



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

**EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA MOLECULAR DE LA PCR UTILIZANDO EL
GEN *hlyA* COMO PRUEBA CONFIRMATIVA PARA LA DETECCIÓN DE
Salmonella spp. EN LODOS RESIDUALES Y BIOSÓLIDOS**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

AUTOR

NATHALY MARIANELLA ALDERETE LUDEÑA

ASESOR

DR. OSCAR ENRIQUE AGUINAGA VARGAS

CO ASESOR

DR. ADALBERTO NOYOLA ROBLES

LIMA – PERÚ

2024

Jurado calificador

Presidente: Dra. Patricia Sheen Cortavarria

Vocal: Mg. Ruth Liliana Cristobal Delgado

Secretario: Dr. Luis Antonio Llanco Albornoz

DEDICATORIA

A mis padres, por la constante motivación que me brindan para alcanzar mis metas.

El trabajo experimental fue realizado en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la UNAM que cuenta con certificado de conformidad otorgado por el organismo acreditado Certificación Mexicana, S.C., por haber implementado y mantener un Sistema de Gestión de la Calidad de conformidad con los requisitos de la norma internacional ISO 9001:2015. No. de Certificado CMX C SGC 209 2020, válido en el período del 12 de noviembre de 2020 al 11 de noviembre de 2023.

Este trabajo fue financiado por la Secretaría de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación de la Ciudad de México bajo el Proyecto SECTEI 265/2019 titulado “Análisis de la eficacia de remoción de patógenos en efluentes y lodos de tratamiento de aguas residuales en la Ciudad de México con fines de reúso seguro”.

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo de suficiencia profesional fue posible gracias a las personas que me apoyaron y apostaron por mí. Por consiguiente, les dedico estas líneas en forma de gratitud:

- A mis padres, Gloria Ludeña y Percy Alderete por su apoyo incondicional, por darme la mejor educación, confiar en cada decisión que tomo para lograr mis objetivos y sobre todo por nunca dejar que me rinda. Gracias por su amor infinito. Esta tesis también es de ustedes.
- A mi asesor, el Dr. Oscar Aguinaga y Co Asesor, el Dr. Adalberto Noyola por guiarme durante este proceso.
- A mi asesor técnico, el Dr. Yovany Cuetero por brindarme todo su apoyo, dedicación y consejos para la elaboración de este trabajo. Gracias por el tiempo y a su amplia experiencia para que este trabajo se desarrolle.
- A mi novio Héctor Vegil por ser el mejor compañero, apoyarme en cada paso que doy y siempre motivarme a culminar este trabajo.
- A mis abuelitos, sobre todo a mi Tata por siempre estar al pendiente de mis proyectos y motivarme a seguir adelante.
- A mis hermanas, Valery y Jazmin por siempre sacarme una sonrisa en todo momento con sus ocurrencias del día a día.
- A mis tíos por alentarme a continuar desarrollándome profesionalmente.
- A la familia Vegil y Garcia, por el apoyo que me brindaron en los momentos más difíciles y hacerme parte de su familia durante la pandemia. Nunca lo voy a olvidar.
- Finalmente, a Tommy, por su lealtad y siempre estar presente para mí.

Uigict FACI FAVEZ

EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA MOLECULAR DE LA PCR UTILIZANDO EL GEN *hflA* COMO PRUEBA CONFIRMATIVA PA...

