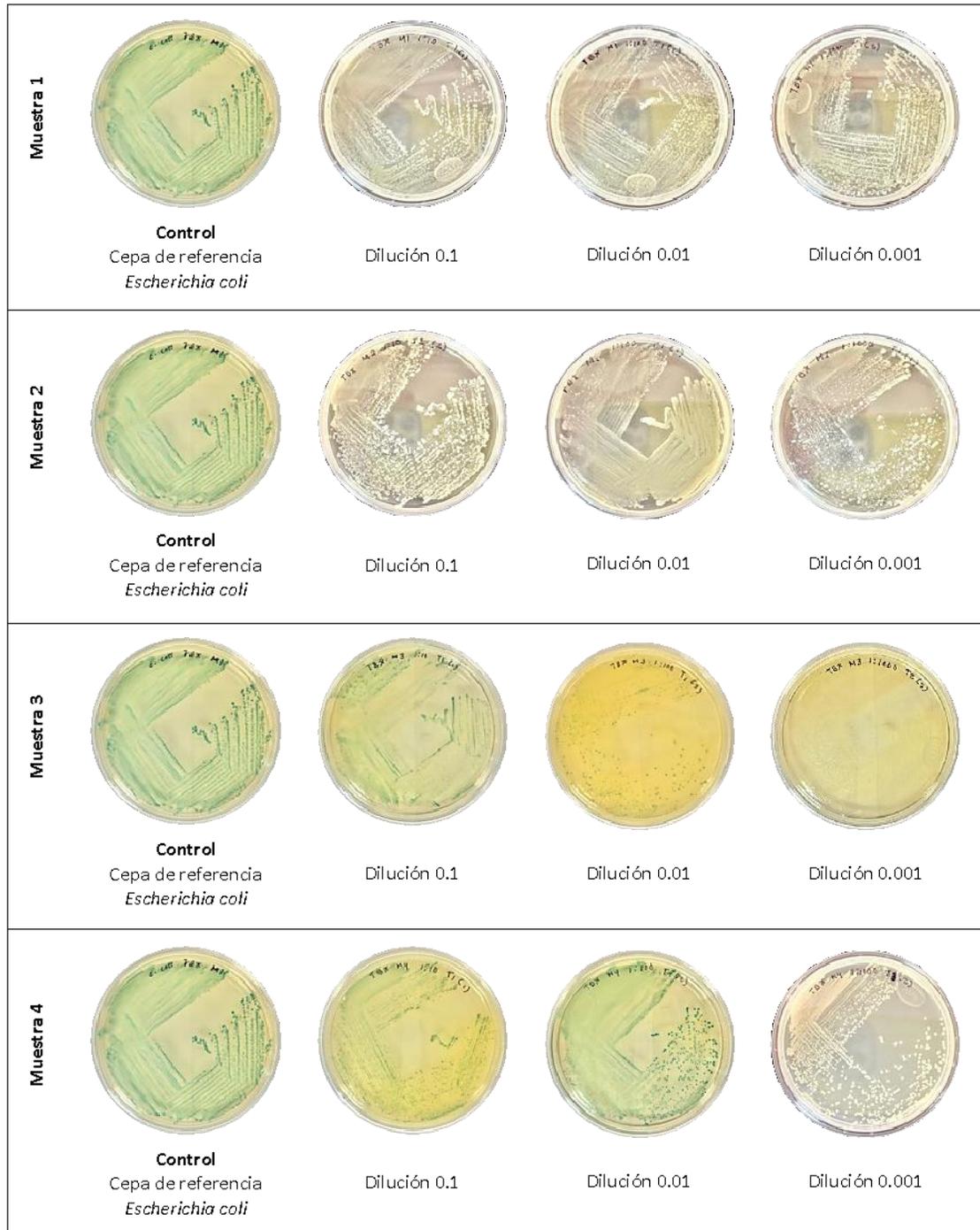


Figura 22 Confirmación de Escherichia coli en placas de Agar TBX (Tripton-Bilis-X-Glucurónico).

