



Cooperativa:
"Planta comunitaria para el secado de productos pesqueros operada con energía termosolar para su integración en comunidades rurales"

VALORACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOQUÍMICAS, ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS PROCESADOS POR LA PLANTA COMUNITARIA DE ENERGÍA TERMOSOLAR Y TALLER DE BUENAS PRACTICAS.



"Planta comunitaria para el secado de productos pesqueros operada con energía termosolar para su integración en comunidades rurales"

ÍNDICE

PROPIEDADES BIOQUIMICAS	5
Introducción	5
METODOLOGÍA	6
Determinación del Porcentaje de Cenizas.....	6
Determinación de Lípidos Totales	7
Determinación de Nitrógeno Total.....	8
Resultados	9
Determinación del Porcentaje de Cenizas.....	9
Determinación del Contenido de Carbohidratos Totales	10
Determinación del Contenido de Lípidos Totales.....	10
Determinación de Nitrógeno Total.....	11
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	12
Introducción	12
METODOLOGÍA	13
Cuenta de Microorganismo Coliformes Totales en Placa	13
Preparación de diluciones primarias y diluciones de las muestras.....	13
Preparación de medios de cultivo para la detección de coliformes totales en placa	15
DETERMINACIÓN DE SALMONELLA EN ALIMENTOS	16
Pre-enriquecimiento	16
Enriquecimiento selectivo	17
Selección y siembra en medios sólidos.....	18
Identificación bioquímica	20
Serotipificación de colonias sospechosas.....	21
Método para la estimación de la densidad de Escherichia Coli por la técnica del Número Más Probable (NMP).....	22
RESULTADOS	24
Coliformes Totales en Placa.....	24
Determinación de Salmonella	26
Densidad de Escherichia coli	31
TALLER DE BUENAS PRÁCTICAS EN MICROBIOLOGÍA	33
Introducción.	33
Metodología	34

Resultados	35
CONCLUSIÓN.....	38
REFERENCIAS	40

PROPIEDADES BIOQUIMICAS

Introducción

Los alimentos marinos secados por energía termosolar ofrecen una rica fuente de nutrientes esenciales para la salud humana. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), "la producción de alimentos secos mediante energía solar es una alternativa prometedora para mejorar la seguridad alimentaria" (FAO, 2020). El proceso de secado termosolar permite preservar las propiedades nutricionales de los productos marinos, manteniendo intactos los beneficios de sus componentes naturales.

Entre las propiedades nutricionales destacadas de los alimentos marinos secados por energía termosolar se encuentran proteínas de alta calidad, que contienen aminoácidos esenciales como la lisina y la metionina (Kumar et al., 2022). Además, son una excelente fuente de ácidos grasos poliinsaturados, como los ácidos grasos omega-3, que ayudan a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (National Oceanic and Atmospheric Administration [NOAA], 2022). Los alimentos marinos secados también son ricos en minerales esenciales, como el calcio, fósforo, potasio y sodio (FAO, 2020). Asimismo, contienen vitaminas liposolubles, como la vitamina A, D, E y K, fundamentales para la salud ósea y la función inmunológica (Kumar et al., 2022).

Finalmente, los alimentos marinos secados contienen antioxidantes y pigmentos naturales, como la astaxantina y la ficocianina, que tienen propiedades antiinflamatorias y antimicrobianas (NOAA, 2022). El secado termosolar permite mantener estas propiedades nutricionales, minimizando la pérdida de nutrientes y garantizando una alimentación saludable y sostenible.

METODOLOGÍA

Determinación del Porcentaje de Cenizas

A partir de las muestras procesadas por la planta comunitaria, se pesó 1 gr de cada una y fueron colocadas en crisol, luego, las muestras fueron puestas a incinerar durante 4 horas a 550 °C en una mufla de la marca Felisa, Mod: FE-340. Terminado el tiempo de incineración se dejó enfriar hasta los 100 °C y fue colocada en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente (NMX-F-066-S-1978). Finalmente, se pesó el material remanente y se realizó el cálculo mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ ceniza} = \frac{(P - p) \times 100}{M}$$

En donde:

P = Masa del crisol con las cenizas en gramos.

p = Masa de crisol vacío en gramos.

M = Masa de la muestra en gramos.



Figura 1. Ejemplo de muestras incineradas.

Cada muestra seca fue triturada, tamizada y conservada al vacío antes de su uso. La concentración de carbohidratos se determinó aplicando el método de Dubois et al. (1956), a través de una curva de calibración de la absorbancia en función de la

concentración, para la cual se prepararon soluciones de 0.1 a 1 mg/mL utilizando dextrosa (J.T. Baker®) como estándar. Las muestras fueron molidas con la ayuda de un mortero para facilitar el proceso de digestión, se pesó 2 mg de cada muestra y fueron transferidas a tubos de ensayo, se agregó 4 ml de ácido sulfúrico concentrado, se agito en vortex por 5 seg y se dejó digerir a baño maría a 90°C durante 1 hora. A continuación, se procedió a transferir 100 uL del material digerido a un tubo de ensayo, al cual se le añadieron 500 uL de agua. Tras esta adición, se agitó en vortex durante 5 seg. Luego, se incorporaron 500 uL de fenol al 5%, y nuevamente se agitó en vortex durante 5 seg. seguidamente, se agregaron 2.4 mL de ácido sulfúrico, seguido de otra agitación en vortex durante 5 seg. Finalmente, se dejaron reaccionar por 15 min. Transcurrido el tiempo, se realizó la lectura en un espectrofotómetro de UV-Visible (Thermo-Scientific modelo Evolution 201) a una longitud de onda de 488 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado.



Figura 2. Proceso de digestión y determinación de carbohidratos

Determinación de Lípidos Totales

Para la extracción y determinación de lípidos se empleó una adaptación de la metodología propuesta por Ramalhosa y colaboradores (2012). Primero, las muestras fueron trituradas hasta pulverizar, con la ayuda de una licuadora. El proceso de extracción mediante el método Soxhlet se realizó con 3 gramos de cada muestra, las cuales fueron envueltas en papel filtro de poro grueso, luego, se agregó 300 mL de hexano grado reactivo como solvente. El solvente se calentó hasta alcanzar el punto de ebullición, y se mantuvo el proceso en curso durante un período de 6 horas. Al término de este tiempo, se procedió a la recuperación del extracto

con hexano que contenía los lípidos totales. Luego, se llevó a cabo la recuperación del solvente y se procedió a secar la muestra en un horno a una temperatura de 65°C durante un lapso de 20 horas. El proceso concluyó con la determinación del rendimiento obtenido.

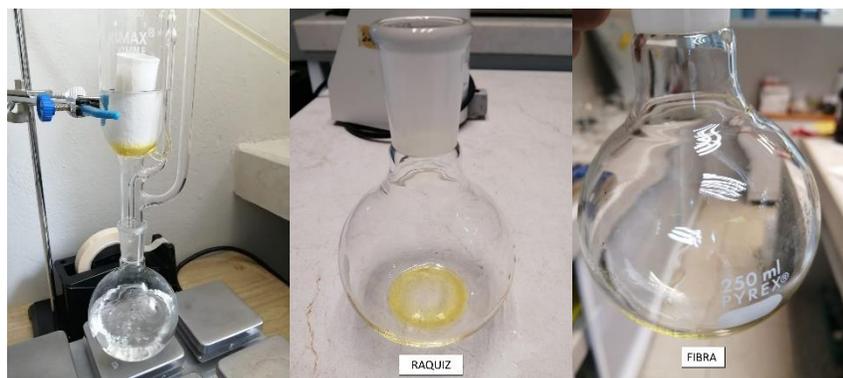


Figura. 3. Método de extracción por Soxhlet y determinación de lípidos.

Determinación de Nitrógeno Total

Se utilizó una modificación de la metodología descrita en la NOM-F-68-S-1980 para determinación de proteínas en alimentos. 150 mg de cada muestra fue digerido en un matraz Kjeldahl por ebullición de 20 mL de ácido sulfúrico puro (J.T. Baker, grado reactivo), 8 g de sulfato de sodio anhidro (CTR, grado reactivo) y 2 g de sulfato de cobre pentahidratado (Sigma-Aldrich, grado reactivo) y perlas de cristal durante 3 horas, o hasta la clarificación de la mezcla. A continuación, la mezcla atemperada fue destilada agregando 300 mL de agua destilada, zinc (Fermont, 20 Mallas) y 50 mL de hidróxido de sodio (Reasol, grado reactivo); los vapores y el condensado es recibido en 50 mL de Ácido bórico (Sigma grado reactivo) al 2% y unas gotas de indicador Shiro Tashiro, hasta que el condensado presente pH neutro. Para finalizar, el condensado es titulado con ácido clorhídrico 0.1 N (J. T. Baker, 36.5-38% grado reactivo) hasta que el indicador cambie de color de verde a violeta. El contenido total de nitrógeno se calculó con la fórmula:

$$\% \text{ de nitrógeno} = \frac{V \times N \times 0.014}{m} \times 100$$

Donde:

V: Volumen de ácido clorhídrico empleado para titular (cm³)

N: Normalidad del ácido clorhídrico

m: Masa de la muestra (g)

0.014: Miliequivalente del nitrógeno

Y el contenido proteico se calculó utilizando el factor 6.25 de acuerdo con la relación nitrógeno proteína (16 % en alimentos)

Resultados

Determinación del Porcentaje de Cenizas

Los valores del porcentaje de cenizas se presentan a continuación en la siguiente tabla No. 1.

Tabla 1. Valores porcentuales de cenizas en muestras procesadas por la planta comunitaria.

Muestra	% Cenizas
Residuo de pescado	29.4 ± 0.7
Alimento de tilapia	9.7 ± 0.4
Alimento canino	13 ± 0.3
Harina de pescado	28.8 ± 2



Los resultados mostraron que las muestras “Residuo de pescado” y “Harina de pescado” presentaron los porcentajes mayores de contenido de ceniza, en ese sentido pudiera relacionarse a un alto contenido de sales minerales provenientes de su naturaleza de origen.

