



SEP
SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO



GOBIERNO DEL
ESTADO DE MÉXICO



TECNOLÓGICO DE ESTUDIOS SUPERIORES DE ECATEPEC
DIRECCIÓN ACADÉMICA
DIVISIÓN DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOQUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

*“Reconocimiento de la carga microbiana endófito infecciosa en
hortalizas”*

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

PRESENTA

I.B.Q. LAÍN JOSEPH COMPAÑ AGUILAR

COMITÉ TUTORIAL

Dra. María Isabel Neria González, Directora

Dra. Mayola García Rivero, Asesora/revisora

Dr. Rafael Alejandro Angel Cuapio, Asesor/revisor

Ecatepec de Morelos, México, Enero 2025

DIRECCIÓN ACADÉMICA
DIVISIÓN DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOQUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Folio: **MCIBQ/2019/COAL941130**

Fecha: 01/21/2025

Después de las revisiones, observaciones y seguimiento de recomendaciones hechas al proyecto de tesis: **"Reconocimiento de la carga microbiana endófito infecciosa en hortalizas"**, que como requisito para obtener el grado de maestría presenta:

COMPAN	AGUILAR	LAIN JOSEPH
Apellido paterno	Apellido materno	Nombres (s)

Matrícula: 202021510

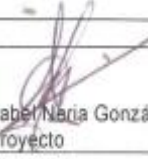
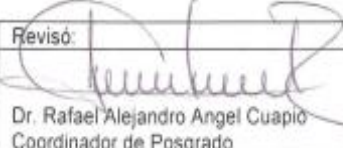

La Directora de Proyecto **Dra. María Isabel Neria González**, da por concluido su desarrollo para proceder a la impresión del trabajo correspondiente y la defensa pública del mismo.

Vo. Bo. COMITÉ TUTORIAL

Dra. María Isabel Neria González

Dra. Mayola García Rivero

 Director	 Asesor
 Asesor	

Elaboró:  Dra. María Isabel Neria González Director de Proyecto	Revisó:  Dr. Rafael Alejandro Angel Cuapio Coordinador de Posgrado	Vo. Bo.:  Dra. Isabel de la Luz Membrillo Venegas Jefe de División
---	--	--

DIRECCIÓN ACADÉMICA
DIVISIÓN DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOQUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Fecha: 01/21/2025

Datos generales

Nombre del alumno:

COMPAÑ	AGUILAR	LAÍN JOSEPH
Apellido paterno	Apellido materno	Nombres (s)

Matricula: 202021510

PROYECTO: RECONOCIMIENTO DE LA CARGA MICROBIANA ENDÓFITA INFECCIOSA EN HORTALIZAS

DIRECTOR: MARÍA Isabel Nería González

Dictamen:

Con base en el registro No. MCIBQ/2019/COAL941130 correspondiente al periodo escolar 2019-2021, asignado al proyecto de tesis **RECONOCIMIENTO DE LA CARGA MICROBIANA ENDÓFITA INFECCIOSA EN HORTALIZAS** y presentado por la alumna referida; y después de haber sido desarrolladas las actividades requeridas, el Comité Tutorial, conformado por los integrantes que firman al calce, ha determinado que SI (X) NO () han sido cubiertos en su totalidad los requisitos que permitan a esta División Académica liberar al alumno de los trámites académicos para tal efecto e iniciar el trámite de obtención de grado de maestría en la Unidad de Registro y Certificación de este Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec.

Observaciones:

Comité Tutorial

<p>Dra. María Isabel Nería González</p>  <p>Director</p>		<p>Dra. Mayola García Rivero</p>  <p>Asesor</p>
<p>Dr. Rafael Alejandro Angel Cuapio</p>  <p>Asesora</p>		

<p>Elaboró:</p>  <p>Dr. Rafael Alejandro Angel Cuapio Coordinador de Posgrado</p>	<p>Revisó y Visó Bueno:</p>  <p>Dra. Isabel de la Luz Membrillo Venegas Jefe de División</p>	<p>Enterado:</p>  <p>Mtro. Juan Carlos Bretón Pazas Director Académico</p>
--	---	---



CONAHCYT

CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS

Por medio de la presente se da el agradecimiento a CONAHCYT por otorgar una beca a C. **LAIN JOSEPH COMPAÑ AGUILAR** con número CVU: **1075908** y con numero de apoyo 793383 para realizar mis estudios de **Maestría** en el programa **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA** en **TECNOLOGICO DE ESTUDIOS SUPERIORES DE ECATEPEC** a partir de la fecha **01 de abril de 2021** hasta el **31 de agosto de 2022**.

Dedicatoria.

A mi mama, por siempre brindarme su apoyo y consejo en las decisiones que he tomado.

Gracias...

Agradecimientos

Gracias al Tecnológico de estudios superiores de Ecatepec por ser mi casa de estudios a nivel licenciatura y maestrías, por brindarnos instalaciones y equipos para poder desarrollar nuestras actividades educativas

Gracias a la Dra. María Isabel Neria González por su guía académica y apoyo incondicional, por permitirme trabajar y compartir un poco de mi conocimiento a los nuevos alumnos que llegaban al Laboratorio J-109 de Microbiología integrativa y biología molecular; y brindarme las herramientas necesarias para desarrollarme en el campo laboral.

Índice.

Resumen.....	11
Abstract.....	12
1 Introducción	13
2 Problemática.....	14
3 Justificación.....	15
4 Objetivo general	15
4.1 Objetivo específico	15
5 Marco conceptual	15
5.1 Enterobacterias.....	15
5.2 Bacterias coliformes.....	15
5.3 Métodos para evidenciar la presencia de carga bacteriana	16
5.3.1 Agar Entérico Hektoen.	16
5.3.2 Lisina Hierro Agar.....	17
5.3.3 Agar sulfito bismuto	17
5.4 Extracción de DNA genómico	18
5.5 PCR.....	18
5.6 Marcadores moleculares.....	19
5.7 Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante, DGGE	19
6 Antecedentes.	20
6.1 Causas de la contaminación de hortalizas.	20
6.2 Bacterias patógenas presentes en hortalizas.	21
6.3 Bacterias endófitas en hortalizas.	22
7 Materiales y método	23
7.1 Recolección de muestras	23
7.2 Aislamiento e identificación de bacteria presentes en hortalizas	23
7.2.1 Aislamiento y caracterización morfológica.....	23
7.2.2 Proceso de desinfección y viabilidad	24
7.3 Análisis estadístico.....	25
7.4 Análisis molecular de muestras	25
7.4.1 Extracción de DNA metagenómico	25
7.4.2 Amplificación del gen 16S rRNA.....	27
7.4.3 Amplificación de genes específicos	27

7.4.4	Amplificación del gen 16S rRNA para DGGE	28
7.5	DGGE	29
7.5.1	Condiciones	29
7.5.2	Tinción del gel de DGGE	30
7.5.3	Análisis de comunidades a partir de DGGE.....	30
8	Resultados	30
8.1	Aislamiento y cuantificación de la carga total bacteriana e infecciosa en hortalizas	30
8.2	Clasificación bacterias infecciosas a través medios de cultivos diferenciales	31
8.3	Evaluación de la eficacia del proceso de desinfección.	33
8.3.1	Muestra de Espinaca.	36
8.3.2	Muestra de Lechuga.....	36
8.3.3	Muestra de Zanahoria.	37
8.4	Detección de grupos bacterianos infecciosos endógenos en hortaliza	37
8.5	Detección de <i>Escherichia coli</i>	41
8.6	Detección de grupos de <i>Pseudomonas</i>	42
8.7	Detección de <i>Listeria</i> spp.....	43
8.8	Análisis cualitativo de la microbiota presenté en las hortalizas.....	44
9	Discusión de resultados	45
10	Conclusiones	46
11	Bibliografía.....	47
12	Anexos.....	51
12.1	Morfología de bacterias aisladas	51
12.1.1	Muestra de Lechuga	51
12.1.2	Muestra de Espinaca.....	52
12.1.3	Muestra de Zanahoria	55
12.2	Preparación de reactivos	57
12.3	Protocolo de extracción de DNA para plantas.....	59
12.4	Participación en congresos.....	60

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama de diluciones para el cálculo de UFC/mL. (Elaboración propia).....	25
Figura 2. Clasificación de bacterias infecciosas presentes en hortalizas, (A) bacterias en agar hierro lisina para la identificación de posibles <i>S. arizonae</i> , <i>typhimurium</i> o <i>Escherichia coli</i> . y <i>Shigella flexneri</i> , <i>Proteus mirabilis</i> o <i>Citrobacter freundii</i> . (B) bacterias en agar entérico hektoen para la identificación de posibles <i>S. enteritidis</i> o <i>typhimurium</i> y <i>Shigella flexneri</i> o <i>sonnei</i> , debido a la coloración (C) bacterias en agar sulfito bismuto para la identificación de posibles <i>S. enteritidis</i> o <i>typhi</i> y <i>Escherichia coli</i>	31
Figura 3 identificación de bacterias infecciosas detectadas	33
Figura 4. Comparación de los procesos de desinfección de muestras de espinaca	34
Figura 5. Comparación de los procesos de desinfección de muestras de lechuga.....	35
Figura 6. Comparación de los procesos de desinfección de muestras de zanahoria.....	35
Figura 7. Extracción de DNA metagenómico de las 36 muestras de hortalizas desinfectadas. (1-12) muestra de espinaca, (13-24) muestra de lechuga y, (25-36) muestra de zanahoria.	39
Figura 8. Prueba de especificidad de la PCR para la detección de grupos bacterianos infecciosos. Los amplicones de cada PCR fueron evaluados por electroforesis, las muestras de cada PCR fueron ordenadas tal como indica: 1. <i>Pseudomonas</i> , 2. <i>Salmonella</i> , 3. <i>Escherichia coli</i> , 4. <i>Listeria spp.</i> , 5. Control negativo y MP marcador de peso molecular (100bp DNA Ladder, Promega.). A) PCR específica para <i>Pseudomonas</i> , B) PCR específica para <i>Salmonella</i> , C) PCR específica para <i>E. coli</i> , D) PCR específica para <i>Listeria spp.</i>	40
Figura 9. PCR específica para la detección de <i>Salmonella</i> utilizando los iniciadores 16SF1 y 16SIII, tamaño de amplicón 572 pb. A) Muestras de zanahoria, B) Muestras de lechuga, C) Muestras de espinaca.....	41
Figura 10. Amplificación del gen de <i>Escherichia coli</i> . utilizando el iniciador Rfb-F y Rfb-R. Muestras de zanahoria (fig. 11A) obteniendo el amplicón esperado a la longitud de 678 pb en las muestras 1, 2, 3, 4, 6, 7, 9 y 10, en muestras de lechuga (fig. 11B) 13, 15, 16 y 17, y en muestras de espinaca (fig. 11C) 31 y 32. En las muestras donde se obtuvo un amplicón diferente a lo esperado se probará el iniciador PA-GS-F y PA-GS-R para grupos de <i>pseudomonas</i>	42
Figura 11. Las muestras de lechuga 18, 20, 21, 22 y 23 y espinaca 33 se probaron con el iniciador PA-GS-F y PA-GS-R, donde se obtuvo un amplicón positivo en las muestras 18, 20, 21, 22 y 23, en las muestras 24 y 33 no se obtuvo una amplificación a la longitud de 617 pb.....	43
Figura 12. Las muestras 24 y 33 que no amplificaron con los iniciadores anteriores, se probaron con el iniciador para <i>Listeria</i> , obteniendo un amplicón positivo a una longitud de 400 pb.....	44
Figura 13 Figura A, análisis cualitativo de espinaca; 1 muestra sin lavar, 2 muestra lavada con agua, 3 muestra desinfectada con gotas de plata, 4 muestra desinfectada con hipoclorito de sodio. Figura B, análisis cualitativo de lechuga; 1 muestra sin lavar, 2 muestra lavada con agua, 3 muestra desinfectada con gotas de plata, 4 muestra desinfectada con hipoclorito de sodio.	44

Índice de tablas

Tabla 1. Bacterias presentes en frutos y vegetales	22
Tabla 2. Hortalizas seleccionadas.....	23
Tabla 3. Control de muestras y tratamientos de desinfección para extracción de DNA.....	26
Tabla 4. Formulación de las soluciones desnaturalizante.	29

Tabla 5. Formulación de las soluciones desnaturalizantes 40% y 60% .	30
Tabla 6. Número de bacterias aisladas por hortaliza (UFC/mL).	31
Tabla 7. Número de bacterias crecidas en medios selectivos.	32
Tabla 8. Matriz de posible clasificación de bacterias infecciosas en zanahoria, espinaca y lechuga.	32
Tabla 9. Comparación de los procesos de desinfección en muestras de espinaca y procesos de desinfección.	36
Tabla 10. Comparación de los procesos de desinfección en muestras de lechuga y procesos de desinfección.	37
Tabla 11. Las comparaciones de los procesos de desinfección en las muestras de zanahoria y procesos de desinfección.	37
Tabla 12 Muestra de bacterias provenientes de Lechuga cultivadas en agar nutritivo	51
Tabla 13 Muestra de bacterias provenientes de lechuga en agar cetrimida	51
Tabla 14 Muestra de bacterias provenientes de Lechuga en agar McConkey	52
Tabla 15 Muestra de bacterias provenientes de Espinaca en agar Cetrimida	52
Tabla 16 Muestra de bacterias provenientes de Espinaca en agar Nutritivo	53
Tabla 17 Muestra de bacterias provenientes de Espinaca en agar McConkey	54
Tabla 18 Muestra de bacterias provenientes de zanahoria en agar McConkey	55
Tabla 19 Muestra de bacterias provenientes de zanahoria en agar cetrimida.	55
Tabla 20 Muestra de bacterias provenientes de zanahoria en agar Nutritivo.	56

Resumen

Actualmente las hortalizas que son consumidas en fresco representan un riesgo potencial para la salud, ya que éstas pueden provocar diferentes tipos de enfermedades gastrointestinales, debido a que contienen una gran carga bacteriana externa provocada por la manipulación postcosecha y una carga bacteriana interna que es absorbida desde la raíz de las hortalizas. Además de otros tipos de contaminantes como son los metales pesados y diferentes tipos de químicos agroindustriales. La presencia de bacterias infecciosas en hortalizas genera la necesidad de implementar un proceso de desinfección antes del consumo, para ello diferentes desinfectantes comerciales son utilizados. Sin embargo, qué tanto de la carga microbiana endofítica infecciosa pueden remover, ya que una gran parte de las hortalizas son consumidas en crudo por la población y puede representar un riesgo de salud pública. Por esta razón, en el presente trabajo fue analizada la carga bacteriana de zanahoria (*Daucus carota*), espinaca (*Spinacia oleracea*) y lechuga italiana (*Lactuca sativsa*) por su popularidad de consumo. Las hortalizas fueron adquiridas en la central de abasto de Ecatepec de Morelos, estado de México.

Se realizó una identificación y caracterización de las bacterias totales presentes utilizando medios de cultivo específicos y selectivos para enterobacterias, encontrando la presencia de bacterias, tales como: *Salmonella spp*, *Escherichia coli*, *Shigella spp*, *Pseudomona spp*, *Citrobacter spp*, *Klebsiella spp*, *Serratia spp*, entre otras, según la ficha técnica de los medios de cultivo utilizados, dichas bacterias fueron aisladas y conservadas en glicerol. Al mismo tiempo, se tomaron muestras de cada hortaliza, las cuales fueron sometidas a un proceso de desinfección utilizando gotas de plata e hipoclorito de sodio, esto para remover la carga bacteriana externa y poder analizar la carga endófitas presente. Se amplificaron los genes 16S rRNA mediante PCR. Y posterior a ello, se utilizaron iniciadores específicos para la detección de bacterias como: *Salmonella spp*, *E. coli*, *Pseudomonas* y *Listeria monocytogenes*.

Palabras clave: Consumo, bacterias infecciosas, endófitas, hortalizas.

Abstract

Currently, vegetables that are consumed fresh represent a potential health risk, since they can cause different types of gastrointestinal diseases, because they contain a large external bacterial load caused by postharvest handling and an internal bacterial load that is absorbed from the roots of the vegetables, in addition to other types of contaminants such as heavy metals and different types of chemicals. The presence of infectious bacteria in vegetables generates the need to implement a disinfection process before consumption. The different commercial disinfectants act by eliminating the infectious bacteria from the external part of the vegetables, leaving intact the bacteria found on the internal part, the which are called endophytic bacteria.

Due to the high risk associated with the consumption of vegetables, three were selected: carrot (*Daucus carota*), spinach (*Spinacia oleracea*) and Italian lettuce (*Lactuca sativsa*), from the Ecatepec de Morelos supply center, state of Mexico, for the study, analyzing and isolating the bacteria present.

An identification and characterization of the total bacteria present was carried out using specific and selective culture media for enterobacteria, finding the presence of bacteria such as *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *Shigella* spp, *Pseudomona* spp, *Citrobacter* spp, *Klebsiella* spp, *Serratia* spp., among others, according to the technical data sheet of the culture media used, these bacteria were isolated and preserved in glycerol. At the same time, samples were taken from each vegetable, which were subjected to a disinfection process using silver drops and sodium hypochlorite, this to remove the external bacterial load and to be able to analyze the endophyte load present. 16S rRNA genes were amplified by PCR. And after that, specific primers were used for the detection of bacteria such as: *Salmonella* spp, *E. coli*, *Pseudomonas* and *Listeria monocytogenes*.

Keyword: Consumption, endophyte Infectious bacteria, vegetables.