Nathaly Marianella Alderete Ludeña
OCTUBRE Y NOVIEMBRE 2024
Universidad Peruana Cayetano Heredia

Detalles del documento

Identificador de la entrega
trncid:1.3085410479

Fecha de entrega
19 nov 2024, 12:23 p.m. GMT-5

Fecha de descarga
19 nov 2024, 5:02 p.m. GMT-5

Nombre de archivo
Tesis_Alderete_Lude_a-19nov24.docx

Tamaño de archivo
960.4 KB

66 Páginas
12,594 Palabras
70,859 Caracteres

17% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- Bibliografía
- Texto citado

Exclusiones

- N.º de fuente excluida
- N.º de coincidencias excluidas

Fuentes principales

- 17% Fuentes de Internet
- 3% Publicaciones
- 6% Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Los algoritmos buscan y advierten una mala redacción



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA MOLECULAR DE LA PCR UTILIZANDO EL
GEN *hflA* COMO PRUEBA CONFIRMATIVA PARA LA DETECCIÓN DE
Salmonella spp. EN LODOS RESIDUALES Y BIOSÓLIDOS

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

AUTOR

NATHALY MARIANELLA ALDERETE LUDEÑA

ASESOR

DR. OSCAR ENRIQUE AGUINAGA VARGAS

CO ASESOR

DR. ADALBERTO NOYOLA ROBLES

LIMA – PERÚ
2024

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. MARCO TEÓRICO	4
II.1. Plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR)	4
II.1.1. Proceso de tratamiento de aguas residuales	4
II.1.2. Producción de lodos en las PTAR	5
II.1.3. Tratamiento de lodos residuales	6
II.1.4. Microorganismos que se encuentran en los lodos residuales	7
II.2. <i>Salmonella</i> spp.	9
II.2.1. Características de crecimiento y supervivencia	10
II.2.2. Patogenicidad.....	11
II.2.3. Genes para la identificación de <i>Salmonella</i> spp.	12
II.2.4. Técnicas de detección de <i>Salmonella</i> spp.....	12
III. HIPÓTESIS	17
IV. OBJETIVOS.....	17
IV.1. OBJETIVO GENERAL	17
IV.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
V. METODOLOGÍA.....	18
V.1. Marco legal.....	18
V.2. Toma de muestra del lodo primario	18
V.3. Concentración del lodo	19

V.4. Enriquecimiento y aislamiento de <i>Salmonella</i> spp. en agares selectivos.....	19
V.5. Pruebas Bioquímicas	21
V.6. Prueba Molecular	22
VI. RESULTADOS	26
VI.1. Prueba de amplificabilidad del ADN	28
VI.2. Prueba de especificidad de la PCR del gen <i>hila</i>	29
VI.3. PCR del gen <i>hila</i> para las cepas bacterianas aisladas de lodo primario	29
VI.4. Caracterización taxonómica mediante la secuenciación del gen <i>16S-rRNA</i>	30
VI.5. Análisis estadístico Kappa	32
VII. DISCUSIÓN.....	33
VIII. CONCLUSIONES	39
IX. RECOMENDACIONES	40
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
XI. ANEXOS	53
GLOSARIO	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABLAS	

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

- **ADN:** Ácido Desoxirribonucleico
- **API-20E:** Índice de Perfil Analítico
- **ARN:** Ácido Ribonucleico
- **ARNt:** ARN de transferencia
- **AN:** Agar Nutritivo
- **BHI:** Brain Heart Infusion (Agar)
- **C:** Ceba
- **CT:** Caldo de Tetrionato
- **dNTP's:** Desoxirribonucleótidos trifosfato
- **EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético
- **hila:** hyper invasive locus A
- **invA:** invasion gene A
- **IP:** Isla de Patogenicidad
- **L:** Lote
- **LIA:** Laboratorio de Ingeniería Ambiental
- **LP:** Lodo Primario
- **NOM-004- SEMARNAT-2002:** Norma Oficial Mexicana
- **PB:** Pares de base
- **PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa
- **PTAR:** Planta de Tratamiento de Aguas Residuales
- **SB:** Sulfito Bismuto (Agar)
- **SC:** Selenito Cistina
- **SPI 1:** Isla de Patogenicidad 1 de *Salmonella*
- **SS:** Salmonella Shiguella (Agar)
- **TAE:** Tris, acetato y EDTA
- **VB:** Verde Brillante (Agar)
- **XLD:** Xilosa, Lisina, Desoxicolato (Agar)
- **16S rRNA:** ARN ribosómico 16S

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de tratamiento de aguas residuales en las PTAR.