Determinación del Contenido de Carbohidratos Totales

Los valores del porcentaje del contenido de carbohidratos totales se presentan en la Tabla 2. Los resultados mostraron que las muestras “Alimento de Tilapia” y “Alimento Canino” presentaron los valores más altos de contenido de carbohidratos.

Tabla 2. Valores porcentuales de carbohidratos en muestras procesadas por la planta comunitaria.

Muestra	Carbohidratos totales (μg por mg de muestra)	RENDIMIENTO CARBOHIDRATOS (%)
Residuo de pescado	< 6	< 0.6
Alimento de tilapia	21.69 \pm 0.99	2.17 \pm 0.1
Alimento canino	60.76 \pm 2.16	6.07 \pm 0.2
Harina de pescado	< 6	< 0.6

Determinación del Contenido de Lípidos Totales

Con relación a los análisis del contenido de lípidos totales (Tabla 3), los porcentajes determinados indicaron un alto contenido de estas biomoléculas en todas las muestras. De esta manera se confirma que los productos alimenticios de origen marino pueden tener un alto contenido de lípidos, muchos de los cuales pueden ser de gran aporte nutrimental.

Tabla 3. Contenido de Lípidos Totales en muestras procesadas por la planta comunitaria de energía termosolar.

Muestra	Peso extracto lipídico (mg por g de muestra)	Rendimiento de lípidos (%)
Harina de Pescado	92.63 \pm 2.74	9.26 \pm 0.27
Alimento Canino	121.74 \pm 0.89	12.17 \pm 0.09
Alimento Tilapia	115.39 \pm 1.03	11.54 \pm 0.1

Residuos Pescado	111.4 ± 1.35	11.14 ± 0.13
------------------	--------------	--------------



Determinación de Nitrógeno Total

El rendimiento de proteínas de las muestras analizadas, mostraron que la “Harina de pescado” y “Residuos de Pescado” presentaron el mayor porcentaje de proteína a diferencia de las muestras de alimento. De esta manera, se confirma que tanto los lípidos y las proteínas no disminuyen considerablemente en los productos que fueron secados por la planta de energía termosolar.

Tabla 4. Contenido de Nitrógeno y Proteínas en muestras procesadas por la planta comunitaria de energía termosolar

Muestra	Nitrógeno total (%)	Rendimiento proteína (%)
Harina de Pescado	10.23 ± 0.1	63.97 ± 0.67
Alimento Canino	5.97 ± 0.18	37.33 ± 1.16
Alimento Tilapia	5.29 ± 0.01	33.05 ± 0.67
Residuos de Pescado	9.33 ± 0.28	58.39 ± 1.78



ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Introducción

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

Con base a lo anterior, haciendo uso de las Normas Oficiales Mexicanas enunciadas, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar la cuantificación de coliformes totales, la presencia de *Salmonella* y de la estimación de la densidad de *E. coli* a través de la técnica del Número Más Probable en alimentos procesados a través de la Planta Comunitaria de Tecnología Termosolar.

METODOLOGÍA

Cuenta de Microorganismo Coliformes Totales en Placa

Preparación de soluciones diluyentes:

Para la cuantificación de **coliformes totales en placa** se requirió preparar de manera previa soluciones diluyentes. De acuerdo con los resultados obtenidos en análisis previos se optó por utilizar sólo el agua peptonada como solución diluyente, ya que los resultados obtenidos son similares a los obtenidos con la solución reguladora de fosfato (ambas presentadas como opciones viables de uso en la NOM-242-SSA1-2009). En este sentido siguiendo lo mencionado por la norma se pesó 1 gramo de peptona de caseína, 8.5 gramos de cloruro de sodio (NaCl) y se disolvieron en un litro de agua destilada. Se ajustó el pH a 7 ± 0.1 con hidróxido de sodio 1 N y/o ácido clorhídrico 1 N. Posteriormente esta solución diluyente fue dividida en 90 mL en matraces Erlenmeyer y se esterilizó a $121^\circ \pm 1^\circ \text{C}$ durante 15 minutos, se dejó enfriar y se mantuvo en refrigeración entre 0 a 5°C hasta su uso.

Preparación de diluciones primarias y diluciones de las muestras

Los análisis microbiológicos fueron realizados a cuatro muestras de productos derivados de pescado secado por energía termosolar, los cuales se denominaron de la siguiente manera:

Tabla 1. Denominación establecida para las muestras de productos derivados de pescado seco.

No.	Descripción	Nomenclatura asignada
1	Restos de pescado	Muestra 1 (M1)
2	Harina de pescado	Muestra 2 (M2)
3	Alimento tilapia	Muestra 3 (M3)
4	Alimento canino	Muestra 4 (M4)

a)

b)

c)

d)



Figura 1. Muestras de pescado secado por energía termosolar. a) Restos de pescado, b) harina de pescado, c) alimento tilapia y d) alimento canino

De acuerdo con lo enunciado en la NOM-242-SSA1-2009, para la cuenta de coliformes totales en placa se tomaron de manera aséptica 10 gramos de muestra. Es importante mencionar que todo el material utilizado para los análisis fue desinfectado y esterilizado en autoclave para evitar la contaminación cruzada. Así mismo, el personal encargado de realizar los análisis utilizó en todo momento cubrebocas y guantes estériles de látex. Posterior al pesaje, las muestras fueron colocadas en contenedores de licuadora y se les agregó 90 mL de solución diluyente. Se licuó por 1 minuto hasta homogeneizar la muestra y se dejó reposar para que las partículas más grandes sedimentaran.

De manera paralela se prepararon seis tubos con 9 mL de la solución diluyente. De la muestra previamente licuada se transfirió 1 mL al primer tubo, obteniendo una dilución 10^{-1} . Este procedimiento se repitió hasta obtener una dilución final de 10^{-6} . Los tubos resultantes fueron homogenizados con 25 movimientos de arriba – abajo en un tiempo máximo de 7 segundos. Finalmente se dejaron reposar hasta su uso (Fig. 2).

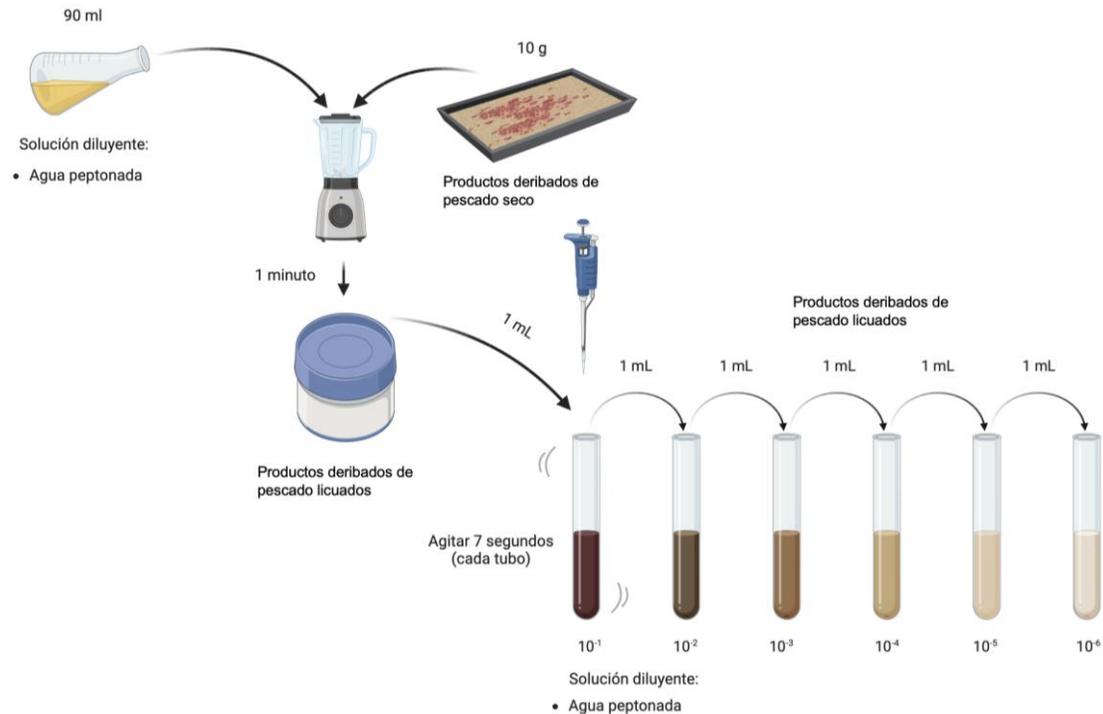


Figura 2. Diagrama general de preparación de diluciones primarias de las muestras de productos de pescado seco.

Preparación de medios de cultivo para la detección de coliformes totales en placa

Se utilizó el medio de cultivo selectivo *Agar Bilis y Rojo Violeta* (ABRV) de la marca MCD LAB S.A. de C.V. el cual se preparó siguiendo las especificaciones del fabricante. Una vez esterilizado el medio se colocó en un baño maría (Shel Lab) para mantener una temperatura de 45 ± 1.0 °C que permitiera asegurar la viabilidad del inóculo proveniente de las muestras analizadas. Una vez en la temperatura adecuada (procurando que el tiempo no sea más de 20 minutos de haber preparado las diluciones primarias), se colocaron 15 mL del medio en cajas de Petri e inmediatamente 1 mL de la dilución previamente preparada de la muestra. Se mezcló de acuerdo con lo mencionado por la NOM con seis movimientos de derecha a izquierda y seis movimientos en el sentido de las manecillas del reloj y seis de atrás hacia adelante, con el objetivo de homogeneizar el inóculo de la muestra. Se dejaron reposar las cajas hasta su solidificación para finalmente después verter 4 mL de medio de cultivo nuevamente. Se dejó solidificar y se incubó a 35°C durante

24 horas. Pasado el tiempo se registró la cantidad de UFCs desarrolladas (Fig. 3). Este procedimiento se realizó por triplicada y para cada una de las muestras analizadas.