1 Introducción

Las bacterias endófitas son microorganismos que pueden habitar el interior de una planta sin provocar daño a su hospedero, generalmente, forman una interrelación simbiótica como un mutualismo donde bacterias y plantas son beneficiadas, o bien, sinergismo entre poblaciones bacterianas y planta, en esta asociación ambos tipos de organismos pueden sobrevivir en un ambiente neutral, mediante una relación débil ya que algunos organismos son fácilmente reemplazables. También, puede darse interrelaciones neutras donde las poblaciones bacterianas y planta no son beneficiadas aparentemente, aquí podría situarse la presencia de bacterias endofíticas infecciosas, las cuales colonizan raíces y esparcirse a otros órganos. Aunque es difícil demostrar una total interacción metabólica, se podría pensar que, las bacterias encuentran en la planta protección ambiental y nutricional sin dañarla. Sin embargo, este tipo de bacterias provocan enfermedades gastrointestinales, ya que están presentes en los vegetales de consumo humano, su presencia está relacionada a la interacción microbiana de la rizosfera y al uso de agua contaminada (White et al., 2019), la cual contiene una gran carga bacteriana infecciosa, metales pesados (Reyes et al., 2016), entre otras sustancias que afectan la salud y el ecosistema.

Por otra parte, la forma de alimentación humana está en un constante cambio en la búsqueda de una mejor nutrición y alcanzar un estado más saludable del organismo. Esto ha traído consigo un incremento en la ingesta de vegetales y dentro de ellos hortalizas frescas como tallos, frutos, semillas, bulbos, hojas o raíces de los vegetales con la intención de tener una mayor asimilación de los nutrientes, ejemplo de ello la dieta mediterránea. Dicha dieta ha permanecido durante siglos por su fama de gente sana, esta dieta se basa en el consumo de verduras, hortalizas frescas, frutas, cereales, legumbres, aceite de oliva, como proteína animal el pescado, y con un menor consumo otro tipo de proteína como la de ave. Sin embargo, en la búsqueda de dietas saludables cuya base sea el consumo de hortalizas y vegetales frescos trae consigo un cambio en la microbiota gastrointestinal o bien constantes infecciones debido a la presencia de bacterias patógenas, entre las que resaltan son enterobacterias (Ambreetha et al., 2022). También, se ha reportado la presencia de Gamma-proteobacteria de los géneros *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*, bacterias comunes del microbioma del suelo, rizosfera, y microbioma endófito de las raíces de diferentes hortalizas (Liu et al., 2017). En verduras de ensalada de la india como zanahoria, pepino, cebolla y tomate se han

reportado la presencia de bacterias endófitas pertenecientes a Gamma-proteobacteria, Beta-proteobacteria, *Coccus*, *Bacilli* y *actinobacteria* (Nithya & Babu 2017).

Investigaciones previas han reportado que la mayoría de las bacterias endófitas encontradas en las hortalizas causan enfermedades gastrointestinales y están representadas por bacterias del género *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Klepsiella* spp, *Pseudomonas*, *Listeria* spp y *Escherichia coli*, entre otras. (Rojas & Pizano, 2019).

Teniendo en cuenta el grado de contaminación de las hortalizas es necesario someterlas a un proceso de desinfección para reducir la carga bacteriana, siendo la cloración el método más utilizado en la industria alimentaria debido a su bajo costo y poder de desinfección al contacto en superficies, pero el compuesto ácido hipocloroso forma cloro gas y a su vez forma trihalometanos (como el cloroformo), el cual tiene acciones cancerígenas, por lo tanto, no es tan recomendado su uso. Sin embargo, la FDA recomienda concentraciones de 50 ppm a 200 ppm durante 1 o 2 minutos para la eliminación de microorganismos superficiales de las hortalizas (Garmendia & Vero, 2006). Por consiguiente, los métodos de desinfección se enfocan en la eliminación de la carga bacteriana superficial y no en la carga endófitas infecciosas. En el presente trabajo se realizó el reconocimiento de la carga bacteriana infecciosa total presente en algunas hortalizas de mayor consumo, se evaluó el proceso de desinfección con productos comerciales y, finalmente, se identificó la presencia de bacterias endófitas infecciosas por métodos microbiológicos. Por otra parte, la identificación de grupos microbianos infecciosos fue realizada mediante técnicas moleculares.

2 Problemática

Actualmente, existe una fuerte tendencia en consumir hortalizas frescas, pero representan fuertes reservorios de bacterias potencialmente infecciosas que pueden causar una variedad de enfermedades gastrointestinales en las personas y, por lo tanto, representan uno de los riesgos de salud pública más frecuente. Es recomendable lavar y desinfectar bien las hortalizas, pero la desinfección se realiza únicamente en la superficie de los vegetales, y los microorganismos patógenos que viven dentro de los tejidos (bacterias endófitas) de las plantas no son eliminados (Garmendia & Vero, 2006). Dada la relevancia es necesario reconocer las bacterias endófitas que persisten a la desinfección y su potencial en desencadenar problemas en la salud pública.

3 Justificación

La baja eficacia de los agentes desinfectantes sobre la depuración de la carga total bacteriana se debe a que estos se centran en la carga bacteria externa y no es contemplada la carga endófitas, la cual se encuentra en el interior de la hortaliza, donde los desinfectantes no actúan. Debido a esto dicha carga se mantiene viable y puede presentar riesgos a la salud al ser consumida en crudo, ocasionando enfermedades como gastroenteritis. Por ende, nace la necesidad de reconocer la carga bacteriana infecciosa endófitas persistente para un sano consumo de hortalizas.

4 Objetivo general

Identificar las bacterias infecciosas endófitas presentes en hortalizas utilizando técnicas microbiológicas y moleculares.

4.1 Objetivo específico

- ✓ Cuantificar la carga total bacteriana e infecciosa presente en hortalizas.
- ✓ Evaluar la eficacia del proceso de desinfección de las hortalizas.
- ✓ Determinar la presencia de bacterias endofíticas infecciosas en hortalizas después de un proceso de desinfección.
- ✓ Identificar a nivel molecular la carga bacteriana utilizando marcadores específicos.

5 Marco conceptual

5.1 Enterobacterias

Las enterobacterias son la familia bacteriana más común presente en las hortalizas y suelen ser bacilos gram negativos, son los microorganismos con mayor frecuencia encontrados en laboratorios de microbiología clínica. Como sugiere el nombre, muchos miembros de esta familia son naturales del tracto gastrointestinal, entre las cuales pertenecen las bacterias coliformes (Ciencia aplicada a la vida, 2019).

5.2 Bacterias coliformes

El término coliforme no tiene un estado taxonómico, pero los coliformes se caracterizan por ser bacilos anaerobios gram negativos no formadores de esporas. Las bacterias coliformes son especímenes de diferentes géneros como: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella*. La coliforme más conocida es *Escherichia coli*, un residente común de los

intestinos de los animales de sangre caliente, pero también se puede encontrar en el entorno natural y fuentes de agua de riego. La mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas, pero algunas cepas pueden causar enfermedades como: gastroenteritis, cistitis, neumonía típica y pielonefritis aguda, entre otras. (Ciencia aplicada a la vida, 2019). Las infecciones gastrointestinales se caracterizan por la colonización y multiplicación microbiana en el tracto digestivo. Estas actúan a través de mecanismos invasivos, toxigénicos o combinados (Allauca, 2020).

En lugar de buscar una especie específica de *Enterobacterias* presentes en hortalizas, la prueba de coliformes ofrece una visión más amplia de los organismos presentes. De esta manera, los coliformes sirven como "organismos indicadores" sugiriendo la posible existencia de condiciones antihigiénicas que pueden albergar organismos patógenos (Ciencia aplicada a la vida, 2019).

Las bacterias Coliformes son un grupo de bacterias estrechamente relacionadas al suelo, el agua y el tracto intestinal de los animales. Han sido utilizadas como indicadores de condiciones insalubres en la producción de alimentos y bebidas durante más de un siglo. Hoy en día, el recuento de Coliformes es un indicador higiénico común en varias industrias de alimentos y bebidas (López & Torres, 2006).

5.3 Métodos para evidenciar la presencia de carga bacteriana

5.3.1 Agar Entérico Hektoen.

Uso: medio de cultivo selectivo y diferencial utilizado para el aislamiento de *Salmonella spp* y *Shigella spp*.

- Microorganismos fermentadores de lactosa: Colonias amarillas o anaranjadas.
- Microorganismos no fermentadores de lactosa: Colonias del color del medio, verdeazuladas.
- Microorganismos productores de SH₂: Colonias con centro negro.
 - a) *Salmonella enteritidis*: Colonias verde azuladas con o sin centro negro.
 - b) *Salmonella typhimurium*: Colonias verde azuladas con o sin centro negro.
 - c) *Shigella flexneri*: Colonias verdes elevadas húmedas.
 - d) *Shigella sonnei*: Colonias verdes elevadas húmedas.

- e) *Proteus mirabilis*: Colonias verdes azuladas con o sin centro negro.
- f) *Escherichia coli* y *Klebsiella Pneumoniae*: Rosa salmón rodeadas a veces por precipitado biliar.
- g) *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*: Inhibidos

5.3.2 Lisina Hierro Agar

Uso: medio de cultivo utilizado para diferenciar microorganismos, especialmente *Salmonella spp*, basado en la descarboxilación y desaminación de la lisina y en la producción de ácido sulfhídrico.

- *Shigella flexneri* ATCC 12022. Buen crecimiento Plano inclinado rojo-morado, Fondo amarillo, H₂S (-).
- *Salmonella arizonae* ATCC 13314. Buen crecimiento Plano inclinado rojo-morado, Fondo rojo-morado, H₂S (+).
- *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. Buen crecimiento Plano inclinado rojo-morado, Fondo rojo-morado, H₂S (+).
- *Escherichia coli* ATCC 25922. Buen crecimiento Plano inclinado rojo-morado, Fondo rojo-morado, H₂S (-).
- *Proteus mirabilis* ATCC 25933. Buen crecimiento Plano inclinado rojo oscuro, Fondo amarillo, H₂S (-).
- *Citrobacter freundii* ATCC 8090. Buen crecimiento Plano inclinado rojo-morado, Fondo amarillo, H₂S (+).

5.3.3 Agar sulfito bismuto

Agar Bismuto Sulfito (Wilson Blair) es una modificación del Wilson Blair Medium, y generalmente aceptado como medio de rutina para la detección de la mayoría de *Salmonella*, en particular *Salmonella typhi*.

- *Shigella flexneri* ATCC 12022. Inhibición parcial, colonias de color marrón.
- *Salmonella enteritidis* ATCC 13076. Buen crecimiento, colonias de color negro con brillo metálico.
- *Salmonella typhi* ATCC 19430. Buen crecimiento, colonias de color negro con brillo metálico.

- *Escherichia coli* ATCC 25922. Inhibición parcial, colonias de color marrón-verde.
- *Enterococcus faecalis*: ATCC 29212. Inhibición.

5.4 Extracción de DNA genómico

La colecta de la muestra y su manejo adecuados son indispensables para una extracción del DNA exitosa. Una colecta y manejo apropiado de la muestra permite obtener DNA íntegro y sin contaminantes, los cuales afectan la acción de las enzimas durante la reacción de PCR. Cada tejido tiene sus consideraciones propias y siempre será necesario conocerlas o preguntar a los especialistas de cada grupo para llevar a cabo una colecta y extracción exitosas. (Velázquez, 2015).

5.5 PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*), sin lugar a duda, es la técnica más importante y revolucionaria en biología molecular, debido a que permite obtener in vitro millones de copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (DNA, siglas en inglés) a partir de una sola molécula (Díaz, 2015).

La PCR se basa en la replicación celular en la que actúan varias proteínas para sintetizar dos nuevas hebras de DNA a partir de otra que funciona como molde.

La molécula original de DNA sirve de molde para que la DNA polimerasa genere una nueva copia de un fragmento de DNA. La DNA polimerasa celular requiere la presencia de un iniciador para llevar a cabo el proceso de replicación (Díaz, 2015).

En la PCR se simula en un tubo lo que ocurre durante la replicación celular. La síntesis de nuevas cadenas de DNA se lleva a cabo mezclando: el DNA que contiene el o los fragmentos que se van a amplificar; la polimerasa; los iniciadores (fragmento de DNA de 15-30 nucleótidos que flanquean la región a amplificar y que aportan el extremo 3' libre para que inicie la transcripción); desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs); cloruro de magnesio ($MgCl_2$) u otro cofactor necesario para que trabaje la polimerasa y una solución amortiguadora que mantenga el pH apropiado para que se lleve a cabo la síntesis. Esta mezcla se somete a la repetición de varios ciclos a diferentes temperaturas (ciclo de PCR) que sustituye a la mayoría de las proteínas que actúan en la replicación celular. Generalmente, la PCR inicia con la desnaturalización o separación de la doble hélice de DNA mediante el

calentamiento de la muestra a una temperatura entre 94 y 96 °C para romper los puentes de hidrógeno que las unían, de esta manera cada cadena queda como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria de DNA. Una vez separadas las cadenas del DNA, se alinean los iniciadores a sitios específicos complementarios de las cadenas sencillas de la región que se va a amplificar, para que esto suceda se baja la temperatura entre 40 y 60 °C lo que permite la unión (alineamiento) de los iniciadores. Finalmente, se sintetiza una nueva cadena en sentido 5' a 3' para lo cual se incrementa la temperatura, por lo general a 72 °C, porque es la temperatura óptima a la cual el DNA polimerasa se une a los iniciadores y comienza la replicación. Estas tres etapas: desnaturalización, alineamiento y extensión del DNA.

Se repiten sucesivamente, en cada nuevo ciclo se amplifica simultáneamente la región de interés de las dos cadenas complementarias. Los productos generados aumentan su concentración de manera exponencial porque cada nueva copia sirve de molde en los ciclos subsiguientes, dando origen a millones de copias del fragmento seleccionado. (Díaz, 2015).

5.6 Marcadores moleculares.

Son biomoléculas que se pueden relacionar con un rasgo genético. Las biomoléculas que pueden ser marcadores moleculares son las proteínas (antígenos e isoenzimas) y el DNA (genes conocidos o fragmentos de secuencia y función desconocida). Cuando varios marcadores moleculares se asocian inequívocamente con un rasgo genético, se dice que forman un QTL (loci de rasgos cuantitativos o cuantificables). Un marcador molecular monomórfico es invariable en todos los organismos estudiados, pero cuando presenta diferencias en el peso molecular, actividad enzimática, estructura, o sitios de restricción, se dice que es polimórfico. A veces el grado de variación es tal que se denominan hipervariable. (Díaz, 2015).

5.7 Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante, DGGE

La DGGE (del inglés *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) es un tipo de electroforesis que permite la separación de fragmentos de DNA del mismo tamaño, pero con diferente secuencia de nucleótidos. Para ello, un gradiente lineal creciente de agentes químicos desnaturizantes del DNA (una mezcla de urea y formamida) se incorpora a lo largo de un gel de poliacrilamida. Durante la electroforesis, se mantiene una temperatura constante de

50-65 °C y los fragmentos de DNA de doble cadena migran por el gel hasta encontrar una determinada concentración de urea y formamida (concentración desnaturizante) a la cual las cadenas se separan localmente y el desplazamiento de las moléculas disminuye o se interrumpe. La concentración desnaturizante a la cual las cadenas se separan depende de la secuencia de nucleótidos, es decir, del contenido de dobles o triples puentes de hidrogeno dependiendo de si son pares de bases adenina-timina o citosina-guanina. Así, fragmentos de DNA con secuencias nucleotídicas diferentes tendrán diferentes posiciones en el gel (Suárez & Le Borgne, 2015).

El fundamento teórico de la DGGE radica en las propiedades fisicoquímicas de la molécula de DNA. Dicha molécula contiene dominios con temperaturas de fusión (T_m) características, de manera que cuando se alcanza una determinada temperatura (o concentración de un agente químico desnaturizante), la molécula se desnaturaliza total o parcialmente, es decir, se separan las cadenas del DNA al romperse los puentes de hidrógeno que las mantienen unidas. La temperatura de fusión de esos dominios depende de variaciones en sus secuencias de nucleótidos y, en general, los fragmentos de DNA ricos en guanina-citosina son más estables y sólo se desnaturalizan en cadenas sencillas una vez que alcanzan altas temperaturas o altas concentraciones de un agente químico desnaturizante (Suárez & Le Borgne, 2015).

El ambiente desnaturizante en la DGGE es asegurado a partir de las siguientes dos condiciones:

- 1) Sometiendo a las moléculas de DNA a una temperatura constante dentro del rango de 50-65 °C. Esta temperatura fue elegida empíricamente para exceder la T_m de un fragmento de DNA rico en adenina-timina en ausencia de agentes químicos desnaturizantes.
- 2) La presencia de urea y formamida que desnaturalizan el DNA al formar puentes de hidrógeno con las bases nitrogenadas impidiendo el apareamiento normal de estas.

6 Antecedentes.

6.1 Causas de la contaminación de hortalizas.

Las hortalizas son vegetales cultivados principalmente en huertos y es común usar agua contaminada para el riego, lo que genera una gran carga microbiana en las hortalizas. En este

contexto, la principal fuente de contaminación proviene del agua de ríos, arroyos y lagos impactados, por la descarga de aguas residuales municipales e industriales, incrementando la presencia de compuestos químicos y proliferación de microorganismos patógenos (Semarnat, 2015).

En los últimos años se ha detectado un mayor número de enfermedades transmitidas por frutas y hortalizas. Los riesgos biológicos asociados a los productos hortícolas están relacionados con las malas prácticas de producción (PeñaI, 2013).