Figura 2. Prueba de amplificabilidad del ADN para géneros distintos a *Salmonella* spp.

Figura 3. Prueba de especificidad de la PCR del gen *hila*.

Figura 4. PCR del gen *hila* para las cepas bacterianas aisladas de LP. Los recuadros rojo, amarillo, verde y azul representan los lotes 1, 2, 3 y 4 respectivamente.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización de los lodos generados en diferentes procesos de tratamiento de aguas residuales.

Tabla 2: Microorganismos patógenos que pueden ser encontrados en lodos residuales.

Tabla 3: Condiciones límites para el crecimiento de *Salmonella*.

Tabla 4. Presuntas colonias morfológicamente compatibles con *Salmonella* spp.

Tabla 5. Interpretación de los resultados de colonias sospechosas para *Salmonella* spp. en medios selectivos según la NOM-004-SEMARNAT-2002.

Tabla 6. Condiciones para la amplificación del gen *hlyA*.

Tabla 7. Condiciones para la amplificación del gen *16S rRNA*

Tabla 8. Resultados de las pruebas microbiológicas de los 4 lotes de lodos primarios.

Tabla 9. Resultados obtenidos en la prueba bioquímica miniaturizada API-20E realizada en las 8 cepas.

Tabla 10. Resumen de resultados de las pruebas microbiológicas, bioquímicas y moleculares.

Tabla 11. Análisis estadístico Kappa.

RESUMEN

El tratamiento de lodos residuales en Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) es crucial a nivel global debido a la presencia de microorganismos patógenos y contaminantes como *Salmonella* spp., *E. coli*, virus, parásitos y metales pesados. En ese contexto, el marco legal, la Norma Oficial Mexicana NOM-004-SEMARNAT-2002, busca reducir el impacto ambiental y proteger la salud pública.

La detección de *Salmonella* spp. en lodos residuales es crucial, y los métodos tradicionales como cultivos microbiológicos presentan limitaciones. Se sugiere el uso de pruebas moleculares como la PCR. En este contexto, el gen *hilA* es de interés debido a su asociación con la virulencia bacteriana en cepas de *Salmonella* spp.. La PCR del gen *hilA* permite el estudio de este gen en muestras biológicas, ofreciendo una alternativa eficaz a los métodos tradicionales. En este trabajo se empleó la PCR del gen *hilA* para detectar *Salmonella* spp. en muestras de lodos residuales, buscando una detección más rápida y eficiente que las pruebas microbiológicas y bioquímicas convencionales.

Los resultados mostraron que las pruebas microbiológicas, siguiendo procedimientos establecidos por la NOM-004-SEMARNAT-2002, permiten una identificación preliminar de *Salmonella* spp. en lodos residuales. Por otro lado, la PCR del gen *hilA* mostró que no es específica debido a su presencia en diversas bacterias. La posibilidad de errores en la especificidad de dicha técnica podría atribuirse a una posible contaminación cruzada; sin embargo, no se descarta un posible mecanismo de transferencia horizontal de genes, debido a que la matriz en donde se encontraron estas bacterias son ambientes dinámicos y estresantes, como lo son los lodos residuales.

Palabras clave: *Salmonella* spp., lodos, PCR, *hilA*, *16S rRNA*, pruebas microbiológicas, API-20E.

ABSTRACT

The treatment of sewage sludge in Wastewater Treatment Plants (WWTPs) is crucial globally due to the presence of pathogenic microorganisms and contaminants such as *Salmonella* spp., *E. coli*, viruses, parasites, and heavy metals. In this context, the legal framework, the Official Mexican Standard NOM-004-SEMARNAT-2002, aims to reduce environmental impact and protect public health.