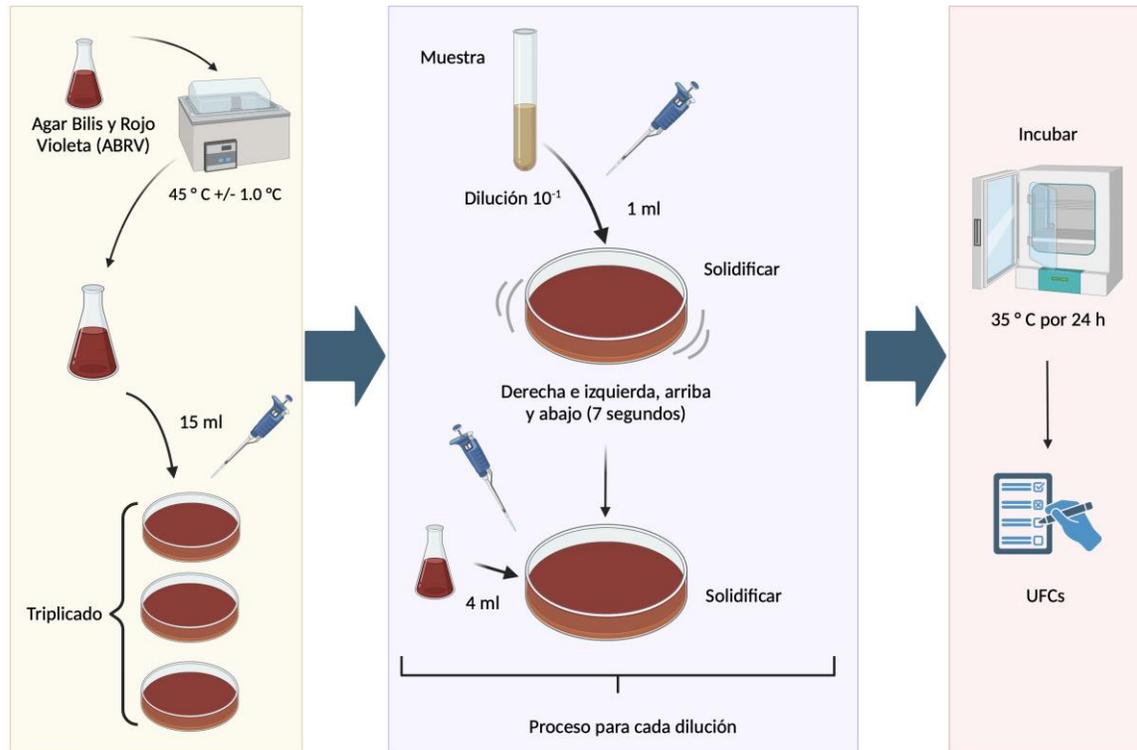


Figura 3. Diagrama general del proceso de inoculación en el Agar Bilis y Rojo Violeta

DETERMINACIÓN DE SALMONELLA EN ALIMENTOS

La determinación de *Salmonella* consistió en cinco etapas fundamentales: 1) pre-enriquecimiento, 2) enriquecimiento selectivo, 3) selección de medio sólido, 4) identificación bioquímica y 5) serotipificación, los cuales se detallarán a continuación.

Pre-enriquecimiento

Se pesaron 25 gramos de muestra en recipientes desinfectados y esterilizados, y se colocó en un contenedor de licuadora bajo las mismas condiciones de esterilidad. Posteriormente se añadieron 225 mL de caldo lactosado de la marca MCD Lab S.A. de C.V., el cual fue preparado siguiendo las especificaciones del fabricante. Una vez colocado en el contenedor se licuó la muestra durante 1 minuto, se transfirió a un recipiente de boca ancha y se dejó reposar durante 60 minutos. Pasado el tiempo

se midió el pH y se ajustó con hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico 1 N estériles para ajustar a un pH final de 6.8 ± 0.2 . Una vez ajustado el pH la muestra se dejó en incubación por 24 horas a 35°C (Fig. 4).

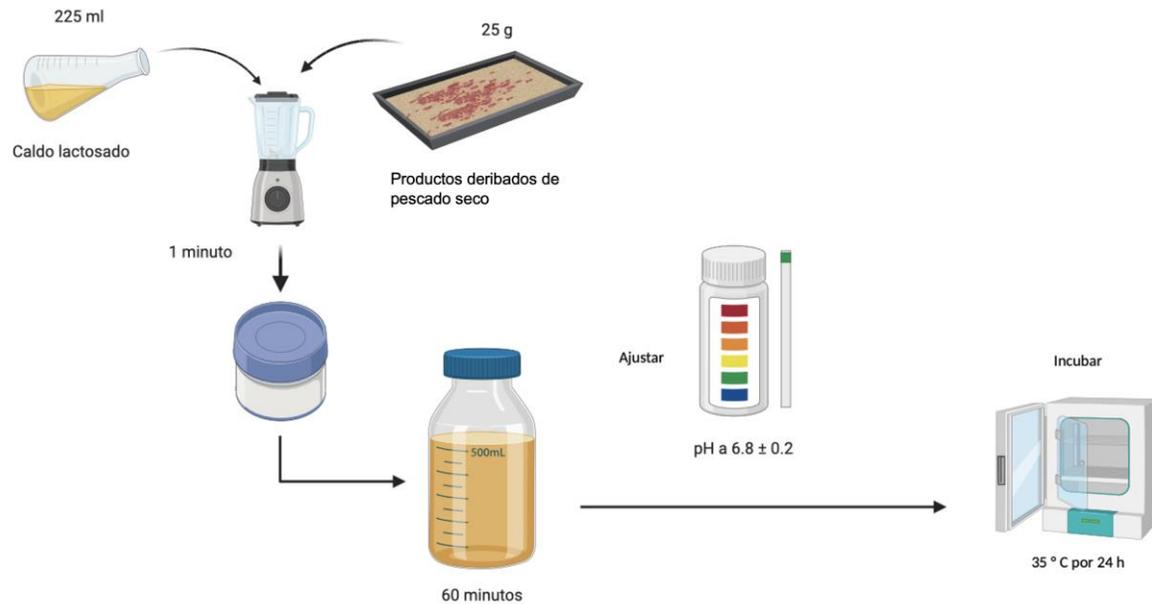


Figura 4. Diagrama general del proceso de pre-enriquecimiento de las muestras

Enriquecimiento selectivo

Para el enriquecimiento selectivo de *Salmonella* se utilizó caldo tetrionato (MCD Lab S.A. de C.V.) y caldo selenito cistina (Condalab) como medios de enriquecimiento. La preparación se realizó siguiendo las especificaciones del fabricante, por lo que para el caldo tetrionato fue necesaria la adición de una solución de yodo-yoduro y verde brillante al 0.1%, respetando la relación de 2 mL y 1 mL respectivamente por cada 100 mL de caldo. Una vez preparado los medios se dispensaron en tubos de ensayo por triplicado, a un volumen final de 10 mL. Finalmente, de las muestras incubadas en el pre-enriquecimiento se agitaron, se tomó 1 mL y se inocularon en cada uno de los tubos de caldo tetrionato y caldo selenito cistina, para dejar en incubación por 24 horas a 35°C (Fig. 5).

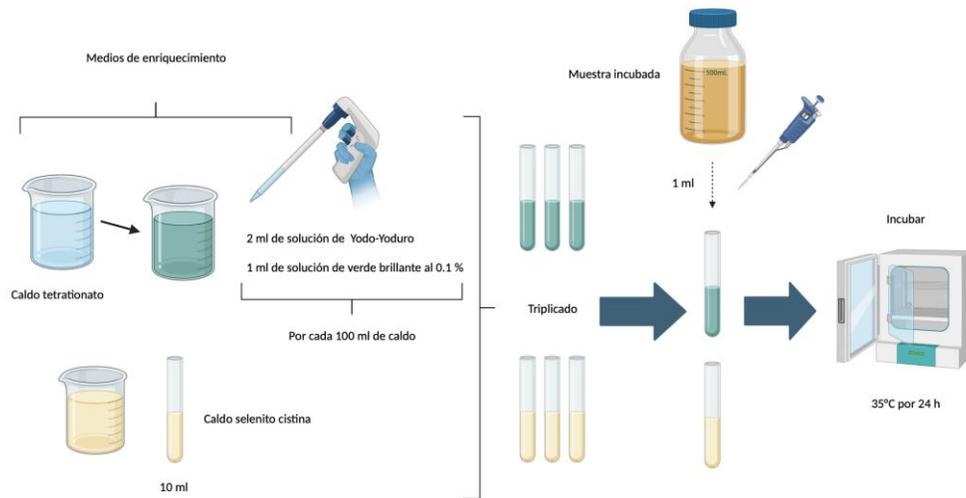


Figura 5. Diagrama general del proceso de enriquecimiento selectivo de las muestras.

Selección y siembra en medios sólidos

De acuerdo con la NOM-242-SSA1-2009 para el reconocimiento visual se seleccionaron 3 medios de cultivo selectivos sólidos: 1) Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) de la marca Dibico, 2) Agar Verde Brillante (AVB) de la marca MCD Lab S.A. de C.V. y 3) Agar *Salmonella* y *Shigella* (ASS) de la marca MCD Lab S.A. de C.V. La preparación de los medios de cultivo fue acorde a las especificaciones de los fabricantes.