Los brotes de bacteria patógenas entéricas en frutas y hortalizas han tenido un incremento, esto se asocia con los diferentes tipos de contaminantes previos a la cosecha, cuyas bacterias más frecuentes suelen ser *Salmonella* o *Escherichia coli* (Berg et al., 2014).

6.2 Bacterias patógenas presentes en hortalizas.

Las bacterias patógenas se pueden propagar a través de los alimentos y causar diversas enfermedades, la mayoría están relacionadas con *Salmonella*, *Listeria*, *Campylobacter* y *Escherichia coli*. Los cuales forman parte de los grupos de enterobacterias y coliformes (Gimeno, 2019).

De acuerdo con lo reportado por Berg et al. (2014) el aumento en la producción eficiente de hortalizas frescas ha resultado en un aumento de brotes de enfermedades asociadas al consumo de estas. En su estudio se analizaron muestras de lechuga lavadas con soluciones desinfectantes adicionadas con detergentes, que no lograron eliminar la carga bacteriana.

Uno de los cultivos más importantes a nivel mundial es el tomate y es uno de los más susceptibles a una infección de marchitez vascular por *Fusarium oxysporum*, ya que esta se fija dentro de la epidermis de la raíz y ataca el xilema de la hortaliza, causando diferentes enfermedades como amarillamiento, marchitamiento y finalmente la muerte de una planta infectada (Shahzad, et al. 2017).

En la tabla 1 se enlistan algunas de las bacterias patógenas oportunistas que pueden contaminar ciertas hortalizas consumidas por los humanos. Aunque, la mayoría de las bacterias que afectan la salud del hombre son oportunistas, el grupo más representativo dentro de estas son las bacterias entéricas.

Tabla 1. Bacterias presentes en frutos y vegetales

Especie de bacteria	Frutos y vegetales hospedadores	Referencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Jitomate y zanahoria	
<i>Serratia spp.</i>	Pepino	
<i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Zanahoria, cebolla y jitomate	
<i>Salmonella spp.</i>	Jitomate, mango, espinaca,	(Rojas Solis & Santoyo Pizano, 2018).
<i>Escherichia coli</i>	naranja, lechuga	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Cebolla	
<i>Enterobacter aerogenes</i>		
<i>Enterobacter hormaechei</i>	Zanahoria	
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Jitomate, pepino, cebolla	

Se han realizado estudios sobre los efectos en la salud causados por bacterias, enfocándose en bacterias ácido lácticas beneficiosas y en las bacterias patógenas como *Salmonella*, *Listeria* y *Escherichia coli* (KõivI et al, 2019); por el momento no se han contemplado otras bacterias patógenas presentes en los alimentos.

6.3 Bacterias endófitas en hortalizas.

Dentro de las plantas viven una infinidad de microorganismos, como las bacterias endófitas son bacterias que viven en un ambiente seguro y protegido, se pueden distribuir en las raíces (rizosfera), en las hojas (filoplano), en los tallos (caulosfera), en los frutos (carposfera), en las semillas (espermosfera) y en las flores (antosfera) (Shahzad et al., 2017). Algunas bacterias pueden ser de las especies más conocidas como patógenos oportunistas: *Salmonella entérica*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Staphylococcus aureus*, las cuales son causantes de diversas enfermedades en las personas (Rojas & Pizano, 2019).

En ocasiones las bacterias endófitas pueden ser patógenas bajo ciertas condiciones, en función del genotipo de la planta. Estudios también señalan que las bacterias endófitas interactúan con patógenos. La infección por bacteria patógenas puede darse a través de los estomas o heridas, ya que las bacterias endófitas pueden producir enzimas hidrolíticas que pueden degradar la pared celular de las hortalizas (Perez et al, 2009).

7 Materiales y método

7.1 Recolección de muestras

Se analizaron 3 hortalizas adquiridas en la central de abastos de Ecatepec de Morelos, Estado de México, las cuales fueron zanahoria (*Daucus carota*) proveniente de locales 217, 225 y 228 elegidos al azar; espinaca (*Spinacia oleracea*) y lechuga italiana (*Lactuca sativa*) provenientes de los locales 15, 34 y 150 elegidos al azar. Las muestras se analizaron por triplicado, como se observa en la tabla 2.

Tabla 2. Hortalizas seleccionadas

Local	Hortaliza	Tejido analizado
L-15	Lechuga	Hojas
L-34	Lechuga	
L-150	Lechuga	
L-15	Espinaca	Hojas, peciolo y tallo
L-34	Espinaca	
L-150	Espinaca	
L-217	Zanahoria	Corteza, Floema y Xilema
L-225	Zanahoria	
L-228	Zanahoria	

7.2 Aislamiento e identificación de bacteria presentes en hortalizas

7.2.1 Aislamiento y caracterización morfológica

Las muestras de hortalizas fueron separadas en dos grupos, uno sin lavar y uno lavado con agua de la llave, para determinar la carga bacteriana de las hortalizas y la cantidad de carga bacteriana que se logra remover con el lavado. Las muestras fueron maceradas por separado

en un mortero esterilizado por flama para evitar contaminación cruzada, el macerado obtenido fue suspendido en 50 ml agua destilada estéril en tubos falcón. La muestra se homogenizo con ayuda de un vortex y se tomaron alícuotas de 1 mL de cada muestra por triplicado, con ellas se inocularon 10 ml de caldo nutritivo contenido en tubos de ensaye, estos se incubaron por 24 horas a 37 °C. Posteriormente, los cultivos de cada tubo de ensaye fueron sembrados por estría cruzada en placas de agar nutritivo, agar MacConkey y agar Cetrimida, para obtener colonias puras. Las colonias obtenidas se usaron como inóculo para sembrar por picadura en agares específicos y selectivos (agar entérico Hektoen, agar hierro lisina y agar sulfito bismuto), para realizar la identificación según las fichas técnicas de cada medio. Se le realizó la caracterización morfológica y tinción Gram a todas las muestras obtenidas. Los cultivos aislados fueron conservados a -20°C con glicerol al 25%.

7.2.2 Proceso de desinfección y viabilidad

Se tomaron muestras de las diferentes hortalizas, las cuales fueron sometidas a procesos de desinfección utilizando hipoclorito de sodio (Cloralex ®, el rendidor ®) y gotas de plata ionizada (Biopur®), como control se utilizó una muestra sin lavar y una lavada con agua corriente. El proceso de desinfección fue el recomendado por el fabricante, aplicando 10 gotas de hipoclorito de sodio durante 5 minutos o 10 gotas de plata ionizada por 15 minutos, para posteriormente aclarar las hortalizas sumergiendo por 10 minutos en agua purificada. Posterior al proceso de desinfección, las muestras fueron maceradas en un mortero esterilizado por flama para evitar contaminación cruzada y el macerado se suspendió en 50 mL agua destilada estéril en tubos Falcón de 50 mL. Se prepararon tubos de ensaye con caldo nutritivo y se inocularon con las respectivas muestras, a una temperatura de 37°C durante 24 horas.

Para medir la viabilidad de las muestras se utilizó la técnica de la gota, haciendo diluciones de los cultivos obtenidos previamente, se utilizaron 900 µL de solución de agua peptonada y 100 µL de muestra (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9}), sembrando solo las diluciones 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} y 10^{-9} en placas de agar nutritivo para cuantificar UFC/mL. En la tabla 3 se lisan las muestras de cada hortaliza para el análisis de DNA de las bacterias después de ser sometidas a un proceso de desinfección. Los resultados fueron interpretados mediante

el programa SigmaPlot utilizando un análisis estadístico de Anova trifactorial.

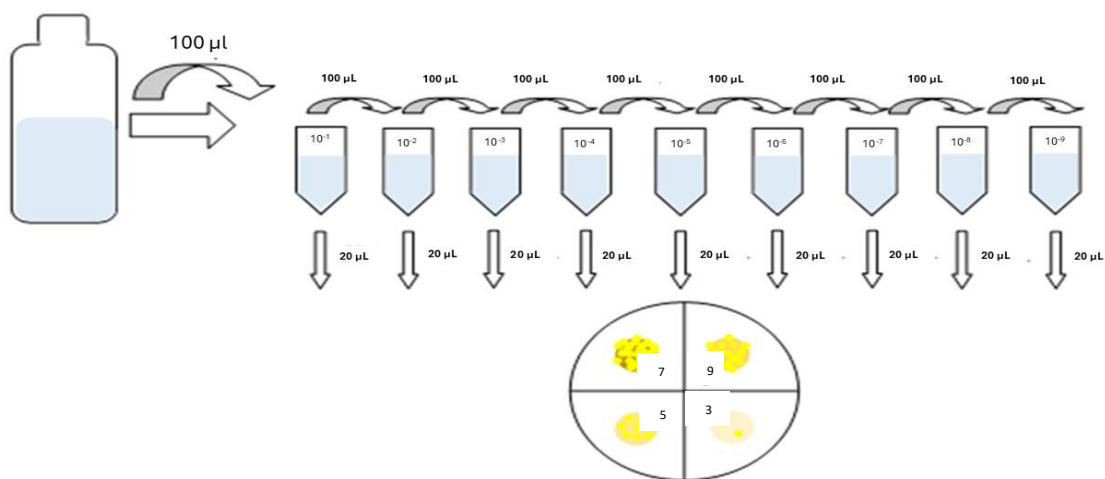


Figura 1. Diagrama de diluciones para el cálculo de UFC/mL. (Elaboración propia)

Adicional a esto, las 36 muestras se sometieron a un proceso de desinfección prolongado, utilizando 25 gotas de cloro (Cloralax ®, el rendidor) por un periodo de 30 minutos, con el fin de poder remover el máximo de bacterias presentes en la parte externa. Se siguió el procedimiento de desinfección previamente descrito.

7.3 Análisis estadístico

Para evaluar si existe una diferencia de eliminación bacteriana significativa entre cada proceso de desinfección, se analizó y comparo cada uno de los procesos de desinfección obtenidos en las diferentes muestras mediante el conteo de UFC/mL, se calculó la base logarítmica de cada uno y se utilizó el programa estadístico SigmaPlot y empleando un Anova trifactorial debido a las variables del estudio.

7.4 Análisis molecular de muestras

7.4.1 Extracción de DNA metagenómico

La extracción de DNA metagenómico de las muestras de hortalizas se realizó utilizando el protocolo descrito por (Doyle & JL , 1990), modificado según se indica en el (anexo 13.3) y conforme al orden establecido en la tabla 3.

Tabla 3. Control de muestras y tratamientos de desinfección para extracción de DNA.

#	Muestra	Hortaliza	Tratamiento	#	Muestra	Hortaliza	Tratamiento
1	L-15	Lechuga	Sin lavar	19	L-15	Espinaca	Agua
2	L-15	Lechuga	Agua	20	L-15	Espinaca	Sin lavar
3	L-15	Lechuga	Gotas	21	L-34	Espinaca	Agua
4	L-15	Lechuga	Cloro	22	L-34	Espinaca	Cloro
5	L-34	Lechuga	Gotas	23	L-34	Espinaca	Plata ionizada
6	L-34	Lechuga	Cloro	24	L-34	Espinaca	Sin lavar
7	L-34	Lechuga	Agua	25	L-217	Zanahoria	Plata ionizada
8	L-34	Lechuga	Sin lavar	26	L-217	Zanahoria	Cloro
9	L-150	Lechuga	Gotas	27	L-217	Zanahoria	Agua
10	L-150	Lechuga	Cloro	28	L-217	Zanahoria	Sin lavar
11	L-150	Lechuga	Agua	29	L-225	Zanahoria	Plata ionizada
12	L-150	Lechuga	Sin lavar	30	L-225	Zanahoria	Cloro
13	L-150	Espinaca	Gotas	31	L-225	Zanahoria	Agua
14	L-150	Espinaca	Agua	32	L-225	Zanahoria	Sin lavar
15	L-150	Espinaca	Cloro	33	L-228	Zanahoria	Plata ionizada
16	L-150	Espinaca	Sin lavar	34	L-228	Zanahoria	Cloro
17	L-15	Espinaca	Gotas	35	L-228	Zanahoria	Agua
18	L-15	Espinaca	Cloro	36	L-228	Zanahoria	Sin lavar

Se visualizó el ADN obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X (20 ml de TAE 50X por un litro de agua) con un voltaje de 85 V durante 40 minutos, utilizando BenchTop 1Kb DNA Ladder (Promega, USA) como marcador de peso molecular. Posteriormente, los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio (10 μ L/100 ml de agua destilada) y se visualizaron en un transiluminador PhotoDocc-ItTM Imaging System (UVP).

Las muestras de DNA metagenómico fueron ajustadas a una concentración de 100 ng/ μ L, se cuantificó la concentración de DNA utilizando el programa precargado en el espectrofotómetro (Cole Parmer modelo UV2150). Para la cuantificación de DNA se colocando 1 μ L de muestra de DNA en 100 μ L de agua pura estéril en celdas espectrofotométricas.

7.4.2 Amplificación del gen 16S rRNA

La amplificación del gen 16S rRNA se realizó mediante los iniciadores universales para bacterias 46F 5'-GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3' y 1540R 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3' (Edwards, et al. 1989), el fragmento a obtener corresponde a un tamaño de 1500 pb. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Mastercycler nexus® Eppendorf flexlid). La mezcla de reacción (20 µL) contenía 100 ng de DNA: 4 µL de buffer de reacción 5X (Promega), 2.4 µL de solución de MgCl₂ a 25 µM, 0.5 µL de una mezcla de dinucleótidos trifosfatados (DNTP's) 10 µM, 2 µL de mezcla de iniciadores, 4 µL de BSA, 0.5 µL DE GoTaq® Flexi DNA polimerasa, 2 µL de DNA (100 ng) y 4.6 µL de agua pura estéril. Las muestras se incubaron durante 6 minutos a 94°C para desnaturalizar el DNA, posteriormente se realizaron 25 ciclos de 94°C (50 segundos), 55°C (1 minuto) y 72°C (1 minuto), finalmente un ciclo de extensión a 72°C durante 5 minutos. (Modificado de Neria-Gonzalez, et al., 2006). Cada reacción fue acompañada de un control negativo, el cual contenía una cantidad proporcional de la mezcla de reacción, pero sin muestra de DNA.

Los productos de PCR se visualizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X (20ml de TAE 50X por un litro de agua) con un voltaje de 120 V durante 60 minutos, utilizando como marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (GOLDBIO). Posteriormente se tiñeron en una solución de bromuro de etidio (10µ x 100 ml de agua destilada). Los geles fueron visualizados mediante el transiluminador PhotoDocc-It™ Imaging System (UVP).

7.4.3 Amplificación de genes específicos

Una segunda amplificación específica se realizó a partir de los amplicones obtenidos de la PCR anterior. Los productos del gen 16S rRNA sirvieron de molde, por lo que, la concentración de cada amplicon fue ajustada a 100 ng/µL. La PCR correspondiente se realizó utilizando iniciadores específicos a diferentes grupos bacterianos con características infecciosas. Los iniciadores 16SF1 5'-TGT TGT GGT TAA TAA CCG CA-3' y 16SIII 5'-CAC AAA TCC ATC TCT GGA-3' son específicos al género *Salmonella*, obteniéndose un fragmento de 572 bp (Lin & Tsen, 1996); Rfb-F 5'-AAC GGT TGC TCT TCA TTT AG-3' y Rfb-R 5'-GAG ACC ATC CAA TAA GTG TG-3' amplifica una región específica para *Escherichia coli* con un segmento de 678 bp (Lee, et al., 2014); PA-GS-F 5'-GAC GGG

TGA GTA ATG CCT A-3' y PA-GS-R 5'- CAC TGG TGT TCC TTC CTA TA-3' son específicos al género de *Pseudomonas* y se obtiene un segmento de 617 pb (Wagner, et al., 2008); y los iniciadores LIS-F 5'-AGCTTGCTCTTCCAAAGT-3' y LIS-R 5'-AAGCAGTTACTCTTATCCT-3' amplifican un fragmento de 400 bp específico para *Listeria* spp. (Nabi et al., 2011). Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador (Mastercycler nexus® Eppendorf flexlid). La mezcla de reacción (20 µL) contenía: 4 µL de buffer de reacción 5X (Promega), 2.4 µL de solución de MgCl₂ a 25 µM, 0.5 µL de una mezcla isonucleotídica de dinucleótidos trifosfatados (DNTP's) a 10 µM, 2 µL de mezcla de iniciadores, 4 µL de BSA, 0.5 µL DE GoTaq® Flexi DNA polimerasa, 2 µL de DNA (100 ng) y 4.6 µL de agua pura estéril. Las muestras se incubaron durante 6 minutos a 94°C para desnaturalizar el DNA, posteriormente se realizaron 25 ciclos de 94°C (50 segundos), 55°C (1 minuto) y 72°C (1 minuto), finalmente un ciclo de extensión a 72°C durante 5 minutos. (Modificado de Neria Gonzalez, et al., 2006). Cada reacción fue acompañada de un control positivo el cual contenía muestra de DNA y uno negativo sin DNA.

Los productos de PCR se visualizaron mediante una electroforesis en geles de agarosa al 2% en buffer TAE 1X (20mL de TAE 50X por un litro de agua) con un voltaje de 120 V durante 60 minutos, utilizando como marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (GOLDBIO). Posteriormente se tiñeron en una solución de bromuro de etidio (10µ x 100 mL de agua destilada). Los geles fueron visualizados utilizando en transiluminador PhotoDocc-It™ Imaging System (UVP).