The detection of *Salmonella* spp. in sewage sludge is crucial, and traditional methods such as microbiological cultures have limitations. The use of molecular tests such as PCR is suggested. In this context, the *hilA* gene is of interest due to its association with bacterial virulence in *Salmonella* spp. strains. PCR of the *hilA* gene allows the study of this gene in biological samples, offering an effective alternative to traditional methods. In this work, PCR of the *hilA* gene was used to detect *Salmonella* spp. in sewage sludge samples, aiming for faster and more efficient detection than conventional microbiological and biochemical tests.

The results showed that microbiological tests, following procedures established by NOM-004-SEMARNAT-2002, allow for a preliminary identification of *Salmonella* spp. in sewage sludge. On the other hand, PCR of the *hilA* gene showed that it is not specific due to its presence in various bacteria. The possibility of errors in the specificity of this technique could be attributed to potential cross-contamination; however, the possibility of a horizontal gene transfer mechanism is not ruled out, since the matrix where these bacteria were found is dynamic and stressful environments, such as sewage sludge.

Keywords: *Salmonella* spp., sludge, PCR, *hilA*, *16S rRNA*, microbiological tests, API-20E.

I. INTRODUCCIÓN

El tratamiento de los lodos residuales que se generan como un producto secundario en las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR), es de suma importancia a nivel mundial. Esto se debe a que los lodos residuales contienen microorganismos patógenos como *Salmonella* spp., *E.coli*, virus, parásitos, y además, contienen otros contaminantes, por ejemplo, metales pesados (1) (2), es debido a su alto impacto negativo al medio ambiente que es necesario tratar estos lodos residuales. Europa y los Estados Unidos lideran el manejo de los lodos residuales; por el contrario, los países latinoamericanos presentan algunas deficiencias en sus tratamientos. (3) (4).

En México, el marco legal para la disposición y tratamiento de lodos residuales con la finalidad de disminuir los impactos ambientales y efectos negativos a la salud pública es la Norma Oficial Mexicana NOM-004-SEMARNAT-2002, donde se establecen las especificaciones y los límites máximos permitidos de contaminantes en los lodos y biosólidos provenientes de las PTAR, con el fin de posibilitar su aprovechamiento o disposición final, atenuar sus efectos contaminantes para el medio ambiente y proteger la salud pública (6).

Un patógeno importante que se monitorea en los lodos residuales es *Salmonella* spp., su detección puede realizarse mediante diferentes métodos. Los métodos más tradicionales son los cultivos microbiológicos y las pruebas bioquímicas (7). Sin embargo, estos métodos presentan limitaciones como la detección de falsos positivos. Esto hace necesario buscar y aplicar nuevos métodos para encontrar resultados más confiables. Estudios recientes sugieren el uso de pruebas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La PCR es una técnica molecular utilizada para amplificar regiones específicas de ADN. La amplificación se logra mediante ciclos repetidos de desnaturalización, alineación y extensión de fragmentos de ADN utilizando una enzima llamada ADN polimerasa. La PCR es esencial en la investigación genética, diagnóstico molecular y diversas aplicaciones biotecnológicas (7) (20).

El gen *hila* es de interés en el contexto de la virulencia bacteriana, especialmente en cepas de *Salmonella* spp., dicho gen está asociado con la regulación de genes involucrados en la invasión de células hospedadoras por parte de *Salmonella*. La amplificación del gen *hila* mediante PCR permite la detección y el estudio de la presencia de este gen en muestras biológicas. La PCR del gen *hila* implica diseñar cebadores específicos para esa región del genoma de *Salmonella* que lo contiene. Estos cebadores son secuencias cortas de ADN que son complementarias a las secuencias flanqueantes del gen *hila*. Al utilizar estos cebadores en una reacción de PCR, se amplifica selectivamente la región del genoma que contiene el gen *hila*, permitiendo su detección y análisis (20).