De los tubos en incubación de la etapa de enriquecimiento se tomaron y se agitaron para homogeneizar el contenido. Con un asa bacteriológica se tomó un pequeño inóculo y se estrió en tres placas de cada uno de los agares preparados: XLD, AVB y ASS. Una vez finalizado el estriado, las placas se dejaron en incubación 24 horas a 35°C con sus respectivos controles (cajas sin inoculación) (Fig. 6). Pasado el tiempo las colonias fueron inspeccionadas y se contrastó su morfología colonial con la siguiente tabla:

Tabla 2. Descripción de colonias típicas de *Salmonella* esperadas de acuerdo con el medio de cultivo sólido empleado.

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

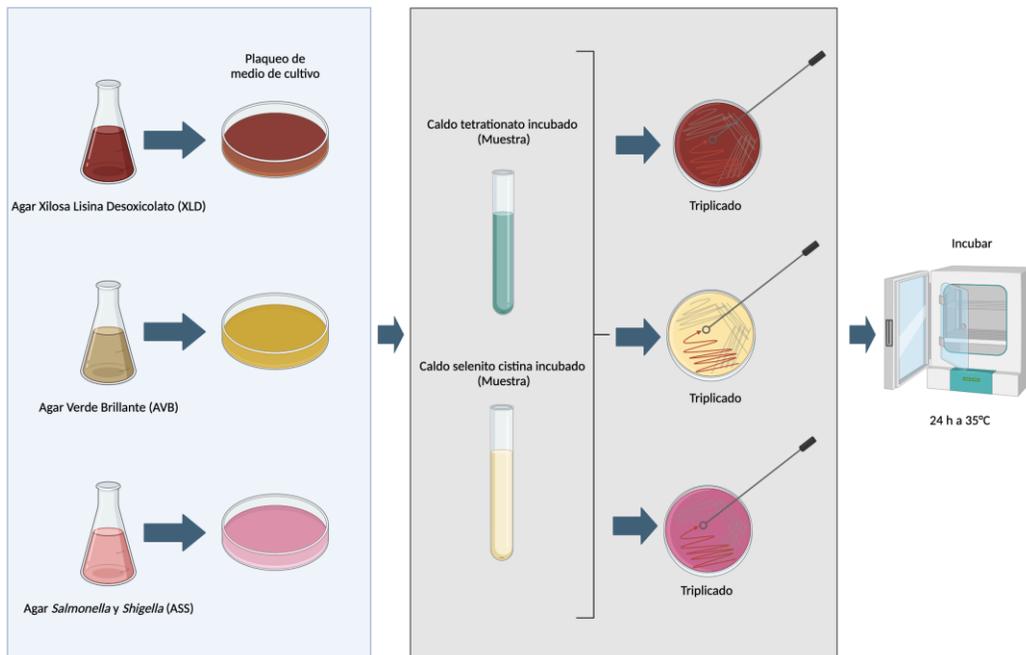


Figura 6. Diagrama general de la siembra en medios sólidos.

Identificación bioquímica

Para la identificación bioquímica de *Salmonella* se utilizaron los medios de cultivo Agar Triple Azúcar Hierro (TSI) de la marca BD Bioxon y Agar Hierro Lisina (LIA) de la marca MCD Lab S.A de C.V., ambos medios se prepararon de acuerdo con las especificaciones enunciadas por el fabricante. Los medios fueron dispensados de 10 mL en tubos de ensayo para dejar solidificar de manera inclinada. De las colonias obtenidas en los medios sólidos XLD, AVB y ASS (sección 1.2.3.) y que cumplieron con la descripción de colonias sospechosas (tabla 2) se inocularon en el agar inclinado de la siguiente manera: con un asa bacteriológico se tomó la colonia y se realizó una punción en el fondo del tubo y finalizó con un estriado en la superficie inclinada. Una vez realizada la inoculación en los tubos se dejaron en incubación por 24 horas a 35°C (Fig. 7). Pasado el tiempo de incubación se analizó de manera visual los tubos y se contrastó lo observado con lo enunciado en la siguiente tabla:

Tabla 3. Resultados esperados de las pruebas bioquímicas para *Salmonella* (NOM-242-SSA1-2009).

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

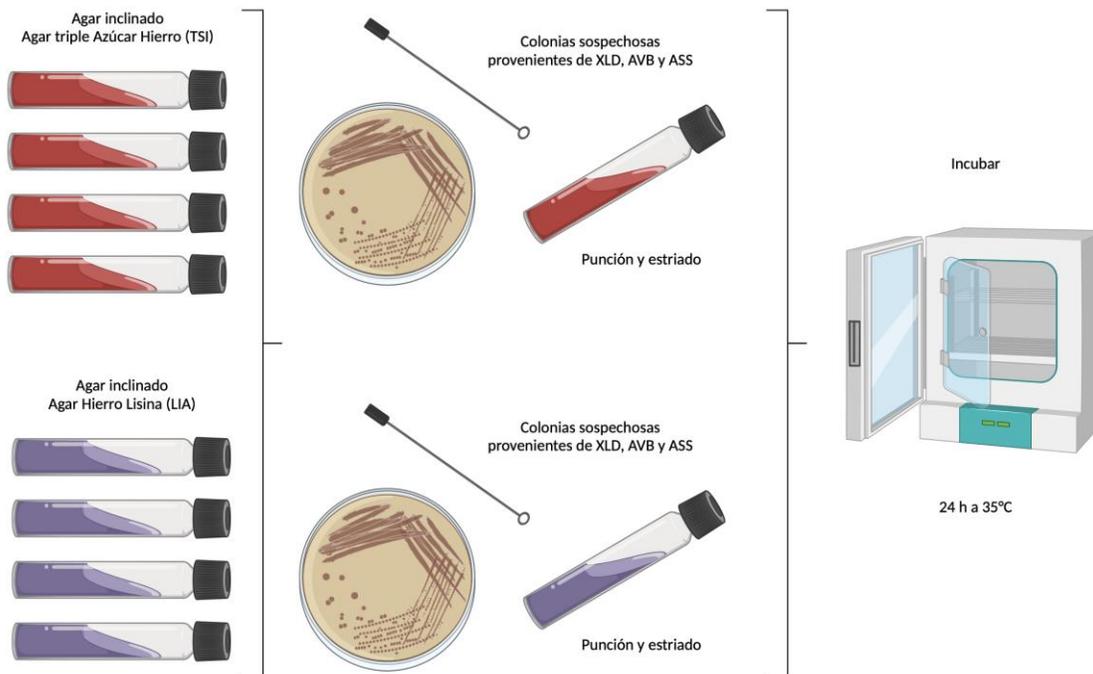


Figura 7. Diagrama general del proceso de realización de las pruebas bioquímicas para la determinación de *Salmonella*

Serotipificación de colonias sospechosas

Como prueba confirmativa de presencia de *Salmonella* se realizó la serotipificación. Se empleó el antígeno somático de *Salmonella* (Antisuero polivalente O) de la marca BD Difco el cual fue reconstituido con 3 mL de solución salina estéril al 0.85%, se almacenó en refrigeración hasta su uso. Por otro lado, en un portaobjetos dividido con una línea en el centro, se colocaron dos gotas de solución salina estéril (0.85%). De cada uno de los tubos de las pruebas bioquímicas en donde se desarrollaron colonias sospechosas de *Salmonella* se tomó con un asa una porción de la colonia y se suspendió en ambas gotas de solución salina del portaobjetos. A una de las gotas se le añadió una gota del antisuero polivalente somático O y con ayuda de un aplicador de madera se mezcló hasta su homogenización. Seguidamente el portaobjetos se agitó de atrás hacia adelante aproximadamente por un minuto. Finalmente se dejó reposar y se observó el aglutinamiento de las células bacterianas (Fig. 8).

De acuerdo con la NOM-242-SSA1-2009 se consideró positiva la prueba cuando se presentó aglutinamiento en la gota en donde se colocó la solución salina, la muestra y antisuero, y negativa en donde no se presentó aglutinamiento (solución salina y la muestra).

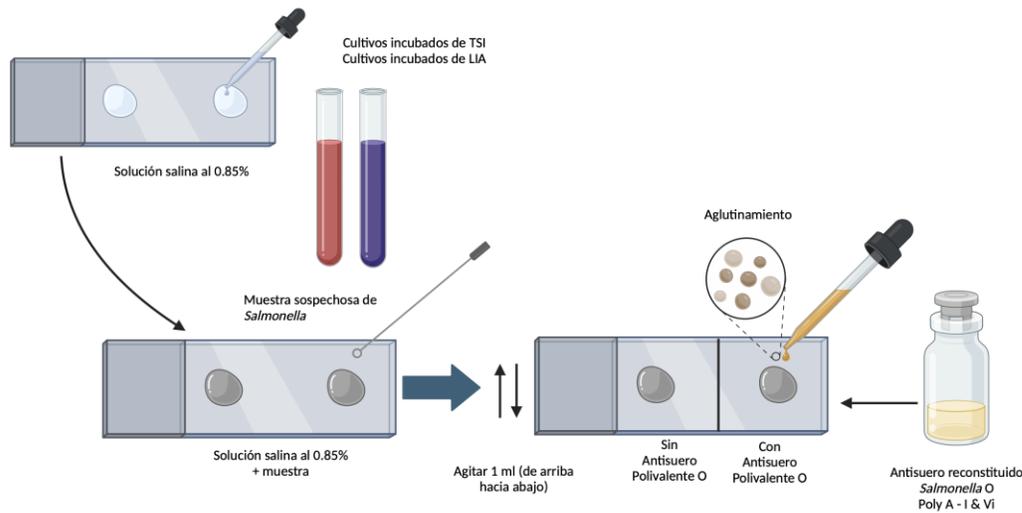


Figura 8. Diagrama general de la serotipificación de colonias sospechosas de *Salmonella*.