7.4.4 Amplificación del gen 16S rRNA para DGGE

Los productos amplificados del gen 16S rRNA se utilizaron como molde para amplificar una la región variable V3 usando los iniciadores MAR-1 (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3') y MAR-2 (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'). El producto esperado posee un tamaño de 240 bp aproximadamente (Muyzer, et al., 1993). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Mastercycler nexus® Eppendorf flexlid). La mezcla de reacción (20 µL) contenía: 4 µL de buffer de reacción 5X (Promega), 2.4 µL de solución de MgCl₂ a 25 mM, 0.5 µL de una mezcla isonucleotídica de dinucleótidos trifosfatados (DNTP's) a 10 mM, 2 µL de mezcla de iniciadores, 4 µL de BSA, 0.5 µL DE GoTaq® Flexi DNA polimerasa, 2

μL de DNA (100 ng) y 4.6 μL de agua inyectable. Las muestras se incubaron durante 6 minutos a 94°C para desnaturalizar el DNA, posteriormente se realizaron 25 ciclos de 94°C (50 segundos), 55°C (1 minuto) y 72°C (1 minuto), finalmente un ciclo de extensión a 72°C durante 5 minutos Modificado de Neria, et al. (2006). Cada reacción fue acompañada de un control negativo.

Se visualizaron los productos de PCR mediante una electroforesis en geles de agarosa al 2% en buffer TAE 1X (20 mL de TAE 50X por un litro de agua) con un voltaje de 120 V durante 60 minutos, utilizando como marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (GOLDBIO). Posteriormente se tiñeron en una solución de bromuro de etidio (10 μ x 100 mL de agua destilada). Los geles fueron visualizados utilizando en transiluminador PhotoDocc-It™ Imaging System (UVP).

7.5 DGGE

Para evaluar la diversidad bacteriana presente en las muestras de hortalizas antes y después de ser sometidas a un proceso de desinfección, se utilizaron los amplicones obtenidos anteriormente, utilizando el equipo de BIO-RAD (DCode™ Sistema Universal de mutaciones).

7.5.1 Condiciones

La DGGE se realizó en geles de 1 mm de grosor compuesto por una solución de acrilamida al 8% con un gradiente desnaturalizante de formamida al 40% y una solución de urea al 60%. La electroforesis se realizó a temperatura constante de 60°C con 130V durante 2.5 horas (según el manual del equipo).

Tabla 4. Formulación de las soluciones desnaturalizante.

Reactivo	Solución al 40%	Solución al 60%	Referencia
Acrilamida/Bis 40% (mL)	20	20	
TAE 50% (mL)	2	2	
Formamida (mL)	16	24	(Suárez & Le
Urea (g)	16.8	25.2	Borgne, 2015)
Agua MilliQ (mL)	c.s.p. 100 mL	c.s.p. 100 mL	
Volumen total (mL)	100	100	

Tabla 5. Formulación de las soluciones desnaturalizantes 40% y 60%.

REACTIVO	SOLUCION 40%	SOLUCIÓN 60%	REFERENCIA
SOL. DESN.	20 mL	20 mL	
TEMED	10 µL	10 µL	(Suárez & Le Borgne, 2015)
PSA (10%)	70 µL	70 µL	

7.5.2 Tinción del gel de DGGE

La detección de bandas se llevó a cabo mediante el uso de una solución de bromuro de etidio (10µ x 100 mL de agua destilada). Los geles fueron visualizados utilizando un transiluminador PhotoDocc-It™ Imaging System (UVP).

7.5.3 Análisis de comunidades a partir de DGGE

Debido a la asignación taxonómica de los individuos es operacional y con base en su secuencia en la región parcial del gen que codifica para 16S rRNA, se definió cada grupo (banda) como una unidad taxonómica operacional (OTU) distinta.

La DGGE nos permite separar los fragmentos de DNA de la misma longitud, pero con base en su secuencia particular, considerando cada banda como una población OTU, la intensidad de cada banda corresponde a la densidad del OTU que es considerada como su abundancia relativa dentro de la comunidad.

8 Resultados

8.1 Aislamiento y cuantificación de la carga total bacteriana e infecciosa en hortalizas

El aislamiento de bacterias infecciosas se realizó a partir de un cultivo enriquecido en caldo Nutritivo obtenido de cada muestra de hortaliza: espinaca, lechuga y zanahoria, tal como se describió en la metodología. Cada cultivo obtenido se inoculó en agar Nutritivo, agar MacConkey y agar Cetrinida por estría cruzada. Las colonias aisladas en cada medio de cultivo fueron transferidas por picadura a una placa de agar del medio de cultivo original, generando una colección de cepas aisladas, este resultado se resume en la tabla 6. La descripción morfológica de cada una de las colonias aisladas se presenta en el [anexo 13.1](#).

Tabla 6. Número de bacterias aisladas por hortaliza (UFC/mL).

	Agar nutritivo	Agar cetrimida	Agar McConkey	Total
Zanahoria	37	24	23	84
Espinaca	48	39	40	127
Lechuga	21	18	15	54
Total	106	81	78	265

8.2 Clasificación bacterias infecciosas a través medios de cultivos diferenciales

Las 265 cepas aisladas fueron clasificadas con base en sus características bioquímicas al ser cultivadas en diferentes medios selectivos y diferenciales tales como el agar entérico hektoen, agar sulfito bismuto y agar hierro lisina. Estos medios tienen componentes que muestran diferencias físicas de acuerdo con el metabolismo, lo que facilita la clasificación y relación de las cepas aisladas con bacterias conocidas por causar de infecciones gastrointestinales, de leves hasta severas, ver Figura 3

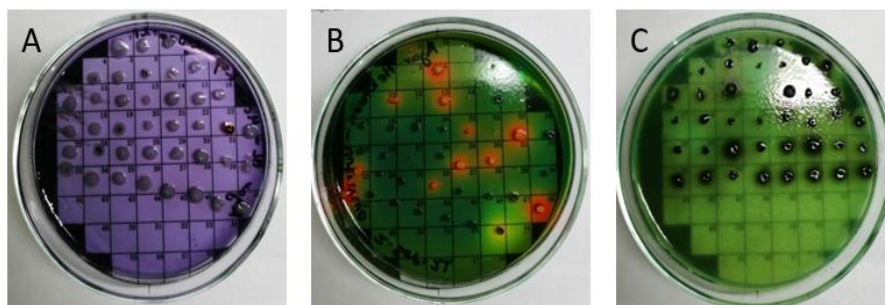


Figura 2. Clasificación de bacterias infecciosas presentes en hortalizas, (A) bacterias en agar hierro lisina para la identificación de posibles *S. arizonae*, *typhimurium* o *Escherichia coli*. y *Shigella flexneri*, *Proteus mirabilis* o *Citrobacter freundii*. (B) bacterias en agar entérico hektoen para la identificación de posibles *S. enteritidis* o *typhimurium* y *Shigella flexneri* o *sonnei*, debido a la coloración (C) bacterias en agar sulfito bismuto para la identificación de posibles *S. enteritidis* o *typhi* y *Escherichia coli*

Las cepas aisladas en agar Nutritivo, Cetrimida y MacConkey por hortaliza fueron cultivadas en agar entérico hektoen, agar sulfito bismuto y agar hierro lisina. Los resultados indicaron que no todas las colonias obtenidas crecieron en estos medios específicos, como se resume

en la tabla 7. Lo que sugiere que no todas las cepas aisladas pertenecen al grupo de bacterias infecciosas de interés definido por cada medio de cultivo utilizado. Por lo tanto, se creó una matriz para visualizar la presencia de cada bacteria infecciosa según la ficha técnica de cada medio de cultivo empleado (Tabla 8). Además, se determinó el porcentaje de cada una de las bacterias infecciosas presentes en zanahoria, lechuga y espinaca, como se muestra en la Figura 4.

Tabla 7. Número de bacterias crecidas en medios selectivos.

	Entérico hektoen (E.H)			Sulfito bismuto (S.B)			hierro lisina (H.L)		
	Nutritivo	Cetrimida	MacConkey	Nutritivo	Cetrimida	MacConkey	Nutritivo	Cetrimida	MacConkey
Zanahoria	24/37	22/24	23/23	24/37	22/24	23/23	24/37	24/24	23/23
Espinaca	33/48	39/39	39/40	44/48	39/39	40/40	44/48	39/39	40/40
Lechuga	17/21	18/18	15/15	18/21	15/18	15/15	21/21	18/18	15/15
Total	74	89	77	86	86	78	89	94	78

Tabla 8. Matriz de posible clasificación de bacterias infecciosas en zanahoria, espinaca y lechuga.

	Zanahoria			Espinaca			Lechuga		
	EH	SB	HL	EH	SB	HL	EH	SB	HL
<i>Escherichia coli.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>Listeria nomocytogenes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	+	-	-	+	+	-	+
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Salmonella spp</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Shigella spp</i>	+	-	+	+	-	+	+	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*EH= Entérico hektoen, SB= Sulfito bismuto, HL= hierro lisina

La distribución porcentual de las bacterias infecciosas detectadas para cada hortaliza analizada se presenta en la Figura 3. La Figura 3a muestra la carga bacteriana para la espinaca que es claramente representada por *Salmonella spp.* (28%) y *E. coli* (20%). La Figura 3b indica que la mayor presencia bacteriana corresponde a especies del género *Salmonella* y *E.*

coli. Este mismo resultado se presenta en la carga bacteriana infecciosa en zanahoria Figura 3c, donde el 27% es representado por los mismos géneros bacterianos.

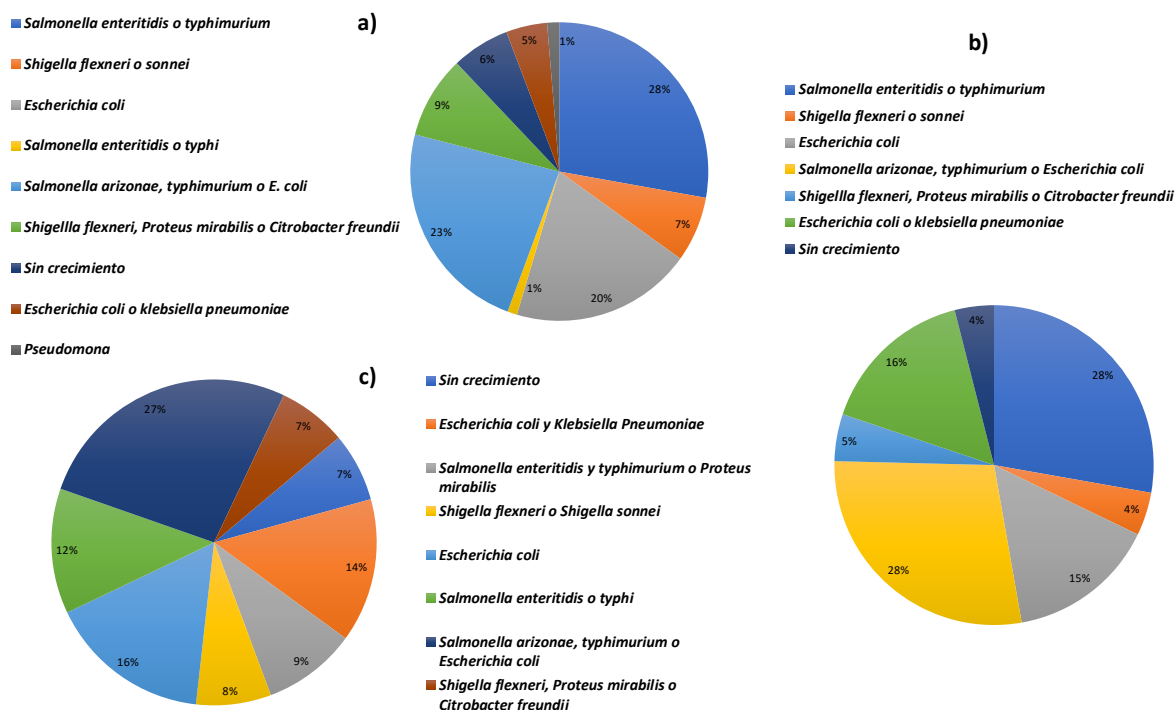


Figura 3 identificación de bacterias infecciosas detectadas

8.3 Evaluación de la eficacia del proceso de desinfección.

En el mercado existen diferentes productos para la eliminación de la carga microbiana del agua, frutas y verduras como: Microdyn®, SaniCitrus®, Macrosin®, hipoclorito de sodio, Biopur®, entre otros. Cada uno de ellos asegura la eliminación de bacterias, virus y parásitos presentes en los alimentos de consumo diario. Su principio activo se basa principalmente en plata coloidal, yodo e hipoclorito de sodio. El método de uso consiste en aplicar unas cuantas gotas en el agua donde se sumergirán los alimentos o la misma agua por un tiempo determinado, garantizando la eliminación de organismos indeseables. En este trabajo se utilizaron los productos Cloralex®, el rendidor® y Biopur® siguiendo las indicaciones de cada producto.

Las muestras de hortalizas fueron divididas en dos grupos, en el primero las muestras fueron sometidas a los procesos de desinfección y en el otro grupo se realizó un lavado con agua corriente, como control se utilizó una muestra sin tratar (sin lavar).

La viabilidad de las bacterias presentes en hortalizas se midió mediante UFC/mL empleando la técnica de la gota, que consiste en realizar una serie de diluciones de una muestra madre, ocupando un volumen de 900 μL de agua peptonada y 100 μL de la muestra, como se muestra en la Figura 8 y sembrando 20 μL de cada muestra en cajas con agar nutritivo ocupando solo las diluciones 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} y 10^{-9} .

En las diluciones de 10^{-3} se obtuvo un crecimiento incontable en todas las muestras y algunos casos en las diluciones 10^{-5} , las mejores diluciones para el conteo de UFC/mL fueron la 10^{-7} y 10^{-9} .

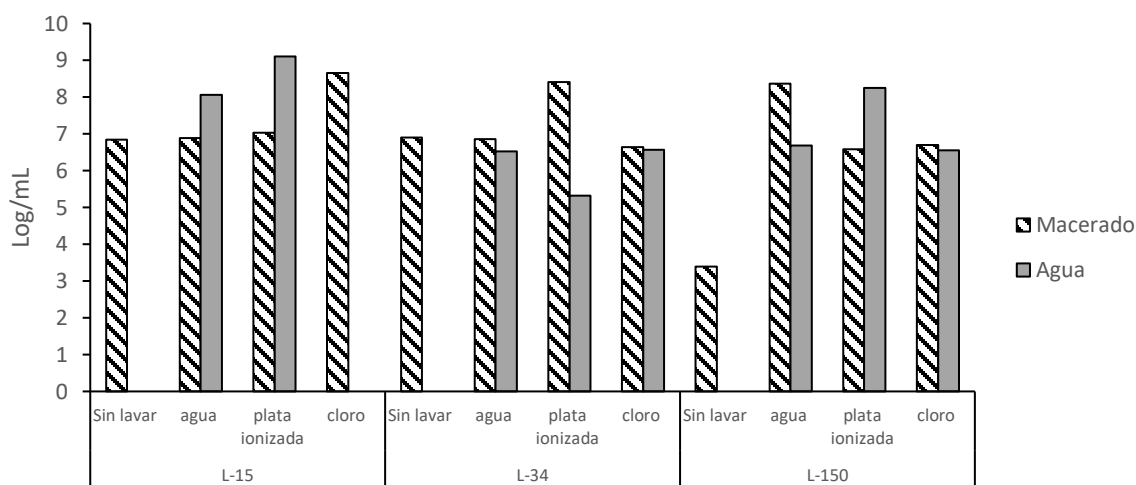


Figura 4. Comparación de los procesos de desinfección de muestras de espinaca

Se calculó el log/mL de cada muestra partiendo de las UFC/mL, comparando los cuatro procesos diferentes sobre las tres muestras de espinaca, en el tratamiento donde se empleó un lavado con agua en el proceso de sin lavar y cloro de la muestra L-15, en el proceso de sin lavar de la muestra L-34 y proceso sin lavar de la muestra L-150 se obtuvo un crecimiento incontable en las diluciones empleadas, por lo que se reporta en cero.

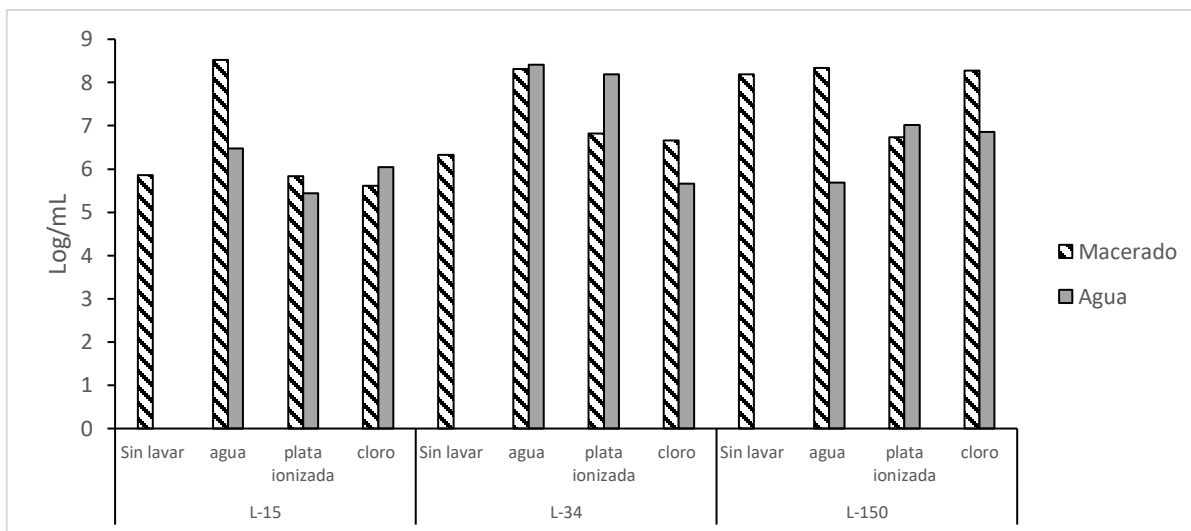


Figura 5. Comparación de los procesos de desinfección de muestras de lechuga

Se calculó el log/mL de cada muestra partiendo de las UFC/mL, comparando los cuatro procesos diferentes sobre las tres muestras de lechuga, en el tratamiento donde se empleó un lavado con agua en el proceso de sin lavar de la muestra L-15, en el proceso de sin lavar de la muestra L-34 y proceso sin lavar de la muestra L-150 se obtuvo un crecimiento incontable en las diluciones empleadas, por lo que, se reporta como cero.