Con la finalidad de poder optimizar la detección de *Salmonella* spp. con mayor rapidez y eficacia, en este trabajo se empleó la PCR como prueba confirmativa, alterna a las pruebas microbiológicas y bioquímicas, usando el gen *hila* para detectar *Salmonella* spp. en muestras de lodos residuales.

II. MARCO TEÓRICO

II.1. Plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR)

Las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales son infraestructuras en las que se eliminan los contaminantes de las aguas residuales mediante procesos físicos, químicos y biológicos. El objetivo es que el agua tratada alcance una calidad adecuada para su aprovechamiento en regadíos (parques y zonas agrícolas) o descarga en los ríos y mares. De esta manera, las PTAR ayudan a cuidar la salud de las personas que viven en zonas aledañas a las cuencas y a preservar el medio ambiente (8).

II.1.1. Proceso de tratamiento de aguas residuales

De manera general, el proceso de tratamiento de aguas residuales consta de cuatro etapas (9), las cuales se muestran en la Figura 1:

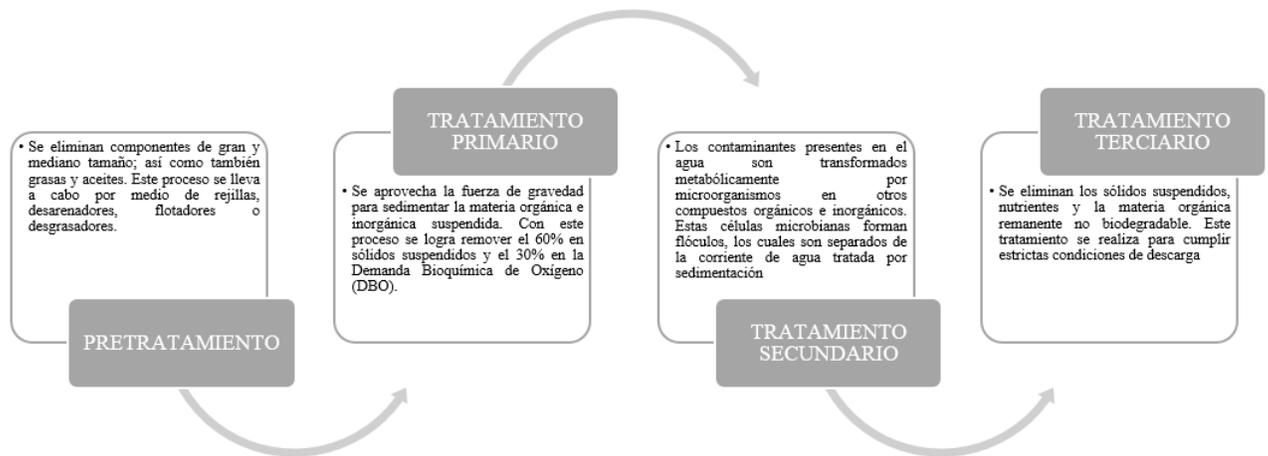


Figura 1. Proceso de tratamiento de aguas residuales en las PTAR.

II.1.2. Producción de lodos en las PTAR

El lodo es un subproducto resultante del tratamiento de aguas residuales, originado por actividades domésticas y productivas que generan volúmenes considerables de aguas residuales. La composición del lodo varía según las características del agua residual y el proceso de tratamiento aplicado. Un desafío importante en el manejo del lodo es su alto contenido de microorganismos patógenos, lo que demanda su estabilización (reducción de microorganismos patógenos) antes de su utilización o disposición final. (9) (10) (11).

La Tabla 1 presenta la composición de varios tipos de lodos generados durante el tratamiento de aguas residuales. Es importante destacar que las propiedades de estos lodos cambian según el proceso específico del cual provienen.

Tabla 1. Caracterización de los lodos generados en diferentes procesos de tratamiento de aguas residuales.