Los resultados evidenciaron que sólo la **muestra 3** sobrepasa los valores permisibles de la densidad de *Escherichia coli* referenciados en la *NOM-242-SSA1-2009 Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba.*

5 CONCLUSIÓN.

Las cuatro muestras analizadas de filete seco de pescado fueron positivas para coliformes totales. No obstante, esta densidad no rebasó los límites permisibles establecidos en la *NOM-129-SSA1-1995, Bienes y servicios. Productos de la pesca: secos-salados, ahumados, moluscos cefalópodos y gasterópodos frescos-refrigerados y congelados. Disposiciones y especificaciones sanitarias*, norma utilizada en ausencia de los valores máximos de UFC/g en la *NOM-242-SSA1-2009*.

Así mismo, de las cuatro muestras analizadas se logra concluir que la **muestra 1** y muestra la **muestra 2** se encuentran libres de colonias bacterianas de *Salmonella*. No obstante, la **muestras 3** y **muestra 4** no cumplen con lo establecido en la *NOM-242-SSA1-2009*, debido a que fue confirmada la presencia de *Salmonella*.

Finalmente, la densidad de *Escherichia coli* evidenció que sólo la **muestra 3** sobrepasa los límites establecidos en la *NOM-242-SSA1-2009*. La **muestra 4** contiene colonias bacterias para *Escherichia coli* sin embargo estas no sobrepasan los valores establecidos en la Norma Oficial Mexicana. La **muestra 1** y la **muestra 2** no registraron valores para la presencia de *Escherichia coli*, por lo que se demuestra su ausencia.

De los resultados obtenidos de los análisis microbiológicos a las muestras de filete de pescado por tecnología solar, se sugiere implementar un taller en la tercera etapa, el cuál esté enfocado a la importancia de la microbiología en los alimentos marinos. Si bien, se sabe que existen capacitaciones dirigidas al sector pesquero por los diferentes organismos de gobierno sobre la inocuidad alimentaria, conviene que por la parte académica que representa la actualización del conocimiento, reforzar a las comunidades de este sector respecto a las buenas prácticas para la colecta, almacenamiento y transporte de los productos derivados de la pesca y de inocuidad alimentaria de acuerdo a las normas que están dirigidas a productos alimenticios derivados de la pesca. Por otro lado, es importante mencionar que se requiere realizar en la

tercera etapa otro monitoreo microbiológico a las muestras de pescado que serán secadas una vez que esté funcional la planta de secado termosolar.

6 REFERENCIAS

- 1 Vásquez Ampuero, J.M., Tasayco Alcántara, W.R., Chuquiyauri Talenas, M.A. 2018. Evaluación microbiológica de pescados y mariscos expedidos en mercados de la ciudad de Huánuco. *Revista de Investigación Valdizana*, 12(2): 75 – 82.
- 2 Rondón E., J., Ramos D., D., Vilca L., M., Salazar S., E., Mendoza, Y., González V., R. 2020. Caracterización sanitaria e identificación de los puntos de contaminación microbiológica en la cadena de comercialización pesquera en el puerto de Pucallpa, Ucayali, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(1): 1 – 13.
- 3 Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). Microbios y enfermedades transmitidas por alimentos. Consultado el 10 de noviembre del 2023 en: <https://www.cdc.gov/foodsafety/es/foodborne-germs-es.html>
- 4 Félix Fuentes, A., Campas Baypoli, O. N., Meza Montenegro, M. 2005. Calidad sanitaria de alimentos disponibles al público de Ciudad Obregón, Sonora, México. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 6(3): 1 – 13.
- 5 Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). Normas Oficiales Mexicanas. Consultado el 10 de noviembre del 2023 en: <http://transparencia.cofepris.gob.mx/index.php/es/marco-juridico/normas-oficiales-mexicanas>
- 6 Flores Monter, Y. M., Crespo Guerrero, J.M. 2023. Hábitos de consumo y valor nutricional de los recursos marinos entre los pescadores de Yucatán, México. *Investigaciones geográficas*. Disponible en: <https://www.investigacionesgeograficas.unam.mx/index.php/rig/article/view/60690/54562#info>
- 7 Secretaría de Salud. NOM-129-SSA1-1995. Bienes y servicios. Productos de la pesca: secos-salados, ahumados, moluscos cefalópodos y gasterópodos frescos-refrigerados y congelados. Disposiciones y especificaciones sanitarias.
- 8 Secretaría de Salud. NOM-242-SSA1-2009. Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba.
- 9 Secretaría de Salud. NOM-201-SSA1-2014. Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.