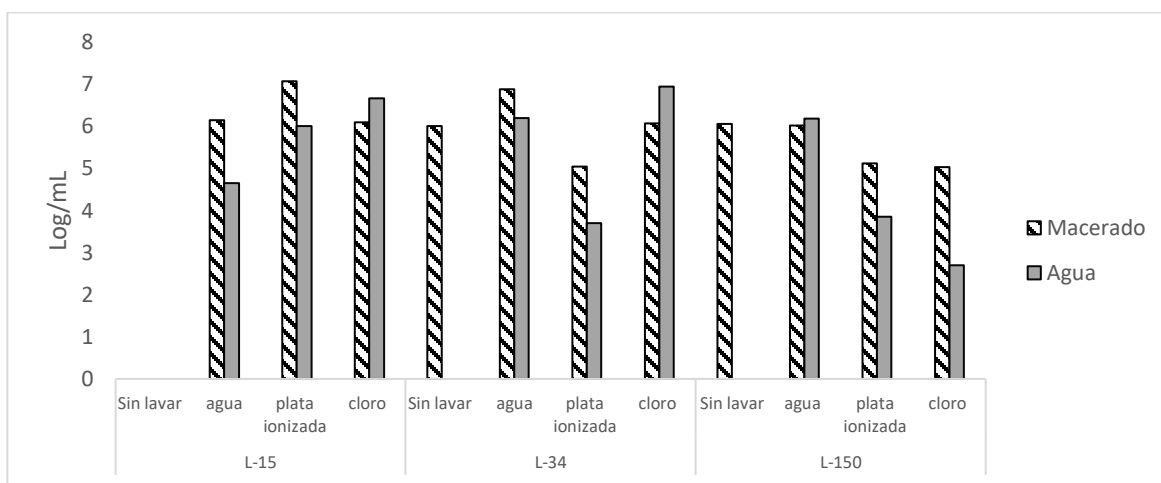


Figura 6. Comparación de los procesos de desinfección de muestras de zanahoria

Se calculó el log/mL de cada muestra partiendo de las UFC/mL, comparando los cuatro procesos diferentes sobre las tres muestras de zanahoria, en la muestra L-15 en el proceso sin lavar empleando ambos tratamientos de macerado y lavado con agua se obtuvo un

crecimiento incontable reportado como cero, en el tratamiento donde se empleó un lavado con agua en el proceso sin lavar de la muestra L-34 y proceso sin lavar de la muestra L-150 se obtuvo un crecimiento incontable en las diluciones empleadas, por lo que se reporta como cero.

Para el análisis de los resultados obtenidos sobre los tratamientos de desinfección se utilizó el programa SigmaPlot para realizar un análisis estadístico empleando un Anova trifactorial por las variables del estudio, obteniendo lo siguiente:

8.3.1 Muestra de Espinaca.

Se obtuvo un resultado de "Do not test" debido a que no se encuentra una diferencia significativa entre dos medias que encierran esa comparación, por lo tanto, en las comparaciones de los procesos de desinfección en muestras de espinaca no existe alguna diferencia significativa entre procesos de desinfección, pero si existe una diferencia entre el tipo de tratamiento.

Tabla 9. Comparación de los procesos de desinfección en muestras de espinaca y procesos de desinfección.

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Agua vs. Sin lavar	3.697	4	3.231	0.141	No
Agua vs. Cloro	1.372	4	1.198	0.831	Do Not Test
Agua vs. Gotas	0.12	4	0.105	1	Do Not Test
Gotas vs. Sin lavar	3.578	4	3.126	0.16	Do Not Test
Gotas vs. Cloro	1.252	4	1.094	0.865	Do Not Test
Cloro vs. Sin lavar	2.326	4	2.032	0.495	Do Not Test
Macerado vs. Agua	3.337	2	4.124	0.01	Yes

8.3.2 Muestra de Lechuga.

No existen alguna diferencia significativa entre procesos de desinfección excepto en el proceso de gotas vs sin lavar, lo que nos indica que en esta muestra las gotas de plata removieron más carga bacteriana en comparación de los otros procesos de desinfección y existe una diferencia entre el tipo de tratamiento, debido a la presencia de posibles bacterias endófitas ya antes mencionadas.

Tabla 10. Comparación de los procesos de desinfección en muestras de lechuga y procesos de desinfección.

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Gotas vs. Sin lavar	4.28	4	4.276	0.035	Yes
Gotas vs. Cloro	0.712	4	0.711	0.957	No
Gotas vs. Agua	0.385	4	0.385	0.993	Do Not Test
Agua vs. Sin lavar	3.895	4	3.891	0.06	No
Agua vs. Cloro	0.326	4	0.326	0.996	Do Not Test
Cloro vs. Sin lavar	3.568	4	3.565	0.092	Do Not Test
Macerado vs. Agua	2.587	2	3.656	0.019	Yes

8.3.3 Muestra de Zanahoria.

Existen diferencia entre los tratamientos cuando son comparados con las muestras sin lavar, ya que se puede observar una disminución en la carga bacteriana presente, al igual que en el tipo de tratamiento.

Tabla 11. Las comparaciones de los procesos de desinfección en las muestras de zanahoria y procesos de desinfección.

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Agua vs. Sin lavar	6.995	4	6.34	0.002	Yes
Agua vs. Cloro	0.426	4	0.386	0.993	No
Agua vs. Gotas	0.212	4	0.192	0.999	Do Not Test
Gotas vs. Sin lavar	6.784	4	6.148	0.002	Yes
Gotas vs. Cloro	0.214	4	0.194	0.999	Do Not Test
Cloro vs. Sin lavar	6.569	4	5.954	0.003	Yes
Macerado vs. Agua	4.049	2	5.189	0.002	Yes

8.4 Detección de grupos bacterianos infecciosos endógenos en hortaliza

Las muestras de hortalizas (lechuga, espinaca y zanahoria) fueron sometidas a un proceso de desinfección externa, utilizando gotas de plata desionizada e hipoclorito de sodio (Cloralex ®, el rendidor ®) con base a las especificaciones de cada producto. Además, a las hortalizas desinfectadas se les retiró la membrana externa, con gran cuidado para las hojas verdes, y

para la zanahoria se utilizó un pelador, el cual fue desinfectado por flama en cada uso. Posteriormente, 15 gramos de cada muestra fue macerada en un mortero esterilizado por flama, los macerados fueron transferidos en tubo falcón estéril de 50 mL y se añadió 40 mL de agua destilada estéril. Las muestras maceradas de cada hortaliza se llevaron a una temperatura de 4 °C para evitar el crecimiento microbiano. La extracción de DNA metagenómico se realizó con una alícuota de 0.5 gramos de cada hortaliza. Las muestras de DNA metagenómico se reservaron en baño de hielo y se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1% en TAE 1× (Figura 9).

Los extractos de DNA metagenómico de muestras de hortalizas (Figura 8) fueron ajustados a una concentración de 100 ng/μL para la amplificación del gen 16S rRNA. Los amplicones fueron valorados por electroforesis y utilizados para la detección de bacterias endofíticas usando diferentes iniciadores específicos para los siguientes grupos bacterianos: *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp. y *Listeria* spp. Las muestras de DNA de las hortalizas sin tratar y lavadas sólo con agua fueron consideradas como controles positivos para la detección de la carga total de cada grupo microbiano.

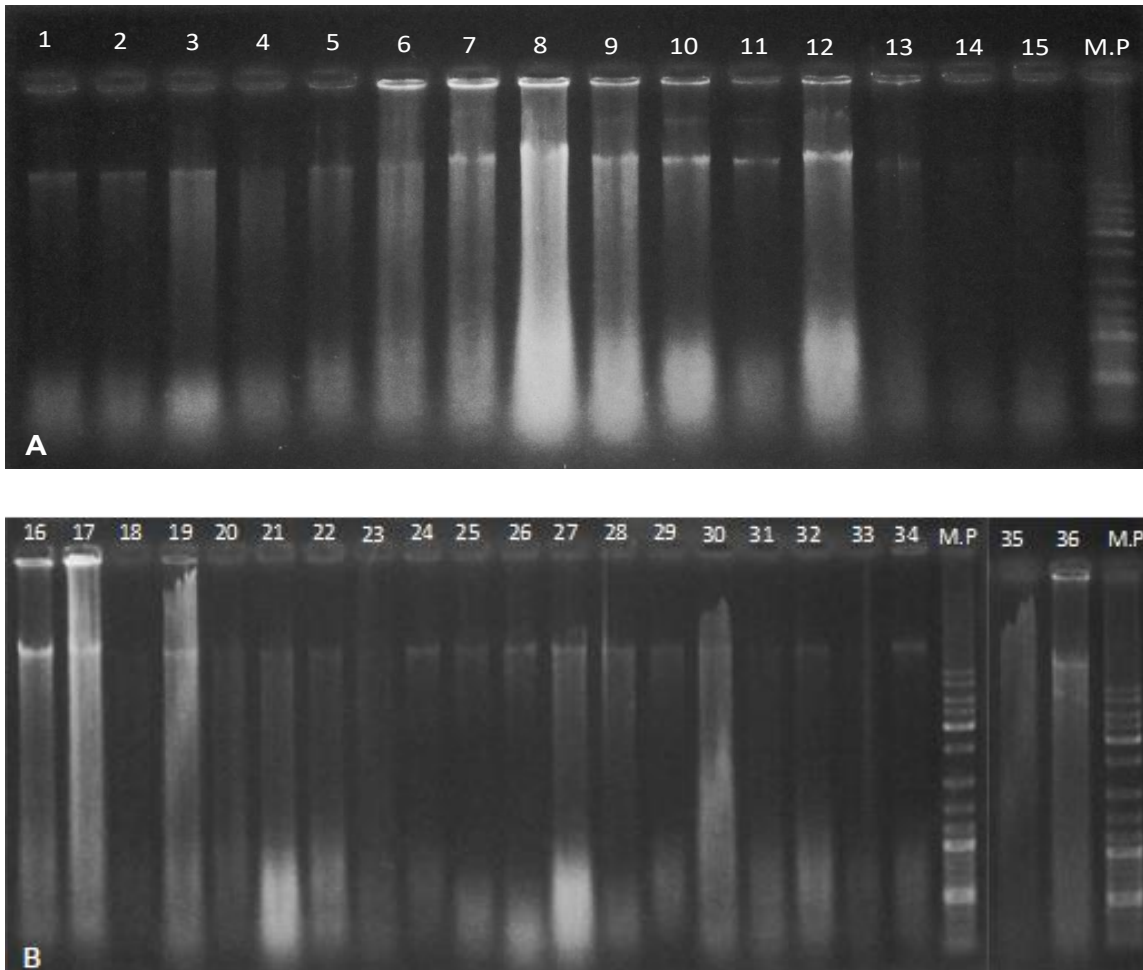


Figura 7. Extracción de DNA metagenómico de las 36 muestras de hortalizas desinfectadas. (1-12) muestra de espinaca, (13-24) muestra de lechuga y, (25-36) muestra de zanahoria.

Para realizar la detección de *Pseudomonas*, *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, y *Listeria* spp por PCR, se probó la especificidad de cada par de iniciadores utilizados con cepas conocidas para cada grupo. Los resultados obtenidos de cada PCR específica se muestran en la Figura 9.

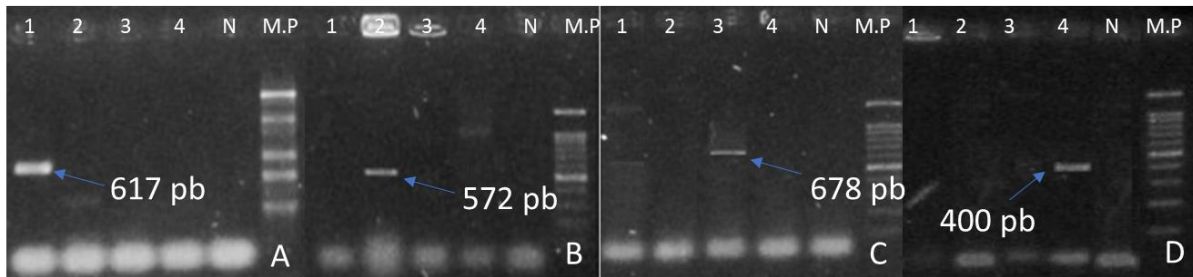


Figura 8. Prueba de especificidad de la PCR para la detección de grupos bacterianos infecciosos. Los amplicones de cada PCR fueron evaluados por electroforesis, las muestras de cada PCR fueron ordenadas tal como indica: 1. *Pseudomonas*, 2. *Salmonella*, 3. *Escherichia coli*, 4. *Listeria spp.*, 5. Control negativo y MP marcador de peso molecular (100bp DNA Ladder, Promega.). A) PCR específica para *Pseudomonas*, B) PCR específica para *Salmonella*, C) PCR específica para *E. coli*, D) PCR específica para *Listeria spp.*

Una vez probada la especificidad de cada par de iniciadores para cada grupo bacteriano, los productos de PCR obtenidos para el gen 16S rDNA de las muestras de hortalizas fueron estandarizados a una concentración de 100 ng. Por consiguiente, la PCR para la detección de los diferentes grupos bacterianos se llevó a cabo en las muestras de zanahoria, lechuga y espinaca.

La detección de especímenes de *Salmonella* se realizó vía PCR utilizando los iniciadores específicos 16SF1 y 16SIII (Lin & Tsen, 1996), se muestra la Figura 10, en donde claramente se observa amplicones que indican la presencia de *Salmonella*. Sin embargo, la PCR en las muestras de zanahoria y lechuga es claro que no fue tan específica, ya que se observan otras bandas espurias además del amplicón esperado de 572 pb obteniendo un resultado positivo en los pozos 5, 8, 11 y 12 de la Figura 9A, y 13, 18 de la Figura 10B, mientras que la PCR de las muestras de espinaca (Figura 10C), los amplicones son más claros y menos bandas espurias.

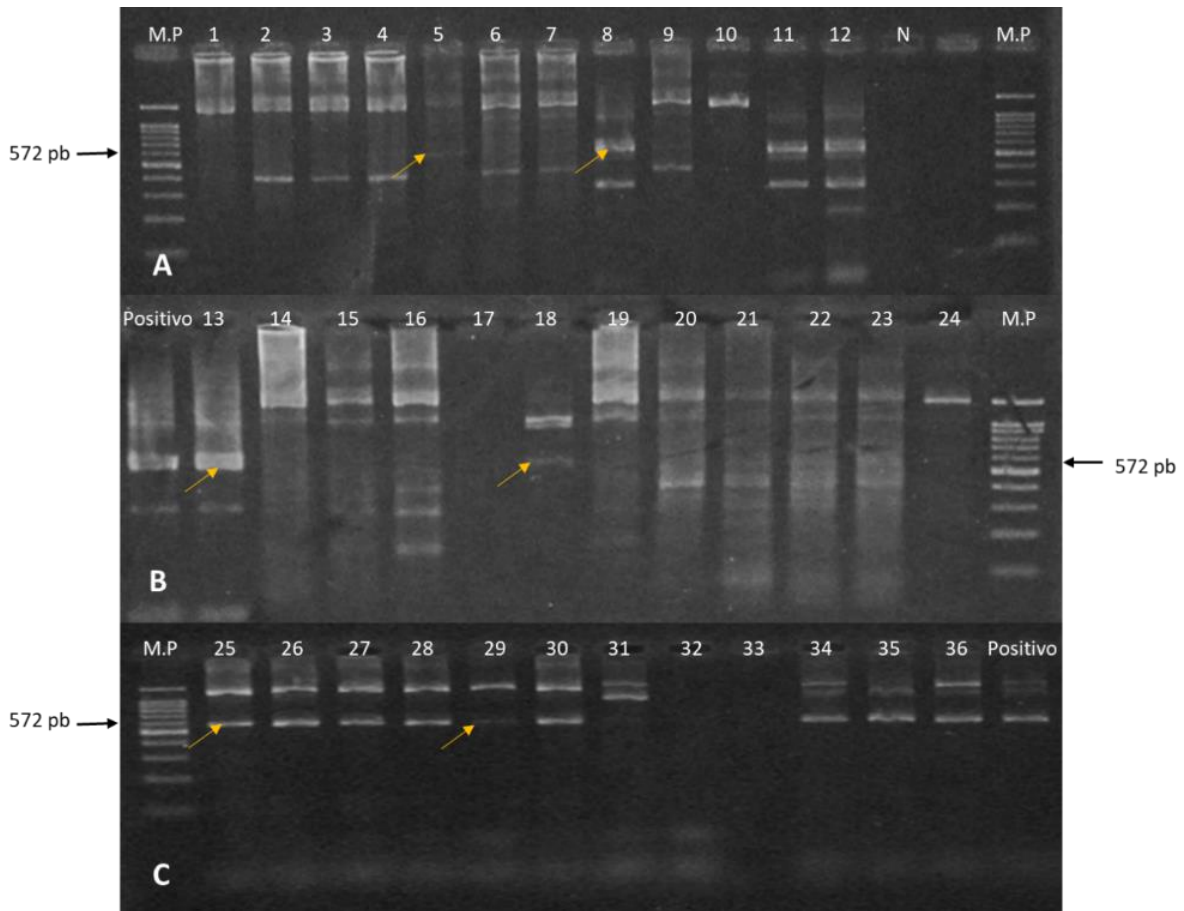


Figura 9. PCR específica para la detección de *Salmonella* utilizando los iniciadores 16SF1 y 16SIII, tamaño de amplicón 572 pb. A) Muestras de zanahoria, B) Muestras de lechuga, C) Muestras de espinaca.