Método para la estimación de la densidad de *Escherichia Coli* por la técnica del Número Más Probable (NMP)

La estimación de la densidad de *Escherichia coli* consistió en dos etapas, la primera correspondiente al enriquecimiento de las muestras y la segunda a la comprobación de la presencia de *E. coli*. Para el enriquecimiento se pesaron 10 gramos de muestra, se colocó en un contenedor de licuadora estéril y se le añadió 90 mL de agua peptonada estéril para licuar durante 1 minuto. Posteriormente se dejó reposar la muestra licuada para que las partículas grandes sedimentaran. Seguidamente se tomaron 10 mL de la superficie de las muestras licuadas y se colocaron en tubos Falcon que contenían 10 mL de Caldo Glutamato con Minerales Modificado (MMGB) a doble concentración de la marca Sigma-Aldrich. A la dilución resultante se le denominó como “dilución primaria”. De la dilución primaria se tomó 1 mL y se colocó en tres tubos con 9 mL de MMGB a doble concentración, para así obtener “diluciones secundarias”. Este procedimiento se repitió hasta la obtención de una dilución 1:2000. De cada una de las diluciones secundarias a doble concentración

se inocularon 3 tubos con MMGB a concentración simple, tomando 1 mL y diluyendo en 9 mL de MMGB a concentración simple, hasta obtener tres replicas a una dilución 1:10. Este procedimiento se repitió hasta obtener una dilución de 1:1000. Se mezclaron los tubos con los inóculos diluidos y se dejaron en incubación a $37^{\circ}\text{C} \pm 1.0$ por 24 horas.

Pasado el tiempo de la incubación resultante se comprobó que se presentase una coloración en aquellos tubos evidentemente amarilla, los cuales se estriaron en placas de agar TBX (Tryptona-Bilis-X-Glucuronido) de la marca Milipore para obtener colonias aisladas. Una vez realizado el estriado en las placas estas se dejaron en incubación a $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Después del periodo de incubación se observó la coloración de las colonias bacterianas desarrolladas. Se tomó como positivo para *Escherichia coli* cuando las colonias presentaron una coloración azul-verdoso (oscuro pálido) lo cual indicó la presencia de la b-glucuronidasa (Fig. 9). Finalmente, con los datos obtenidos se estimó el Número Más Probable (NMP) por gramo de muestra analizada tomando como referencia la tabla de intervalos de confianza I.1 de la NOM-242-SSA1-2009.

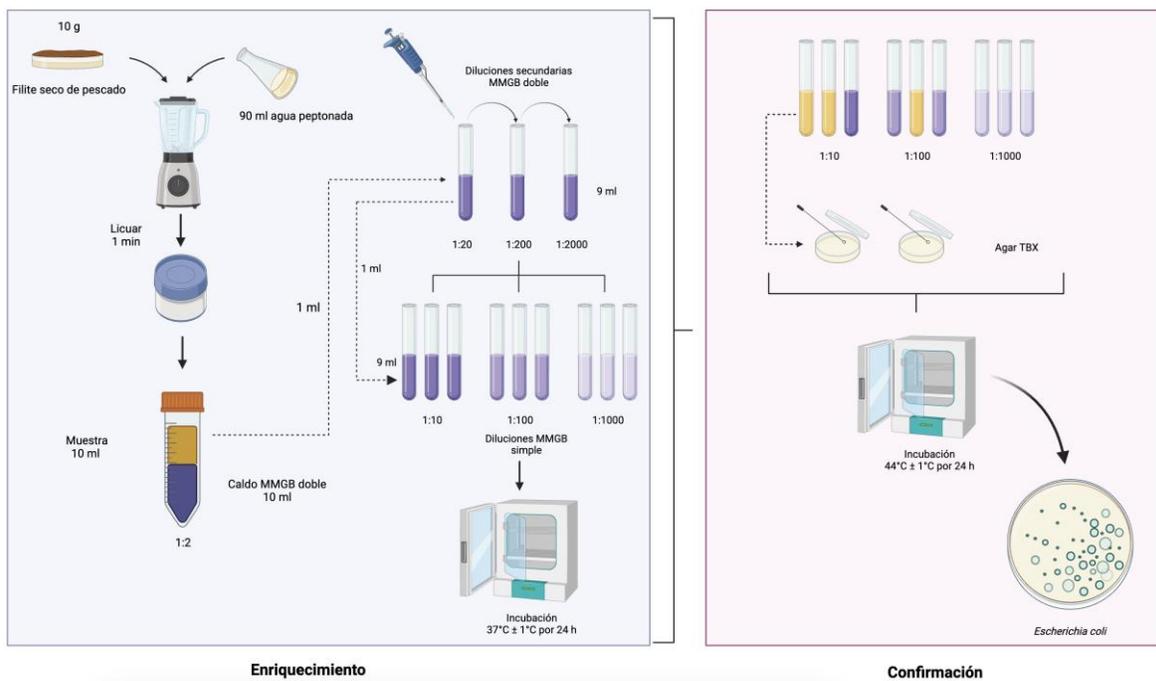


Figura 9. Diagrama general del proceso de obtención de *Escherichia coli* de muestras de productos derivados de pescado seco.

RESULTADOS

Coliformes Totales en Placa

Los resultados evidenciaron que, de las cuatro muestras analizadas, sólo la **muestra 1** y la **muestra 2** se consideraron positivas para coliformes totales ya que presentaron crecimiento microbiano característico. La **muestra 3** y la **muestra 4** no presentaron desarrollo bacteriano en ninguna de las diluciones probadas (Fig. 10). La estimación de la densidad de coliformes totales se observa en la figura 11, en la cual se evidencia que la muestra 1 fue la que mayor densidad de coliformes presentó, seguido de la muestra 2.

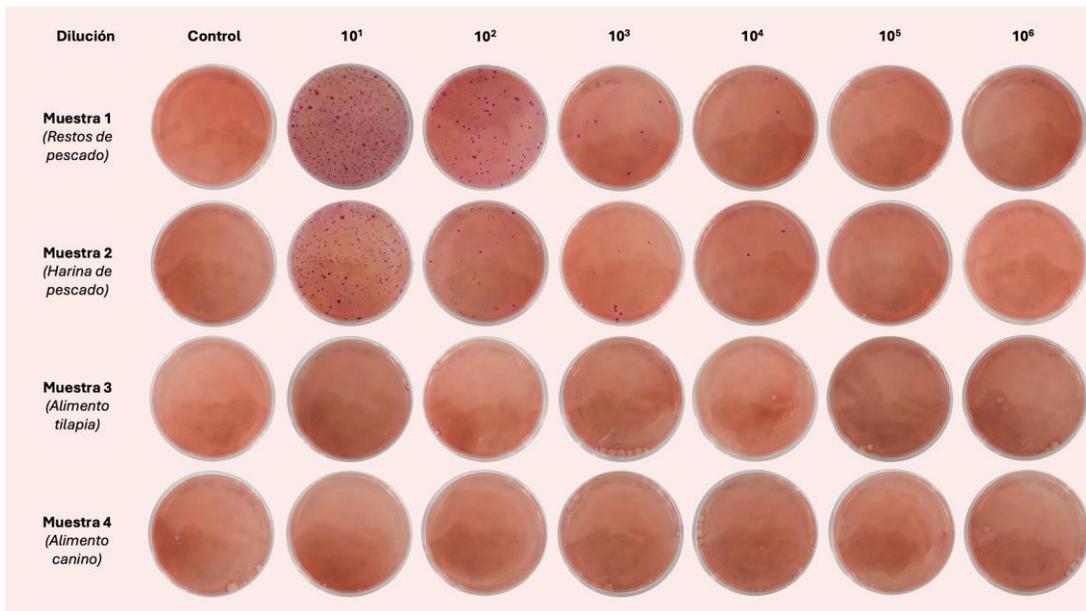


Figura 10. Coliformes totales aislados en la a) muestras 1 y b) muestra 2. No hay desarrollo microbiano en la c) muestra 3 y d) muestra 4.

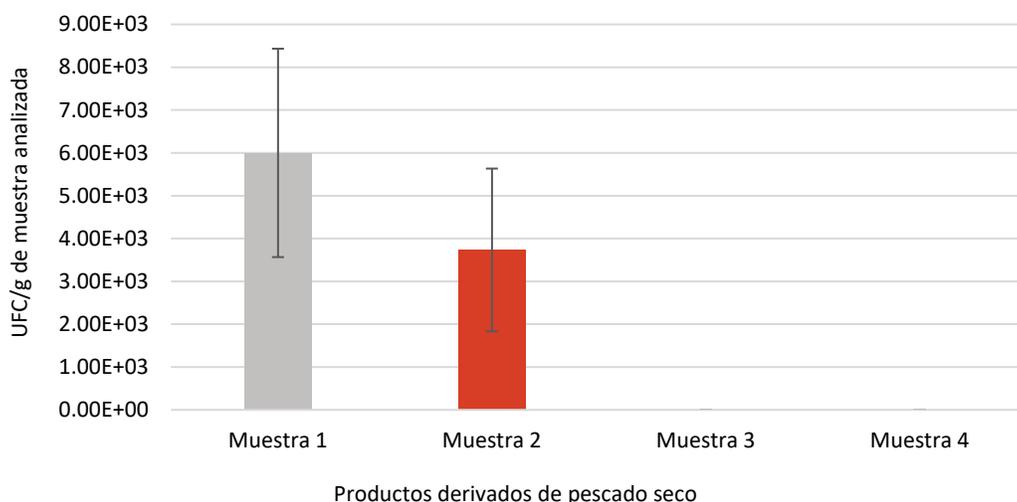


Figura 11. UFC/g de coliformes totales de muestras de productos derivados de pescado seco.

Debido a que en la en la NOM-242-SSA1-2009 sólo se especifica el valor en NMP/g para productos frescos, refrigerados y congelados, se decidió tomar como referencia el límite máximo especificado para coliformes totales de la NOM-129-SSA1-1995: Bienes y servicios. Productos de la pesca: secos-salados, ahumados, moluscos cefalópodos y gasterópodos frescos-refrigerados y congelados. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Con ellos se pudo comprobar que los valores de UFC obtenidos de las muestras no sobrepasan el límite establecido de 500,000 UFC/g (Tabla 4). No obstante, pese al bajo valor de coliformes encontrado se deja en evidencia de que es necesaria una mejor gestión del control higiénico de los productos derivados de pescado seco antes y durante la manipulación y empaquetado.