8.5 Detección de *Escherichia coli*

La detección de cepas de *Escherichia coli*. se realizó vía PCR utilizando los iniciadores específicos Rfb-F y Rfb-R (Lee, et al., 2014) y 100 ng del amplicón del gen 16S rDNA obtenido de las muestras de hortalizas desinfectadas que no amplificaron para *Salmonella* spp.

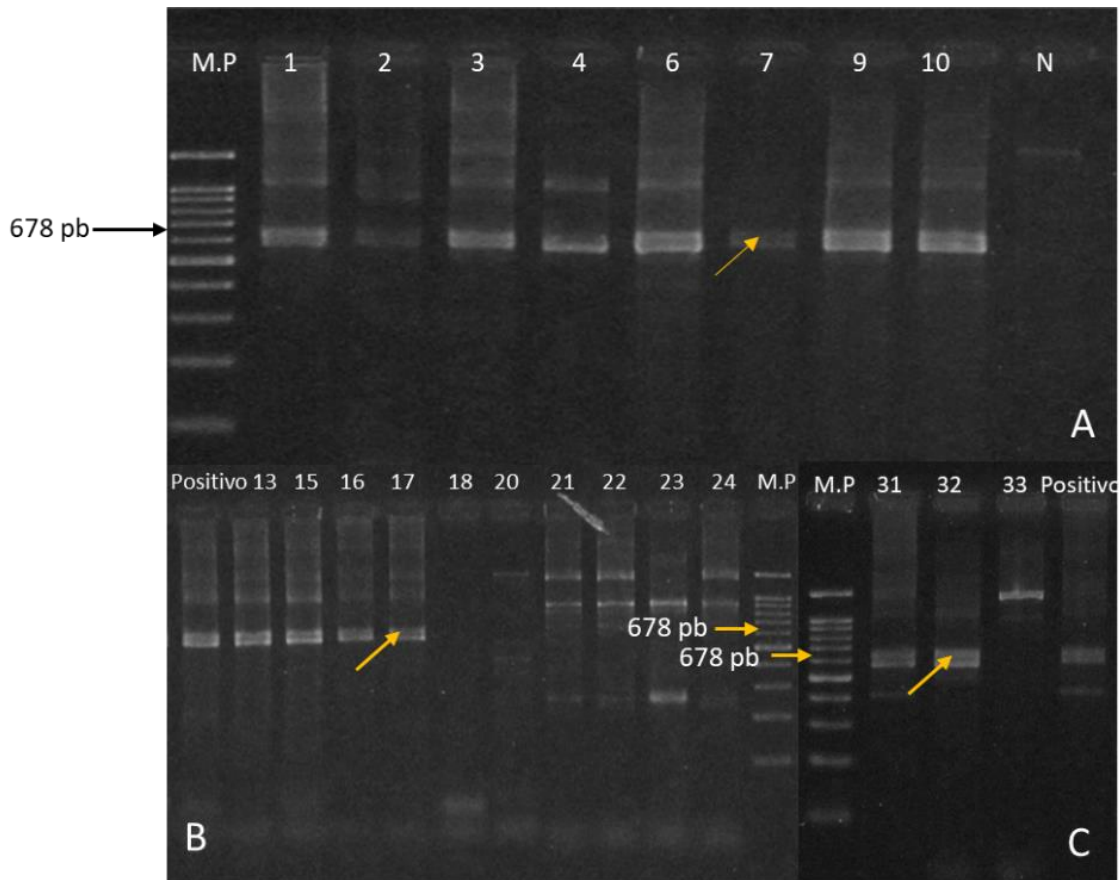


Figura 10. Amplificación del gen de *Escherichia coli*. utilizando el iniciador *Rfb-F* y *Rfb-R*. Muestras de zanahoria (fig. 11A) obteniendo el amplicón esperado a la longitud de 678 pb en las muestras 1, 2, 3, 4, 6, 7, 9 y 10, en muestras de lechuga (fig. 11B) 13, 15, 16 y 17, y en muestras de espinaca (fig. 11C) 31 y 32. En las muestras donde se obtuvo un amplicón diferente a lo esperado se probará el iniciador *PA-GS-F* y *PA-GS-R* para grupos de *pseudomonas*.

8.6 Detección de grupos de *Pseudomonas*

La detección de cepas de *Pseudomonas* se realizó vía PCR utilizando los iniciadores específicos *PA-GS-F* y *PA-GS-R* (Wagner, et al., 2008) y 100 ng del amplicón del gen 16S rDNA obtenido de las muestras de hortalizas desinfectadas que no amplificaron para *Salmonella* spp y *Escherichia coli*.

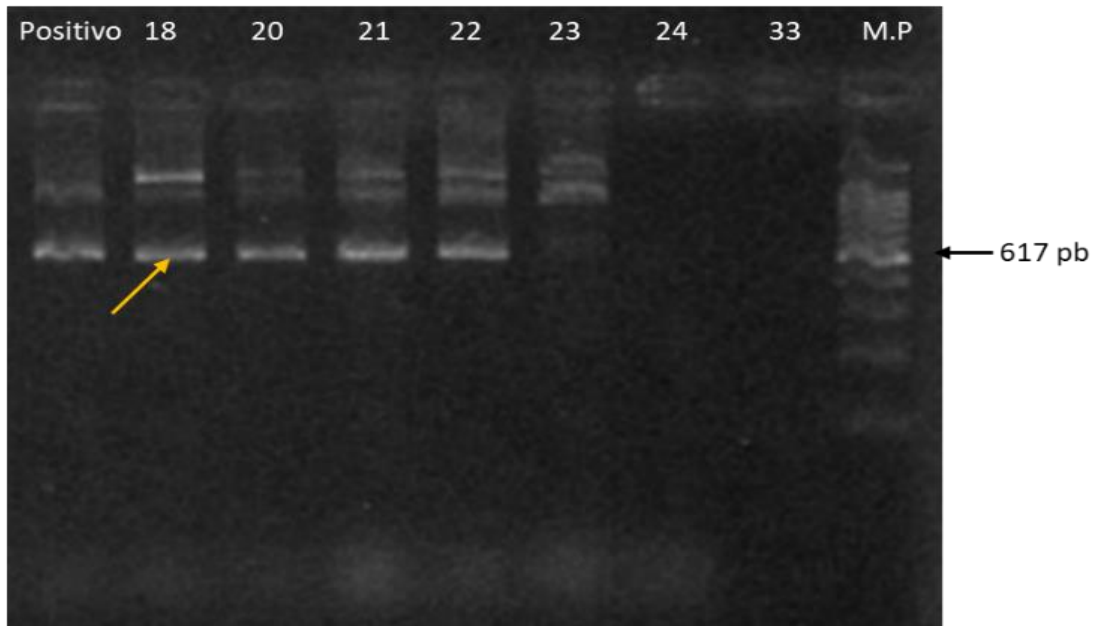


Figura 11. Las muestras de lechuga 18, 20, 21, 22 y 23 y espinaca 33 se probaron con el iniciador PA-GS-F y PA-GS-R, donde se obtuvo un amplicón positivo en las muestras 18, 20, 21, 22 y 23, en las muestras 24 y 33 no se obtuvo una amplificación a la longitud de 617 pb.

8.7 Detección de *Listeria* spp.

La detección de cepas de *Listeria* spp. se realizó vía PCR utilizando los iniciadores específicos LIS-F y LIS-R (Nabi et al., 2011) y 100 ng del amplicón del gen 16S rDNA obtenido de las muestras de hortalizas desinfectadas que no amplificaron para *Salmonella* spp, *Escherichia coli* y *Pseudomona*

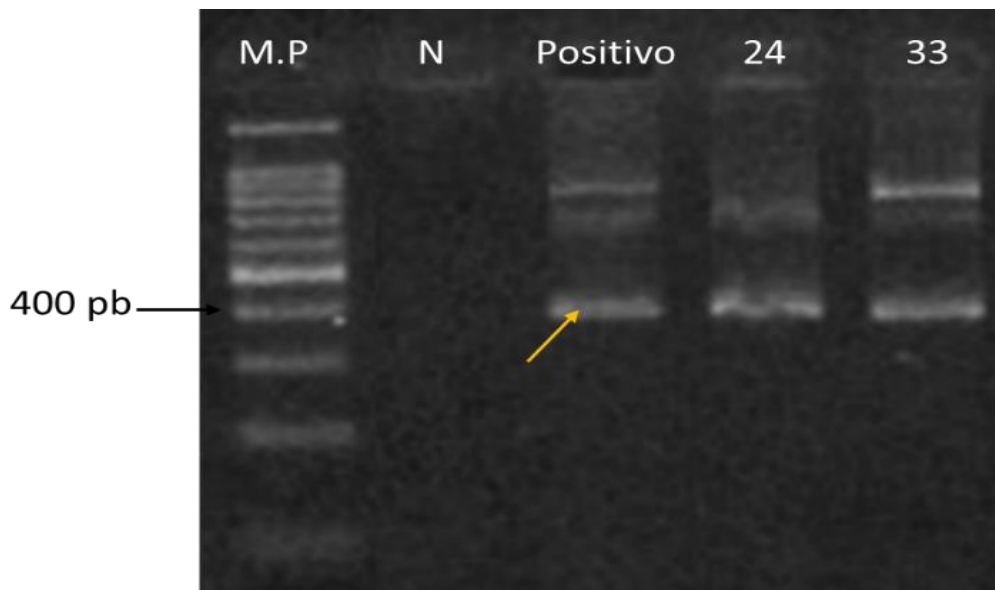


Figura 12. Las muestras 24 y 33 que no amplificaron con los iniciadores anteriores, se probaron con el iniciador para *Listeria*, obteniendo un amplicón positivo a una longitud de 400 pb.

8.8 Análisis cualitativo de la microbiota presenté en las hortalizas.

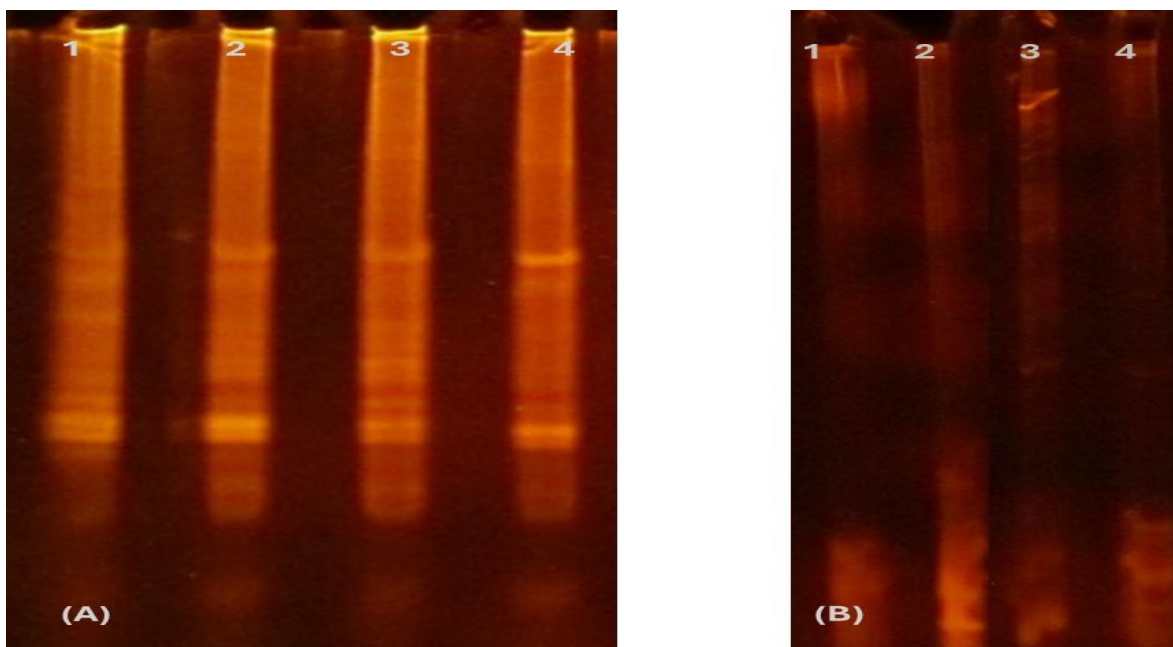


Figura. Análisis cualitativo de la carga microbiana en las hortalizas por DGGE. A) Carga microbiana de la espinaca: 1 muestra sin lavar, 2 muestra lavada con agua, 3 muestra desinfectada con gotas de plata, 4 muestra desinfectada con hipoclorito de sodio. B) Carga microbiana de la lechuga: 1 muestra sin lavar, 2 muestra lavada con agua, 3 muestra desinfectada con gotas de plata, 4 muestra desinfectada con hipoclorito de sodio.

9 Discusión de resultados

Las hortalizas provenientes de la central de abastos de Ecatepec traen consigo una gran carga bacteriana, las bacterias más abundantes son enterobacterias, con base a las pruebas microbianas se detectaron *Salmonella enteritidis o typhimurium* y *Escherichia coli*, y las menos abundantes, pero no menos importantes, son *Shigella flexneri*, *Proteus mirabilis* o *Citrobacter freundii*, *klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas*. Debido a esto es necesario lavar y desinfectar adecuadamente las hortalizas antes de ser consumidas en fresco, y así poder evitar enfermedades gastrointestinales por el consumo de éstas, aunque, lo más recomendable sería consumirlas cocinadas.

Por otro lado, los resultados estadísticos obtenidos de los procesos de desinfección a los que fueron sometidas las hortalizas indicaron no existir alguna diferencia significativa en la reducción bacteriana presente en las hortalizas, debido a que existe una fuerte carga bacteriana endófitas presente en las hortalizas, y no se ve afectada con algún proceso de desinfección, tal como lo mostró el crecimiento bacteriano después de una desinfección superficial. Además de esto, se comprobó que los desinfectantes más comerciales que son las gotas de plata y el cloro no remueven por completo la carga bacteriana superficial utilizando la cantidad de gotas y tiempo que indican en sus etiquetas. De acuerdo con la comparación de los resultados obtenidos, el cloro tiene una mejor eficiencia para remover la carga bacteriana, sin embargo 10 gotas por 5 minutos, no son suficientes para garantizar a remoción completa de las bacterias superficiales. Por consiguiente, se podría pensar que el incremento de LOG en las muestras maceradas se puede deber a la presencia de las bacterias endófitas, ya que al ser maceradas son liberadas al medio y pueden elevar el número de UFC/mL, lo que indica que estas bacterias son absorbidas por las raíces y transportadas a los diferentes órganos de las hortalizas, y al ser endófitas, el vegetal les brinda protección de los desinfectantes superficiales y no es posible eliminar la carga interna de las bacterias infecciosas totales.

La identificación molecular de los principales grupos bacterianos causantes de infecciones gastrointestinales corroboró la presencia de *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis o typhimurium*, las cuales son altamente patógenas y bajo las condiciones adecuadas pueden generar graves daños a la salud. También, se detectó la presencia de *Listeria* causante de

listeriosis, una infección grave generalmente causada por el consumo de alimentos contaminados, principalmente de origen animal, y tal vez esto puede explicar su baja presencia en las hortalizas analizadas. Otra estirpe detectada se refiere a *Pseudomonas*, las bacterias de este género se consideran microorganismos del suelo y son patógenos oportunistas.

El análisis cualitativo se realizó mediante la técnica de DGGE, la cual nos indica la diversidad y abundancia, para este caso la técnica permite evaluar la carga microbiana en las hortalizas. Así, en las muestra de espinaca se observo un numero de bandas similar para cada proceso de desinfección, exceptuando la muestra 4 cuyo proceso de desinfección fue hipoclorito de sodio, donde se obtuvo una disminución de bandas, lo que nos indica que se redujo la carga microbiana y en la muestra de lechuga se observa un comportamiento similar en el numero de bandas y su abundancia. Esto indica que no hay una diferencia significativa entre cada proceso de desinfección, ya que la carga microbiana al parecer se mantiene, y solo el tratamiento con hipoclorito de sodio tiene un efecto en la disminución de la carga microbiana.

10 Conclusiones

Finalmente, en este trabajo se reconoce la existencia de una basta microbiota endófito en zanahoria, lechuga y espinaca, siendo hortalizas de gran consumo entre la población. Dentro de esta microbiota se identificaron grupos bacterianos por métodos convencionales microbiológicos y validados por métodos moleculares como la PCR, los cuales son causantes de enfermedades gastrointestinales como la salmonelosis, shigelosis y listeriosis, entre otras enfermedades provocadas por bacterias oportunistas como *Pseudomonas* spp. Además, se comprobó que los desinfectantes comerciales empleados en este estudio, gotas de plata y el hipoclorito de sodio, no remueven por completo la carga bacteriana superficial bajo las condiciones del etiquetado, ya que después del proceso de desinfección se encontraron bacterias viables en las hortalizas. Debido a esto es necesario implementar procesos de desinfección más eficaces, aunado a implementar mayores controles en el agua empleada para riego de cultivos y la manipulación post cosecha, para así, minimizar la carga bacteriana presente en hortalizas, de igual manera se sugiere que la ingesta de este alimento sea después de cocinarlos.

11 Bibliografía

1. Ambreetha, S., Marimuthu, P., Mathee, K. y Balachandar, D. (2022). Pseudomonas aeruginosa rizosférica y endófito en plantas vegetales comestibles comparte características moleculares y metabólicas con aislamientos clínicos. *Revista de Microbiología Aplicada*, 132 (4), 3226-3248.
2. Angamuthu , N., & Subramanian , B. (2017). Prevalence of plant beneficial and human pathogenic bacteria isolated from salad vegetables in India. *BMC Microbiology*, 17-64.
3. Aswathy , J., Veena P. , K., E.K, R., Jubi , J., Gopika Vijayakumari , K., Dileep Kumar Bhaskaran Nair , S. A., Anil Kumar , S. (n.d.). 6.2 E: Endófitos y plantas-Biología.
4. Berg, G., Erlacher, A., Smalla, K., & Krause, R. (2014). Vegetable microbiomes: is there a connection among opportunistic infections, human health and our ‘gut feeling’? *Microbial Biotechnology*, 487–495.
5. Ciencia aplicada a la vida. (23 de 08 de 2019). Obtenido de https://www.3m.com.mx/3M/es_MX/food-safety-la/biblioteca-de-documentos/microorganismos/coliformes/
6. Díaz, A. S. (2015). PCR: reacción en cadena de la polimerasa. Herramientas moleculares aplicadas en ecología, 53-73.
7. Doyle, J., & JL , D. (1990). Aislamiento de DNA vegetal a partir de tejido fresco.
8. Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M. and Bottger, E.C. (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 17, 7843–7853
9. Escorcía, G. B. (2013). La sensibilidad del grupo coliforme como indicador de la presencia de enterobacterias. *Hidrobiológica*, 87- 96.

10. Espinoza, M. I. (2013). Aislamiento de bacterias resistentes y transformadoras. *Avances en ciencia del agua*, 137-152.
11. Fernández Suárez, M., & Le Borgne, S. (2015). DGGE: electroforesis en gel con gradiente desnaturante. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología*, 149-174.
12. Fierro, F. F. (2015). Electroforesis de DNA. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología*, 27-57
13. Garmendia, G., & Vero, S. (2006). Métodos para la desinfección de frutas y hortalizas. *Horticultura*, 197, 18-27.
14. Gimeno, S. M. (2019). Catálogo de servicios. Unidad de Servicios para la Industria de Alimentos (USIA).
15. Herigstad, B., Hamilton, M. y Heersink, J. (2001). Cómo optimizar el método de la placa de caída para enumerar bacterias. *Diario de métodos microbiológicos*, 44 (2), 121-129.
16. Kõiv, V., Arbo, K., Maiväli, Ü., Kisand, V., Roosaare, M., Remm, M. y Tenson, T. (2019). Comunidades bacterianas endófitas en cáscaras y pulpa de cinco tubérculos. *PLoS One*, 14 (1), e0210542.
17. Lee, N., Kwon, K. Y., Oh, S. K., Chang, H. J., Chun, H. S., & Choi, S. W. (2014). A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157: H7, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* in Korean ready-to-eat food. *Foodborne pathogens and disease*, 11(7), 574-580.
18. Lin, CK y Tsen, HY (1996). Uso de dos oligonucleótidos dirigidos a DNA 16S como cebadores de PCR para la detección específica de *Salmonella* en alimentos. *Revista de bacteriología aplicada*, 80 (6), 659-666.
19. Liu, H., Carvalhais, LC, Crawford, M., Singh, E., Dennis, PG, Pieterse, CM y Schenk, PM (2017). Valores internos de las plantas: diversidad, colonización y beneficios de las bacterias endófitas. *Fronteras en microbiología*, 8, 2552.
20. López Tévez, L., & Torres, C. (2006). MEDIOS DE CULTIVO Universidad Nacional del Nordeste. *FACULTAD DE AGROINDUSTRIAS [Internet]. Microbiología General-Carrera Farmacia*.

21. Muyzer, G., De Waal, EC y Uitterlinden, A. (1993). Creación de perfiles de poblaciones microbianas complejas mediante el análisis de electroforesis en gel de gradiente desnaturizante de genes amplificados por reacción en cadena de la polimerasa que codifican 16S rRNA. *Microbiología aplicada y ambiental*, 59 (3), 695-700.
22. Neria-González, I., Wang, ET, Ramírez, F., Romero, JM, & Hernández-Rodríguez, C. (2006). Caracterización de la comunidad bacteriana asociada a biopelículas de oleoductos corroídos del sureste de México. *Anaerobio*, 12 (3), 122-133.
23. Nithya, A. y Babu, S. (2017). Prevalencia de bacterias beneficiosas para plantas y patógenas para humanos aisladas de vegetales para ensalada en India. *Microbiología BMC*, 17 (1), 1-16.
24. Norma oficial mexicana nom-001-semarnat-1996. (s.f.). Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales y bienes nacionales.
25. PeñaI, Y. P. (2013). Calidad microbiológica de las hortalizas y factores asociados a la contaminación en áreas de cultivo en La Habana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 111-119.
26. PEREZ, A., CHAMORRO, L., & Leonardo, B. (2013). Endophytic bacteria: a new field of research for development of agricultural sector. *Revista Colombiana deficiencia Animal*, 5(2), 439-462.
27. Pérez, CA, Rojas, SJ y Vale, MH (2009). Biología y perspectiva de los microorganismos endófitos asociados a las plantas. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 1 (2), 286-301.
28. Q Nabi, A., Vernile, A., Spano, G., Lasalandra, G., Beneduce, L., Colelli, G., & Massa, S. (2011). Control de calidad basado en PCR de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en ensaladas listas para comer vendidas en Italia. *Nutrición actual y ciencia de los alimentos*, 7 (1), 57-62.
29. Reyes, Y. C., Vergara, I., Torres, O. E., Díaz, M., & González, E. (2016). Heavy metals contamination: implications for health and food safety. *Revista Ingeniería, Investigación y Desarrollo*, 16(2), 66-77.

30. Rojas-Solis, D., & Pizano, G. S. (2019). Bacterias endófitas de plantas y su posible repercusión en la salud humana. *Milenaria, Ciencia y arte*, (13), 25-27.
31. Semarnat. (2015). Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Mexico.
32. Shahzad, R., Khan, AL, Bilal, S., Asaf, S. y Lee, IJ (2017). Bacterias endófitas promotoras del crecimiento vegetal versus infecciones patógenas: un ejemplo de *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en tomate. *Peer J*, 5, e3107.
33. Tévez, L. (2006). Medios de Cultivo. FACULTAD DE AGROINDUSTRIAS.
34. Velázquez, L. P. (2015). Extracción y purificación de DNA. Herramientas moleculares aplicadas en ecología, 1-25
35. Wagner, J., Short, K., Catto-Smith, AG, Cameron, DJ, Bishop, RF y Kirkwood, CD (2008). Identificación y caracterización de DNA ribosomal *Pseudomonas* 16S de biopsias ileales de niños con enfermedad de Crohn. *PloS uno*, 3 (10), e3578.
36. White, J. F., Kingsley, K. L., Zhang, Q., Verma, R., Obi, N., Dvinskikh, S., ... & Kowalski, K. P. (2019). Endophytic microbes and their potential applications in crop management. *Pest management science*, 75(10), 2558-2565.
37. Celia Viviana, A. C. (2020). Estudio de bacterias causantes de infecciones intestinales en productos orgánicos en los mercados de Riobamba (Bachelor's thesis, Universidad Nacional de Chimborazo 2020).

12 Anexos

12.1 Morfología de bacterias aisladas

12.1.1 Muestra de Lechuga

Tabla 12 Muestra de bacterias provenientes de Lechuga cultivadas en agar nutritivo

	MUESTRA	DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA		MUESTRA	DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA
1	Lavado L-150	Bacilos (-) pequeña blanca	12	Macerado L-15	Cocos (+) pequeña blanca
2	Lavado L-150	Bacilos (-) puntiforme blanca	13	Macerado L-15	Bacilos (-) puntiforme translucida
3	Lavado L-150	Bacilos (-) pequeña blanca	14	Macerado L-15	Cocos (+) pequeña translucida
4	Lavado L-150	Cocos (-) mediana translucida	15	Lavado L-34	Bacilos (-) pequeña opaca
5	Macerado L-150	Cocos (-) puntiforme blanca	16	Lavado L-34	Bacilos (-) grande blanca
6	Macerado L-150	Cocos (+) grande blanca	17	Lavado L-34	Bacilos (-) pequeña roja
7	Macerado L-150	Cocos (-) puntiforme translucida	18	Macerado L-34	Bacilos (-) grande blanca
8	Lavado L-15	Bacilos (-) pequeña translucida	19	Macerado L-34	Bacilos (-) grande translucida
9	Lavado L-15	Bacilos (-) pequeña blanca	20	Macerado L-34	Cocos (-) pequeña translucida
10	Lavado L-15	Bacilos (-) mediana translucida	21	Macerado L-34	Cocos (-) puntiforme blanca
11	Lavado L-15	Bacilos (+) mediana blanca			

Tabla 13 Muestra de bacterias provenientes de lechuga en agar cetrimida

	MUESTRA	DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA		MUESTRA	DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA
1	Lavado L-150	Bacilo (-) mediana blanca	10	Lavado L-15	Bacilo (-) pequeña opaca
2	Lavado L-150	Bacilo (-) pequeña opaca	11	Lavado L-15	Bacilo (-) pequeña blanca
3	Lavado L-150	Bacilo (-) puntiforme translucida	12	Macerado L-15	Bacilo (-) pequeña translucida
4	Macerado L-150	Bacilo (-) mediana blanca	13	Macerado L-15	Bacilo (-) mediana blanca
5	Macerado L-150	Bacilo (-) puntiforme opaca	14	Macerado L-15	Bacilo (-) puntiforme translucida
6	Lavado L-34	Bacilo (-) mediana blanca	15	Macerado L-15	Bacilo (-) pequeña translucida
7	Lavado L-34	Bacilo (-) pequeña translucida	16	Macerado L-34	Bacilo (-) pequeña blanca
8	Lavado L-34	Bacilo (-) puntiforme translucida	17	Macerado L-34	Bacilo (-) puntiforme translucida
9	Lavado L-15	Bacilo (-) grande blanca	18	Macerado L-34	Bacilo (-) mediana opaca

Tabla 14 Muestra de bacterias provenientes de Lechuga en agar McConkey

	MUESTRA	DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA		MUESTRA	DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA
1	Lavado L-150	Bacilos (-) grande gris	9	Lavado L-34	Bacilos (-) pequeña morada
2	Lavado L-150	Bacilos (-) puntiforme rosa	10	Lavado L-34	Bacilos (-) puntiforme morada
3	Lavado L-150	Bacilos (-) mediana rosa	11	Lavado L-15	Bacilos (-) pequeña rosa
4	Lavado L-150	Bacilos (-) pequeño gris	12	Lavado L-15	Bacilos (-) pequeña morada
5	Macerado L-150	Bacilos (-) grande rosa	13	Macerado L-15	Bacilos (-) puntiforme morada
6	Macerado L-150	Bacilos (-) pequeña morada	14	Macerado L-15	Bacilos (-) pequeño gris
7	Macerado L-150	Bacilos (-) puntiforme morada	15	Macerado L-15	Bacilos (-) mediana gris
8	Lavado L-34	Bacilos (-) mediana rosa			

12.1.2 Muestra de Espinaca

Tabla 15 Muestra de bacterias provenientes de Espinaca en agar Cetrimida

	MUESTRA	DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA		MUESTRA	DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA
1	Macerado de tallo L-150	Bacilo (+) pequeña blanca	21	Lavado de tallo L-34	Bacilos (+) pequeña amarilla
2	Macerado de tallo L-150	Bacilo (+) blanca mediana	22	Lavado de hoja L-34	Bacilos (+) blanco pequeño
3	Macerado de tallo L-150	Bacilo (-) puntiforme translucida	23	Lavado de hoja L-34	Bacilo (-) rosa pequeña
4	Macerado de hoja L-150	Bacilo (-) puntiforme translucida	24	Lavado de hoja L-34	Bacilo (-) blanca puntiforme
5	Macerado de hoja L-150	Bacilo (+) puntiforme blanca	25	Lavado de hoja L-34	Bacilos (-) blanco mediano
6	Macerado de hoja L-150	Bacilo (-) translucida pequeña	26	Lavado de hoja L-34	Bacilos (+) puntiforme blanca
7	Macerado de hoja L-150	Bacilo (-) translucida mediana	27	Macerado de tallo L-15	Bacilos (+) mediana blanca
8	Lavado de tallo L-150	Bacilo (-) blanca pequeña	28	Macerado de tallo L-15	Bacilos (+) pequeña blanca
9	Lavado de tallo L-150	Bacilo (-) translucida puntiforme	29	Macerado de hoja L-15	Bacilos (+) pequeña blanca
10	Lavado de tallo L-150	Bacilo (-) blanca mediana	30	Macerado de hoja L-15	Bacilos (+) pequeña blanca
11	Lavado de hoja L-150	Bacilo (-) translucido amarillo	31	Macerado de hoja L-15	Bacilos (+) pequeña blanca
12	Lavado de hoja L-150	Bacilo (-) grande blanca	32	Lavado de tallo L-15	Cocos (-) puntiforme amarilla
13	Macerado de tallo L-34	Bacilos (-) translucidas pequeñas	33	Lavado de tallo L-15	Bacilos (-) pequeñas blancas
14	Macerado de tallo L-34	Bacilo (+) translucida amarilla	34	Lavado de tallo L-15	Bacilos (-) puntiforme blanca

15	Macerado de hoja L-34	Bacilos (-) amarilla pequeña	35	Lavado de hoja L-15	Bacilos (-) puntiforme amarilla
16	Macerado de hoja L-34	Cocos (+) pequeñas blancas	36	Lavado de hoja L-15	Cocos (-) grande blanca
17	Macerado de hoja L-34	Bacilos (-) puntiforme translucidos	37	Lavado de hoja L-15	Bacilos (-) translucido pequeño
18	Macerado de hoja L-34	Bacilos (-) translucidas blanco	38	Lavado de hoja L-15	Bacilos (-) translucido puntiforme
19	Lavado de tallo L-34	Bacilos (+) translucidos puntiforme	39	Lavado de hoja L-15	Bacilo (+) translucida puntiforme
20	Lavado de tallo L-34	Bacilos (-) translucidos pequeña			

Tabla 16 Muestra de bacterias provenientes de Espinaca en agar Nutritivo

	MUESTRA	DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA		MUESTRA	DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA
1	Lavado de hoja L-34	Bacilos (-) rojo puntiforme	25	Macerado de hoja L-34	Bacilos (-) pequeña blanca
2	Lavado de hoja L-34	Cocos (-) blancas pequeñas	26	Macerado de tallo L-15	Bacilos (-) puntiforme blanca
3	Lavado de hoja L-34	Cocos (+) puntiforme blanca	27	Macerado de tallo L-15	Bacilos (-) blanca circular
4	Lavado de hoja L-34	Cocos (+) puntiforme blanca	28	Macerado de tallo L-15	Cocos (-) pequeño centro blanco
5	Lavado de hoja L-150	Cocos (+) grande amarilla	29	Macerado de tallo L-15	Cocos (-) blancas pequeñas
6	Lavado de hoja L-150	Cocos (+) blanca pequeña	30	Macerado de hoja L-15	Bacilos (-) pequeña circular amarilla
7	Lavado de hoja L-150	Bacilos (+) amarilla puntiforme	31	Macerado de hoja L-15	Bacilos (-) pequeña circular dorada
8	Lavado de hoja L-150	Bacilos (+) amarilla pequeña	32	Macerado de hoja L-15	Bacilos (-) pequeña circular blanca
9	Macerado de tallo L-150	Bacilos (+) grande opaca	33	Macerado de hoja L-15	Bacilos (-) blanca circular pequeña
10	Macerado de tallo L-150	Bacilos (-) pequeña amorfa	34	Macerado de hoja L-15	Bacilos (-) pequeña circular translucida
11	Macerado de tallo L-150	Bacilos (-) circulares pequeñas	35	Macerado de hoja L-15	Bacilos (-) puntiforme translucida
12	Macerado de hoja L-150	Bacilos (+) péquelos amorfos	36	Macerado de hoja L-15	Bacilos (-) pequeña amarilla
13	Macerado de hoja L-150	Bacilos (-) puntiforme blanca	37	Lavado de hoja L-15	Cocos (-) pequeña blanca
14	Macerado de hoja L-150	Bacilos (-) puntiforme blanca	38	Lavado de hoja L-15	Cocos (-) pequeña translucida
15	Macerado de hoja L-150	Bacilos (-) puntiforme opaca	39	Lavado de hoja L-15	Cocos (-) puntiforme blanca
16	Macerado de hoja L-150	Bacilos (-) pequeña blanca	40	Lavado de hoja L-15	Cocos (-) pequeña blanca
17	Macerado de hoja L-150	Bacilos (-) pequeña amarilla	41	Lavado de tallo L-34	Bacilos (-) grande blanca