Tabla 4. Densidad bacteriana de coliformes totales de productos derivados de pescado seco

Muestra	UFC/g de muestra obtenido	Límite permisible UFC/g de muestra*
Muestra 1	6000	500,000
Muestra 2	3733	500,000
Muestra 3	0	500,000
Muestra 4	0	500,000

*Valor máximo permisible establecido en la NOM-129-SSA1-1995.

Determinación de Salmonella

La determinación de *Salmonella* permitió identificar que de las cuatro muestras analizadas sólo dos evidenciaron desarrollo de colonias sospechosas, siendo estas la **muestra 1** y la **muestra 2**. La morfología de las colonias bacterianas sospechosas de la **muestra 1** (Fig. 12) y **muestra 2** (Fig. 13) en los medios cultivo selectivo correspondió a lo enunciado por la NOM-242-SSA1-2009 (tabla 2). En el Agar XLD las colonias desarrolladas fueron totalmente negras. Es importante mencionar también se presentó desarrollo de colonias amarillas que cambiaron la coloración del agar a amarillo, indicando la fermentación de la lactosa. De acuerdo con las especificaciones del fabricante la coloración de las colonias fue un factor sospechoso de presencia adicional de la bacteria *Escherichia coli*. En el AVB las colonias fueron rojas y las bacterias fermentadoras de la lactosa fueron de color amarillo. Finalmente, en el Agar SS las colonias desarrolladas fueron de coloración negra y rojas; fermentadoras de la lactosa.

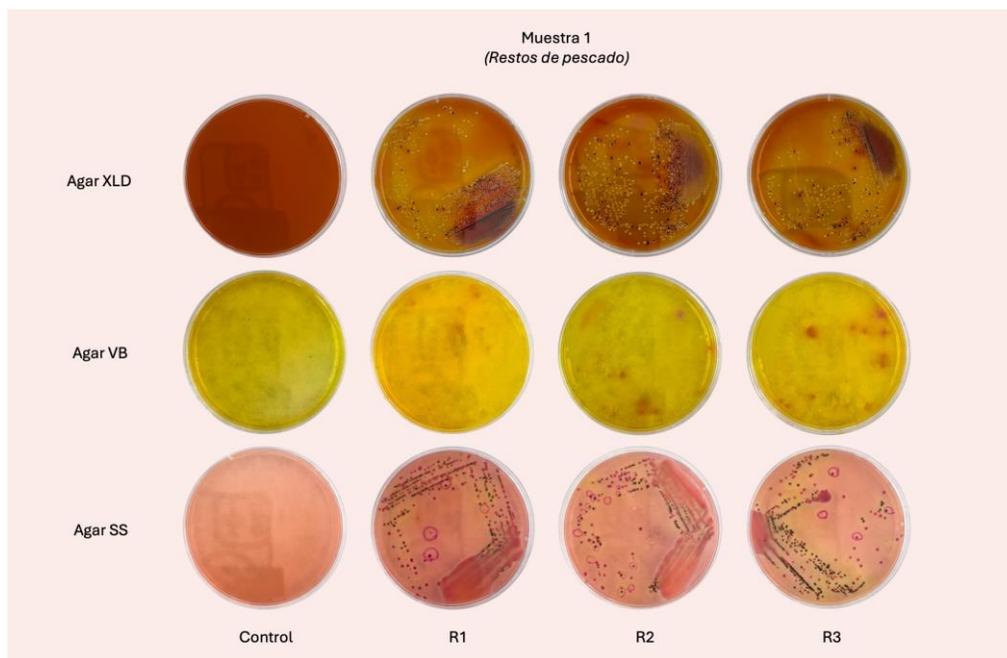


Figura 12. Colonias sospechosas de *Salmonella* aisladas de la muestra 1 en los diferentes medios cultivo sólidos.

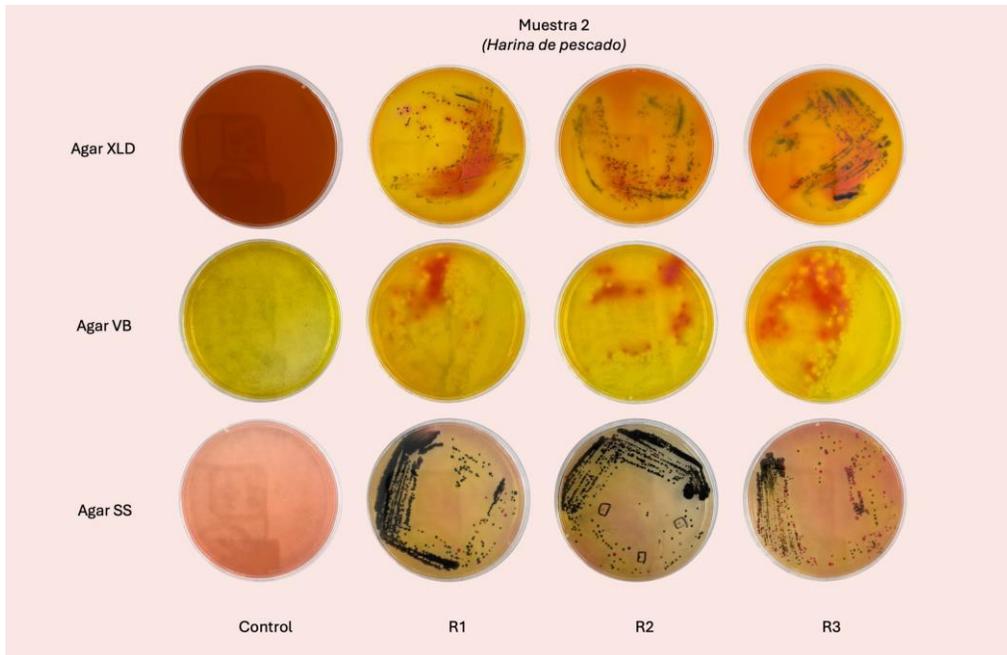


Figura 13. Colonias sospechosas de Salmonella aisladas de la muestra 2 en los diferentes medios de cultivo sólidos.

Por su parte la **muestra 3** (Fig. 14) y **muestra 4** (Fig. 15) no evidenciaron desarrollo bacteriano alguno.

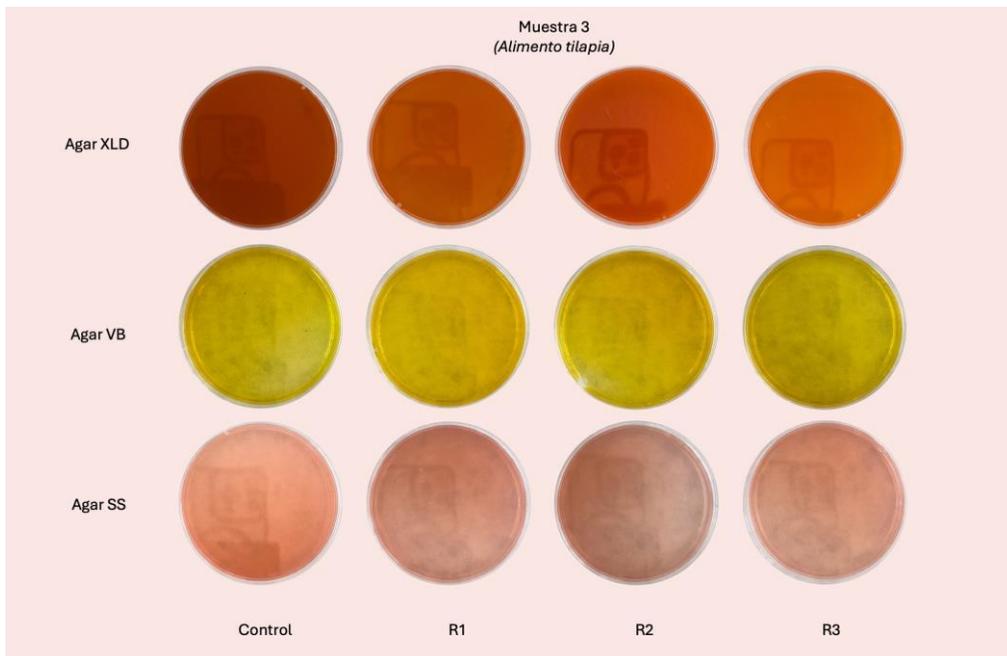


Figura 14. Medios de cultivo sólidos sin colonización microbiana de la muestra 3.

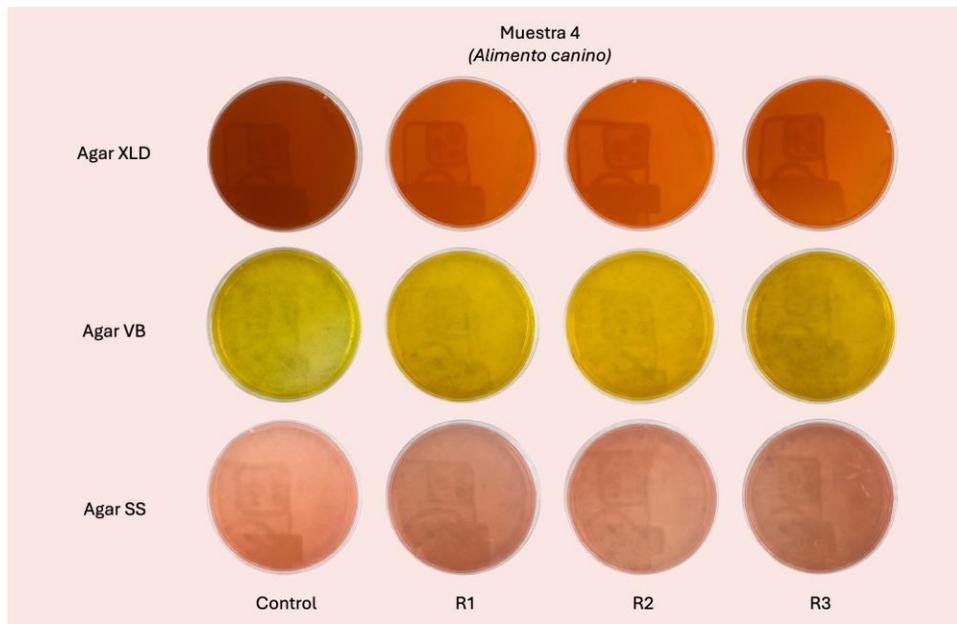


Figura 15. Medios de cultivo sólidos sin colonización microbiana de la muestra 4.