18	Macerado de tallo L-34	Bacilos (-) opaca	42	Lavado de tallo L-34	Bacilos (-) pequeña translúcida
19	Macerado de tallo L-34	Bacilos (-) blanca	43	Lavado de tallo L-34	Bacilos (-) pequeña opaca
20	Macerado de hoja L-34	Bacilos (-) pequeño borde rugoso	44	Lavado de tallo L-150	Cocos (-) puntiforme translúcida
21	Macerado de hoja L-34	Bacilos (-) pequeña opaca	45	Lavado de tallo L-150	Bacilos (-) pequeña blanca
22	Macerado de hoja L-34	Bacilos (-) pequeña circular blanca	46	Lavado de tallo L-15	Bacilos (-) puntiforme blanca
23	Macerado de hoja L-34	Bacilos (-) pequeñas amarillas opacas	47	Lavado de tallo L-15	Bacilos (-) pequeña translúcida
24	Macerado de hoja L-34	Bacilos (-) irregulares translúcidas	48	Lavado de tallo L-15	Bacilos (-) puntiforme translúcida

Tabla 17 Muestra de bacterias provenientes de Espinaca en agar McConkey

	MUESTRA	DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA		MUESTRA	DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA
1	Macerado tallo L-150	de Bacilos (-) grande centro morado	21	Macerado de hoja L-34	Bacilos (+) pequeña rosa
2	Macerado tallo L-150	de Bacilos (-) pequeño centro morado	22	Lavado de tallo L-34	Bacilos (-) pequeñas moradas
3	Macerado tallo L-150	de Bacilos (-) puntiforme morado	23	Lavado de tallo L-34	Bacilos (-) medianas moradas
4	Macerado tallo L-150	de Bacilos (+) puntiforme morado	24	Lavado de hoja L-34	Bacilos (-) pequeñas rosas
5	Macerado hoja L-150	de Bacilos (-) pequeña lila	25	Lavado de hoja L-34	Bacilos (-) puntiforme rosa
6	Macerado hoja L-150	de Bacilos (-) puntiforme morado	26	Lavado de hoja L-34	Bacilos (-) medianas rosas
7	Macerado hoja L-150	de Bacilos (-) mediana gris	27	Macerado de tallo L-15	Bacilos (-) mediana centro rosa
8	Lavado de tallo L-150	Bacilos (-) pequeño morado	28	Macerado de tallo L-15	Bacilos (-) puntiforme morado
9	Lavado de tallo L-150	Bacilos (-) pequeño gris	29	Macerado de tallo L-15	Bacilos (-) pequeño gris
10	Lavado de tallo L-150	Bacilos (-) pequeño centro morado	30	Macerado de tallo L-15	Bacilos (-) mediana centro rosa
11	Lavado de hoja L-150	Cocos (-) puntiforme gris	31	Macerado de hoja L-15	Bacilos (-) pequeño centro roso
12	Lavado de hoja L-150	Bacilos (-) puntiforme rosa	32	Macerado de hoja L-15	Bacilos (-) pequeño centro gris
13	Lavado de hoja L-150	Bacilos (-) pequeña morada	33	Lavado de tallo L-15	Cocos (-) puntiforme gris
14	Lavado de hoja L-150	Bacilos (-) pequeño gris	34	Lavado de tallo L-15	Bacilos (-) puntiforme rosa
15	Macerado tallo L-34	de Bacilos (-) pequeño centro roso	35	Lavado de tallo L-15	Cocos (-) pequeño gris
16	Macerado tallo L-34	de Bacilos (-) pequeño centro gris	36	Lavado de tallo L-15	Cocos (-) puntiforme gris
17	Macerado tallo L-34	de Bacilos (-) pequeño centro gris	37	Lavado de hoja L-15	Bacilos (-) pequeño centro roso

18	Macerado hoja L-34	de	Bacilos (-) mediana gris	centro	38	Lavado de hoja L-15	Bacilos (-) mediana gris
19	Macerado hoja L-34	de	Bacilos (-) mediana rosa	centro	39	Lavado de hoja L-15	Bacilos (-) pequeño gris
20	Macerado hoja L-34	de	Bacilos (-) pequeño café	centro	40	Lavado de hoja L-15	Cocos (-) pequeño gris

12.1.3 Muestra de Zanahoria

Tabla 18 Muestra de bacterias provenientes de zanahoria en agar McConkey

	MUESTRA		DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA			MUESTRA	DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA
1	Lavado L-225		Bacilos (-) pequeñas rosa y halo blanco	centro	13	Macerado L-217	Bacilos (-) pequeñas rosa y halo translucido
2	Lavado L-225		Bacilos (-) pequeñas rosa y halo blanco	centro	14	Macerado L-217	Bacilos (-) mediana rosa y halo translucido
3	Lavado L-225		Bacilos (-) grandes rosa y halo blanco	centro	15	Macerado L-217	Bacilos (-) pequeñas rosas
4	Lavado L-225		Cocos (+) pequeñas rosa y halo blanco	centro	16	Macerado L-217	Bacilos (-) pequeñas rosa y halo translucido
5	Macerado L-225		Bacilos (-) medianas rosa y halo blanco	centro	17	Lavado L-228	Bacilos (-) medianas rosa y halo translucido
6	Macerado L-225		Bacilos (-) pequeñas rosa y halo translucido	centro	18	Lavado L-228	Bacilos (-) pequeñas rosa y halo translucido
7	Macerado L-225		Bacilos (-) pequeñas rosa y halo translucido	centro	19	Lavado L-228	Bacilos (-) pequeñas rosa y halo translucido
8	Macerado L-225		Bacilos (-) pequeñas rosa y halo translucido	centro	20	Macerado L-228	Bacilos (-) grandes rosa y halo blanco
9	Lavado L-217		Bacilos (-) pequeñas rosa y halo translucido	centro	21	Macerado L-228	Bacilos (-) pequeñas rosa y halo translucido
10	Lavado L-217		Bacilos (-) pequeñas rosa y halo translucido	centro	22	Macerado L-228	Bacilos (-) pequeñas rosa y halo translucido
11	Lavado L-217		Bacilos (-) pequeñas rosas		23	Macerado L-228	Bacilos (-) medianas rosa y halo blanco
12	Lavado L-217		Bacilos (-) pequeña rosa				

Tabla 19 Muestra de bacterias provenientes de zanahoria en agar cetrimida.

	MUESTRA		DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA			MUESTRA	DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA
1	Lavado L-225		Bacilos (-) pequeña blanca		13	Macerado L-228	Bacilos (-) pequeña amorfa blanca
2	Lavado L-225		Bacilos (-) pequeña naranja		14	Macerado L-217	Bacilos (-) puntiforme blanca
3	Lavado L-225		Bacilos (-) puntiforme naranja		15	Macerado L-217	Bacilos (-) puntiforme blanca con halo
4	Lavado L-225		Bacilos (-) puntiforme blanca		16	Macerado L-217	Bacilos (-) translucida pequeña
5	Lavado L-217		Bacilos (-) pequeña amorfa blanca		17	Macerado L-217	Bacilos (-) grande blanca

6	Lavado L-217	Bacilos blanca	(-)	grande	18	Macerado L-225	Bacilos blanca	(-)	pequeña translucida
7	Lavado L-217	Bacilos blanca	(+)	pequeña	19	Macerado L-225	Bacilos	(-)	mediana blanca
8	Lavado L-217	Bacilos blanca	(+)	grande	20	Macerado L-225	Bacilos	(-)	pequeña blanca
9	Lavado L-217	Bacilos blanca	(-)	puntiforme	21	Macerado L-225	Bacilos	(-)	grande blanca
10	Macerado L-228	Bacilos blanca	(-)	pequeña	22	Lavado L-228	Bacilos	(-)	pequeña translucida
11	Macerado L-228	Bacilos blanca con halo	(-)	pequeña	23	Lavado L-228	Bacilos	(-)	puntiforme blanca
12	Macerado L-228	Bacilos blanca	(-)	puntiforme	24	Lavado L-228	Bacilos	(-)	pequeña blanca

Tabla 20 Muestra de bacterias provenientes de zanahoria en agar Nutritivo.

	MUESTRA	DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA		MUESTR A	DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA
1	Macerado L-225	Bacilos (-) pequeña blanca	21	Macerado L-217	Bacilos (-) puntiforme translucida
2	Macerado L-225	Bacilos (-) puntiforme translucida	22	Lavado L-217	Bacilos (-) puntiforme opaca
3	Macerado L-225	Bacilos (-) pequeña opaca	23	Lavado L-217	Bacilos (-) pequeña translucida
4	Macerado L-225	Bacilos (-) mediana blanca	24	Lavado L-217	Bacilos (-) pequeña blanca
5	Macerado L-225	Bacilos (-) pequeña translucida	25	Lavado L-217	Bacilos (+) pequeña amorfa blanca
6	Macerado L-225	Bacilos (-) grande blanca	26	Lavado L-217	Bacilos (+) mediana blanca
7	Lavado L-225	Bacilos (-) puntiforme blanca	27	Lavado L-217	Bacilos (+) pequeña blanca
8	Lavado L-225	Bacilos (-) pequeña blanca opaca	28	Macerado L-228	Bacilos (-) puntiforme opaca
9	Lavado L-225	Bacilos (-) pequeña blanca	29	Macerado L-228	Bacilos (-) pequeña translucida
10	Lavado L-225	Bacilos (-) grande blanca	30	Macerado L-228	Bacilos (+) pequeña blanca
11	Lavado L-225	Bacilos (-) pequeña roja	31	Macerado L-228	Bacilos (+) mediana blanca
12	Macerado L-217	Bacilos (-) pequeña blanca	32	Macerado L-228	Bacilos (+) pequeña translucida
13	Macerado L-217	Bacilos (-) pequeña translucida	33	Macerado L-228	Bacilos (-) pequeña opaca
14	Macerado L-217	Bacilos (-) puntiforme translucida	34	Lavado L-228	Bacilos (-) grande translucida amarilla
15	Macerado L-217	Bacilos (-) grande opaca	35	Lavado L-228	Bacilos (-) pequeña blanca
16	Macerado L-217	Bacilos (-) grande translucida	36	Lavado L-228	Bacilos (-) mediana blanca
17	Macerado L-217	Bacilos (-) pequeña blanca	37	Lavado L-228	Bacilos (-) mediana blanca

18	Macerado 217	L-	Bacilos (-) grande blanca
19	Macerado 217	L-	Bacilos (-) pequeña blanca
20	Macerado 217	L-	Bacilos (-) pequeña translucida

12.2 Preparación de reactivos

- Safranina → 0.5g de safranina en 100 mL de agua
- Lugol → 2 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua, 1 g de yoduro metálico y agregar 80 mL de agua
- Alcohol cetona → 200 mL de etanol 95% con 100 mL de cetona
- Cristal violeta → 2 g de cristal violeta en 20 mL de etanol al 95%, disolver 0.8g de oxalacetato de amonio y disolver en 80 mL de agua, mezclar ambas soluciones.
- Solución de PBS
 1. Se disuelve en 800 mL de agua destilada
 2. Se mezcla en agitación constante en placa de agitación
 3. Se ajusta el pH a 8.0 con HCl
 4. Aforar a un volumen final de 1000 mL
 5. Esterilizar en autoclave por 20 min a 15 psi y 120°C o por filtración con una membrana de 0.22 µm
 6. Almacenar a 4°C hasta su uso

PARA 300 mL	PESO
CLORURO DE SODIO	24 g
CLORURO DE POTACIO	0.6 g
FOSFATO DE SODIO MONOBÁSICO	4.32 g
FOSFATO DE POTASIO DIBASICO	0.72 g

- Solución SDS 20%
 1. Disolver 200 g de SDS en 900 mL de agua destilada
 2. Calentar y agitar constante para una mejor disolución
 3. Ajustar el pH a 7.2 con HCl
 4. Ajustar el volumen final 1000 mL

Para 50 mL de solución SDS 1%

200 SDS → 20%

1 g SDS ← 1 %

1g de SDS para 100 mL de agua

- Buffer TAE 50X
 - Tris base: 242.28 g
 - Ácido acético glacial: 57.1 mL
 - EDTA 0.5 pH 8: 100 mL
 - Para 500 mL
 - Pesar 93.05 g de EDTA (PM= 372.24 g/mol) disolver 400 mL de H₂O destilada, ajustar el pH con hidróxido de sodio y aforar a 500 mL
- Solución tris 0.5 M 1000 mL
 1. Disolver 60.55 g de tris base en 800 mL de agua Milli-Q
 2. Ajustar pH a 8 con HCl
 3. Llevar a 1000 mL con agua Mill-Q
 4. Esterilizar en autoclave por 30 min
- Solución PCI (fenol cloroformo alcohol isoamílico) (25:24:1) (250mL)
 1. Preparar la mezcla en campana de gases y con guantes
 2. Añadir 5 mL de alcohol isoamílico
 3. Añadir 120 mL de cloroformo
 4. Añadir 125 mL de fenol
 5. Mezclar bien y almacenar a 4 °C
- Solución CI (cloroformo alcohol isoamílico) (24:1) (250 mL)
 1. Añadir 10 mL de alcohol isoamílico
 2. Añadir 240 mL de cloroformo
 3. Mezclar bien y almacenar a 4°C
- TAE 10X
 1. 48.4 g de tri base
 2. 11.4 mL de ácido acético glacial
 3. 20 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0
- Bromuro de etidio
 1. 10 µL en 100 mL de agua
- Persulfato de amonio 10%

1. 1g de PSA y aforar a 10 mL con agua destilada

12.3 Protocolo de extracción de DNA para plantas

METODO CTAB 2% Y ACETATO DE SODIO CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio)

1. Precalear el CTAB 2% (Tris-HCL 10 μ M pH 8.0, Na₂EDTA 2H₂O 20 μ M pH 8.0, CTAB 2% NaCl 1.4 M) a 60 °C en baño maría.
2. Etiquetar un tubo Eppendorf de 1.5 mL
3. Pesar 0,5 g de tejido de la planta se recomienda la utilización de plantas jóvenes.
4. Pulverizar las muestras en un mortero esterilizado por fuego y enfriado.
5. La muestra debe de mantenerse fría añadiendo nitrógeno líquido al mortero las veces que sea necesario (opcional)
6. El polvo fino "transferirlo con una espátula estéril al tubo Eppendorf con CTAB 2% al que se ha colocado previamente 1 mL de CTAB, una vez homogeneizada la muestra adicionar 500ul de CTAB.
7. Incubar los tubos a 95°C por 60 min Mezclar a intervalos de 10 min se puede utilizar vortex.
8. Centrifugar 11 000 g por 10 min. Pasar el sobrenadante a tubos Eppendorf de 1.5 mL nuevo previamente etiquetado
9. Adicionar 500 ul de cloroformo-isoamílico (24:1). Mezclar los tubos por inversión a temperatura ambiental por 10 min
10. Centrifugar a 11 000 por 10 min. Pasar la fase acuosa y colocarla en tubos nuevos de 1.5 mL. Agregar 700 μ L de cloroformo-isoamílico (24:1). Mezclar suavemente los tubos por inversión durante 10 min.
11. Centrifugar a 11 000 g por 10 min En un tubo Eppendorf de 1.5 mL nuevo, previamente etiquetado, adicionar 950 μ L de etanol 100% frio (mantenerlo a -20 °C antes de utilizarlo)
12. Mezclar suavemente por inversión al menos 10 veces. Incubar por al menos 2 h (sin opción) a -20°C o 24 horas en congelación
13. Centrifugar a 11 000 g por 30min, decantar evitando perder la pastilla.

14. Lavar con 500 μL de etanol al 70% y centrifugar por 10 min a 11 000 g y dejar secar por lo menos 30 min. Los lavados dependerán de la coloración de la pastilla.
15. Secar la pastilla a 65°C en un termoblock, una vez seca, resuspender la pastilla en 50 μL de agua inyectable.
16. Verificar la calidad del DNA por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %.

12.4 Participación en congresos



This is to certify that the poster

Reconocimiento de biomasa infecciosa endógena en hortalizas

Compañ Aguilar L. J., Neria González M. I.

has been presented in the 2022 Twitter Latin American Conference on Environmental and Chemical Process Systems Engineering #LatinEnvChemPSE.

Prof. Adrián Bonilla-Petriciolet



Chairman of the Organizing Committee of #LatinEnvChemPSE





SOCIEDAD CIENTÍFICA INTERNACIONAL DE BIOTECNÓLOGOS A.C.
INTERNATIONAL SCIENTIFIC SOCIETY OF BIOTECHNOLOGIST CSO

Otorga la presente

CONSTANCIA

a:

Laín Joseph Compañ-Aguilar, Ricardo Aguilar López2, María
Isabel Neria-Gonzalez

Por la presentación en CARTEL del trabajo


**Identificación de bacterias infecciosas endófitas en
vegetales**

en el

IX Congreso Internacional de Biotecnología SOCIBI y
III Encuentro de estudiantes y egresados del posgrado del
CICB-UATx
celebrado en Tlaxcala, México los días 3-6 de diciembre de 2022.




DR. RODRIGO LEDESMA AMARO
Secretario


DRA. MARÍA DEL CARMEN
SÁNCHEZ HERNÁNDEZ
Presidenta de la SOCIBI


C.P. ADRIANA HERNÁNDEZ
GRANDE
Tesorera