Las pruebas bioquímicas realizadas evidenciaron que de las colonias microbianas desarrolladas en los medios de cultivo sólidos y sembradas en los tubos con agar LIA y TSI, se detectó comportamiento sospechoso de presencia de *Salmonella* en ambas muestras (**muestra 1** y **muestra 2**) (Fig. 16). Es importante destacar que, aunque no todos los tubos en donde se desarrolló crecimiento cumplieron con las características típicas de *Salmonella*, al menos uno proveniente de la muestra dio positivo, indicando así la presencia en toda la muestra. Por otro lado, debido a la ausencia de colonias bacterianas desarrolladas en los medios de cultivo sólidos de las **muestras 3** y la **muestra 4**, no fue necesaria la continuación con las pruebas bioquímicas por lo cual se descartó por completo la presencia de algún microorganismo del género *Salmonella* o similares.

De la **muestra 1** y la **muestra 2** se pudo determinar la presencia de bacterias fermentadoras de lactosa, de sacarosa y glucosa, ya que en algunos casos la coloración del fondo de los tubos en el TSI cambió de coloración de roja a amarilla. Por otro lado, en algunos casos se detectó la producción de gas en el fondo de los tubos, lo que ocasionó el desprendimiento del agar. Finalmente se evidenció la precipitación de H₂S (ácido sulfhídrico). Por su parte, en el agar LIA en la mayoría

de los casos se detectó la producción de H₂S y en algunos casos el fondo cambió a coloración amarilla lo que indicó la fermentación de la glucosa (Fig. 16).



Figura 16. Pruebas bioquímicas realizadas a las colonias sospechosas de *Salmonella* de la muestra 1 y muestra 2.

Finalmente, con el Antisuero Somático O se confirmó la presencia de *Salmonella* en ambas muestras. En la figura 17 se puede observar que de las colonias sospechosas desarrolladas en los medios de cultivo TSI y LIA de la **muestra 1**, 6 presentaron el aglutinamiento celular característico para *Salmonella*. Para la **muestra 2** se confirmó el aglutinamiento de tres colonias aisladas de los medios bioquímicos, confirmando la presencia de *Salmonella* (Fig. 18).



Figura 17. Prueba de aglutinamiento de las colonias bacterianas provenientes de la muestra 1.



Figura 18. Prueba de aglutinamiento de las colonias bacterianas provenientes de la muestra 2.

Densidad de Escherichia coli

Los resultados evidencian que la **muestra 1** y la **muestra 2** presentaron el cambio de color en los tubos inoculados con la muestra correspondiente, indicando de manera presuntiva la presencia de *Escherichia coli*. Con estos datos se estimó la densidad de *E. coli* con la cual se determinó que la **muestra 1** presentó el menor valor de NMP/g de muestra, seguido de la **muestra 2** (Tabla 5). Por su parte la **muestra 3** y **muestra 4** no presentaron desarrollo de *E. coli*. En la siguiente tabla se resumen los valores calculados de NMP/g de muestra para las cuatro muestras evaluadas. Con la estimación de la densidad sólo la **muestra 2** sobrepasa los valores permisibles de densidad de *Escherichia coli*.

Tabla 5. Estimación del Número Más Probable (NMP) por muestra analizada.

Muestra	Dilución	Combinación de tubos positivos	Confirmación de coloración	NMP/g de muestra	Límite máximo permisible NMP/g*
Muestra 1	0.1	3	+	150 NMP/g	400 NMP/g
	0.01	2	+		
	0.001	1	+		
Muestra 2	0.1	3	+	460 NMP/g	
	0.01	3	+		
	0.001	1	+		
Muestra 3	0.1	0	-	< 3 NMP/g	
	0.01	0	-		
	0.001	0	-		
Muestra 4	0.1	0	-	< 3 NMP/g	
	0.01	0	-		
	0.001	0	-		

*Valor máximo permisible establecido en la NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba.

Finalmente se pudo comprobar la presencia de *Escherichia coli* en la **muestra 2** debido al desarrollo de colonias de coloración azul verdoso, el cual indicó la presencia de la enzima glucuronidasa, altamente específica para *E. coli*. Es importante mencionar que, aunque en la **muestra 1** no hubo coloración azul verdoso, si se presentó crecimiento bacteriano, lo que puede indicar la presencia de una variante adicional de *E. coli* que es negativa a la b-β-glucuronidasa, especialmente la cepa O157 la cual puede llegar a representar el 3 al 4 % de las *E. coli* detectadas en muestras ambientales (Fig. 19).

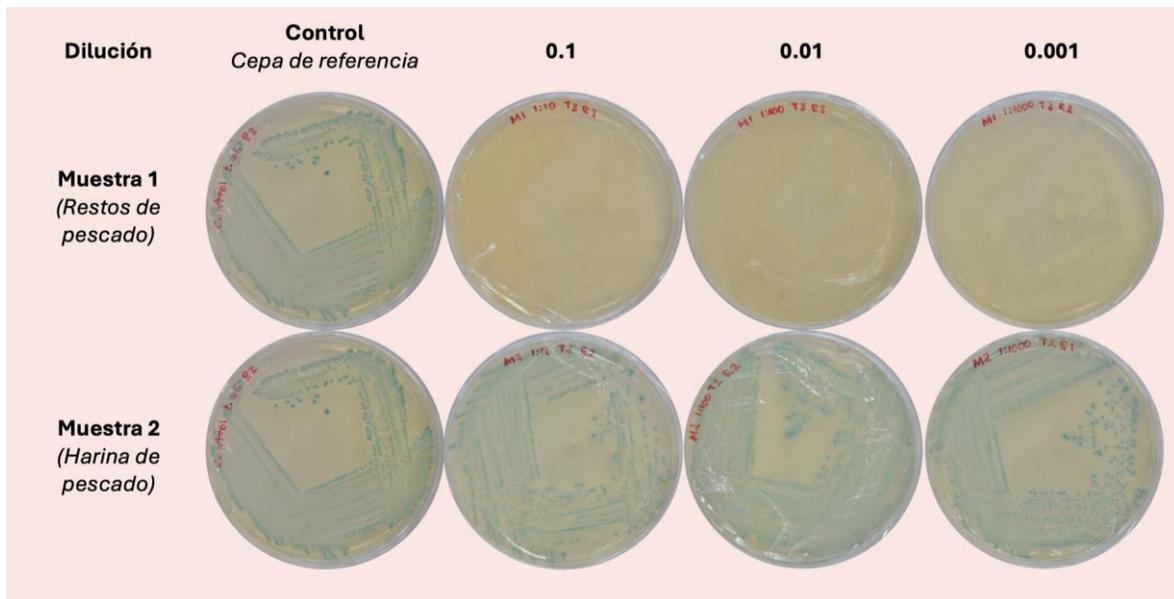


Figura 19. Confirmación de la presencia de *Escherichia coli* en Agar TBX (Tryptona-Bilis-X-Glucurónido)

TALLER DE BUENAS PRÁCTICAS EN MICROBIOLOGÍA

Introducción.

La diversidad de microorganismos en los ecosistemas marinos es enorme, y su influencia en la calidad y seguridad de los alimentos marinos es fundamental. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), "la contaminación microbiana es una de las principales causas de enfermedades transmitidas por alimentos" (OMS, 2020). En este sentido, es esencial comprender la microbiología de los alimentos marinos para garantizar su inocuidad y calidad.

Los alimentos marinos, como pescados, crustáceos, moluscos y algas, pueden albergar una variedad de microorganismos, incluyendo bacterias, virus y levaduras (Gram et al., 2015). Estos microorganismos pueden ser beneficiosos, como los probióticos, o patógenos, como Salmonella, E. coli y Vibrio (FAO, 2018).

La microbiología de los alimentos marinos también se ve influenciada por factores como la temperatura, pH, salinidad y procesamiento (Kumar et al., 2022). Por ejemplo, el secado y la congelación pueden reducir la carga microbiana, mientras que la temperatura inadecuada puede favorecer el crecimiento de microorganismos patógenos. En este contexto, es fundamental aplicar técnicas de análisis microbiológico y control de calidad para garantizar la seguridad y calidad de los alimentos marinos (ICMSF, 2011). La investigación en microbiología de alimentos marinos es continua, y su aplicación práctica es crucial para proteger la salud pública.

Por lo anterior, los profesores – investigadores adscritos al Centro de Investigación en Microbiología Ambiental y Biotecnología (CIMAB) de la Universidad Autónoma de Campeche colaboradores del proyecto PRONAI (319524) en coordinación con la Dra. Margarita Castillo Téllez, organizaron e impartieron el taller "Buenas prácticas en microbiología" a la comunidad de pescadores que forman parte del proyecto "Planta comunitaria para el secado de productos pesqueros operada con energía termosolar para su integración en comunidades rurales". Dichas actividades, realizadas se presentan a continuación:

Metodología

Los profesores – investigadores adscritos al Centro de Investigación en Microbiología Ambiental y Biotecnología (CIMAB) de la Universidad Autónoma de Campeche colaboradores del proyecto PRONAI (319524) en coordinación con la Dra. Margarita Castillo Téllez, organizaron e impartieron el taller “Buenas prácticas en microbiología” a la comunidad de pescadores que forman parte del proyecto “Planta comunitaria para el secado de productos pesqueros operada con energía termosolar para su integración en comunidades rurales”.

El programa del taller se presenta a continuación:



UACAM
Universidad Autónoma de Campeche



Taller “Buenas Prácticas en Microbiología”

En el marco del proyecto:

“Planta comunitaria para el secado de productos pesqueros operada con energía termosolar para su integración en comunidades rurales” – CONAHCYT 319524

- 10:00hrs: Registro y bienvenida
- 10:15hrs: Charla “Microbios en el ambiente” Ponente: Dr. Juan Carlos Camacho Chab.
- 10:45 hrs: Charla “Hongos microscópicos” Ponente: Dra. María Manuela Reyes Estebanez
- 11:15hrs: Charla “Microbios en los alimentos y enfermedades asociadas” Ponente: M. en C. Juan Enrique Pereañez Sacarías
- 11:45 hrs: COFFEE BREAK
- 12:00hrs: Taller experimental: “El ABC para manejar alimentos de manera segura”
Imparten: M. en C. Juan Enrique Pereañez Sacarías, Dra. María Manuela Reyes Estebanez y estudiante: pQFB. Edrai J Ascencio Naal.
- 12:45 hrs: Taller experimental “Conociendo la química de los alimentos y nutrientes”
Imparten: M. en C. Augusto Ignacio Almeyda Cen, M. en C. Radames de Jesús Álvarez Zapata y estudiante: pQFB Rosita A. Pino Canul.
- 13:45 hrs: CLAUSURA

Lugar: Sala de Usos Múltiples del CIMAB y Laboratorio de Docencia del CIMAB

Día: miércoles 9 de octubre de 10:00 a 14:00hrs

Resultados

El taller contempló la impartición de tres charlas de divulgación, así como de una sesión de mesas experimentales las cuales fueron impartidas a pescadores de la comunidad de Lerma, Campeche, así como de sus familiares (esposas e hijos) implicados también en el manejo y procesado de la carne de pescado.

La primera charla contempló aspectos generales sobre la importancia del conocimiento de los microorganismos, sus beneficios, así como su patogenicidad. Esta charla estuvo a cargo del Dr. Juan Carlos Camacho Chab, y se tituló “Microbios en el ambiente” (Fig. 1).



Figura 1. Charla de divulgación “Microbios en el ambiente” impartida por el Dr. Juan Carlos Camacho Chab.

La segunda estuvo a cargo del M. en C. Juan Enrique Pereañez Sacarías y se tituló “Microbios en los alimentos y enfermedades asociadas” en la cual se expuso la importancia de las buenas prácticas en el manejo y manipulación de productos de la pesca para disminuir y erradicar microorganismos peligrosos para la salud humana (Fig. 2).



Figura 2. Charla de divulgación “Microbios en los alimentos y enfermedades asociadas” impartida por el M. en C. Juan Enrique Pereañez Sacarías.

La tercera charla estuvo a cargo de la Dra. María Manuela de Jesús Reyes Estebanez, la cual tituló “Hongos microscópicos”. El objetivo de esta charla fue explicarles a los pescadores asistentes la importancia de los hongos microscópicos y de la problemática asociada a la salud por la producción de micotoxinas en carne almacenada (Fig. 3).



Finalmente, las mesas experimentales tuvieron como finalidad que los pescadores tuvieran un primer contacto con los microorganismos aislados de muestras de carne de pescado, así como de las herramientas y técnicas empleadas para el análisis de las muestras de productos derivados de la pesca (Fig. 4a – Figura 4e).



Figura 4. Desarrollo de las mesas experimentales en el taller. a) Exposición de bacteria aisladas de carne de pescado, b) exposición de hongos microscópicos, c - d) exposición de pruebas bioquímicas realizadas a la carne de pescado y e) grupo de trabajo del CIMAB y pescadores de la comunidad de Lerma, Campeche.

CONCLUSIÓN

Los estudios bioquímicos de los productos que fueron deshidratados por la planta termosolar se enfocaron en el análisis de cenizas (minerales), carbohidratos, lípidos y proteínas en su totalidad. Lo anterior, con la finalidad de poder valorar de manera preliminar el aporte de biomoléculas nutricionales que contienen los productos deshidratados. Cabe destacar que los valores de lípidos y de proteínas fueron los de mayor porcentaje, por lo que se puede destacar que no existe una reducción significativa al ser procesados a través de la planta de energía termosolar.

En paralelo, se comprobó la presencia de coliformes totales, Salmonella y Escherichia coli en la muestra 2, "harina de pescado". Para el caso de la muestra 1, "restos de pescado", sólo se comprobó la presencia de coliformes y Salmonella. Las muestras procesadas como pellets (muestra 3 y muestra 4), destinadas a la comercialización como alimento de tilapia y canino respectivamente, no presentaron ningún desarrollo microbiano en las pruebas realizadas, por lo cual se determinó considerarlas libres de coliformes totales, Salmonella y Escherichia coli.

De las muestras en las que se encontró presencia microbiana, sólo la muestra 2 sobrepasa el límite permisible de NMP/g de muestra para la densidad de E. coli. En este caso, es importante mencionar que, aunque en la muestra 1 no se logró determinar la presencia de E. coli con el método de prueba establecido por la NOM-242-SSA1-2009, sí se presentó crecimiento microbiano en el medio de cultivo probado, por lo que, de acuerdo con la literatura, es probable que el microorganismo desarrollado pertenezca a una variante de E. coli negativa al reactivo adicionado al medio de cultivo. Por ello, se determinó no considerar libre de presencia de E. coli a esta muestra.

Finalmente, es importante hacer mención que los resultados obtenidos demuestran una deficiencia en el manejo y almacenaje de los productos derivados de pescado seco. Es necesario realizar una revisión de las buenas prácticas de higiene que se sugieren en los manuales y normas para el procesado de alimentos derivados de la pesca, con el objetivo de disminuir o eliminar los microorganismos patógenos de las muestras a analizar en sus diferentes versiones de presentación, ya sea triturado, harina o en pellets.

En este contexto, el taller contempló una sesión de ponencias de divulgación en donde, de manera inicial, el Dr. Juan Carlos Camacho Chab abordó la importancia de conocer sobre los microorganismos, sus beneficios, así como su patogenicidad. Seguidamente, el M. en C. Juan Enrique Pereañe Sacarías planteó la relevancia de las buenas prácticas en el laboratorio de microbiología para disminuir o erradicar microorganismos peligrosos para la salud humana. Finalmente, la Dra. María Manuela Reyes Estebanez explicó a los pescadores la importancia de los hongos microscópicos y el problema que pueden ocasionar en la salud debido a la producción de micotoxinas cuando estos se desarrollan en productos almacenados.

Las sesiones complementarias experimentales tuvieron como objetivo poner en contacto a los pescadores con las herramientas y técnicas empleadas en el laboratorio para el análisis de las muestras de productos derivados de la pesca. Con esta participación, el CIMAB reafirma su compromiso social con los pescadores y cumple con los compromisos planteados en la colaboración bilateral del proyecto PRONAI 319524.

REFERENCIAS

1. Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P.; Smith, F. "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances". *Anal Chem.* 1956, 28 (3), 350–356.
2. FAO (2020). *The State of Food Security and Nutrition in the World.*
3. Kumar et al. (2022). Solar drying of seafood: A review. *Journal of Food Science and Technology.*
4. NMX-F-066-S-1978. DETERMINACIÓN DE CENIZAS EN ALIMENTOS.
5. NOM-F-68-S-1980. ALIMENTOS DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.
6. Ramalhosa, M. J., Paíga, P., Morais, S., Alves, M. R., Delerue-Matos, C., & Oliveira, M. B. P. P. (2012). Lipid content of frozen fish: Comparison of different extraction methods and variability during freezing storage. *Food Chemistry*, 131(1), 328-336.
7. Secretaría de Salud. NOM-129-SSA1-1995. Bienes y servicios. Productos de la pesca: secos-salados, ahumados, moluscos cefalópodos y gasterópodos frescos-refrigerados y congelados. Disposiciones y especificaciones sanitarias.
8. Secretaría de Salud. NOM-242-SSA1-2009. Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba.
9. MCD LAB. (s.f.). *Ficha técnica: Agar Hierro Lisina.*
10. Britania. 2012. *Ficha técnica: Lisina Hierro Agar.* https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6054e85d48c47.pdf
11. Britania. 2012. *Ficha técnica: T.S.I. Agar (Triple Sugar Iron Agar).* https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6070971eb11bd.pdf
12. MCD LAB. (s.f.). *Ficha técnica: Agar Hierro y Triple Azúcar.*
13. Condalab. 2020. *Ficha técnica: Agar Cromogénico TBX (Tryptone Bile X-Glucuronide) ISO.*

14. Milipore. 2019. *Ficha técnica: Chromocult TBX (Tryptone Bile X-glucuronide) Agar. acc. ISO 16649.*
15. MCD LAB. (s.f.). *Ficha técnica: Agar Bilis y Rojo Violeta.*
16. Thermo Fisher Scientific. (s.f.). *Ficha técnica: Antisuero Salmonella O Difco, Antisuero Salmonella H Difco, Antisuero Salmonella Vi Difco. BD.*
17. *Comité Internacional de Microbiología de los Alimentos (ICMSF). (2011). Microbiología de los alimentos: Un enfoque práctico.*
18. Gram, L., et al. (2015). *Microbiología de los productos del mar. En: Microbiología de los alimentos (pp. 257-274).*
19. Kumar, P., et al. (2022). *Microbiología de los alimentos marinos: Una revisión. Journal of Food Science and Technology.*
20. *Organización Mundial de la Salud (OMS). (2020). Informe sobre la situación mundial de la seguridad alimentaria y la nutrición.*