PARÁMETROS	LODOS PRIMARIOS	LODOS SECUNDARIOS	LODOS DIGERIDOS
pH	5.5 – 6.5	6.5 – 7.5	6.8 – 7.6
Contenido de Agua (%)	92 – 96	97.5 – 98	94 – 97
SSV (%SS)	70 – 80	80 – 90	55 – 65
Grasas (%SS)	12 – 14	3 – 5	4 – 12

Proteínas (%SS)	4 – 14	20 – 30	10 – 20
Carbohidratos (%SS)	8 – 10	6 – 8	5 – 8
Nitrógeno (%SS)	2 – 5	1 – 6	3 – 7
Fósforo (%SS)	0.5 – 1.5	1.5 – 2.5	0.5 – 1.5
Bacterias patógenas (NMP/100ml)	10 ³ - 10 ⁵	100 – 1000	10 – 100
Metales pesados (%SS)	0.2 – 2	0.2 – 2	0.2 – 2

SSV: Sólidos Suspendidos Volátiles, NMP: Número Más Probable, SS: Sólidos Suspendidos

Fuente: (Llivichuzca, 2016)

Los lodos se pueden clasificar siguiendo algunos criterios (12) (13) (14):

- A) Según el origen del efluente de la PTAR
- B) Según la etapa de depuración de las aguas residuales en la que se genere el lodo
- C) Según el tipo de tratamiento específico realizado en la línea de fangos.

II.1.3. Tratamiento de lodos residuales

El diseño de un sistema de tratamiento de lodos de desecho tiene como objetivo principal minimizar el contenido de agua, materia orgánica y microorganismos patógenos, así como reducir su potencial de traer vectores de enfermedades. Esto se hace con miras a la disposición final segura o la reutilización de los lodos.

Hay varios procesos convencionales que pueden ser parte de un tratamiento de lodos residuales, entre los cuales se pueden destacar (12) (15) (16):

- Espesamiento
- Estabilización o digestión
- Acondicionamiento
- Desinfección
- Deshidratación
- Secado térmico
- Reducción térmica

II.1.4. Microorganismos que se encuentran en los lodos residuales

El lodo de las plantas de tratamiento de aguas residuales puede contener organismos infecciosos (Ver tabla 2), cuya diversidad y cantidad dependen de varios factores, como la fuente del agua residual y el tipo de tratamiento. Este lodo a menudo contiene bacterias patógenas entéricas, generalmente excretadas en heces humanas. Estudios en diferentes lugares, como Asia, Canadá y EE. UU., han encontrado una amplia gama de géneros bacterianos en los lodos, influenciados por factores ambientales como la ubicación geográfica y la temperatura. En EE. UU., *Mycobacterium*, *Clostridium* y *Streptococcus* fueron patógenos comunes en lodos de plantas de tratamiento. En países tropicales, como México y Colombia, también se ha reportado la presencia de bacterias patógenas en los lodos (13).

Tabla 2: Microorganismos patógenos que pueden ser encontrados en lodos residuales.

MICROORGANISMOS	ESPECIES O FAMILIA
Bacterias	• <i>Bacillus anthracis</i>
	• <i>Campylobacter</i> spp.
	• <i>Clostridium botulinum</i>
	• <i>Clostridium perfringens</i>
	• <i>Escherichia coli</i>
	• <i>Leptospira</i> spp.
	• <i>Listeria monocytogenes</i>
	• <i>Mycobacterium</i> spp.
	• <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	• <i>Salmonella</i> spp.
	• <i>Shigella</i> spp.
	• <i>Staphylococcus</i>
	• <i>Streptococcus</i>
	• <i>Vibrio cholera</i>
	• <i>Yersinia enterocolitica</i>

Virus	<ul style="list-style-type: none"> ● Adenovirus ● Astrovirus ● Calicivirus ● Coronavirus ● Coxsackievirus ● Echovirus ● Hepatitis A-virus ● Parvovirus ● Poliovirus ● Reovirus ● Rotavirus ● Virus influenza ● Virus tipo Norwalk
Protozoos	<ul style="list-style-type: none"> ● <i>Entamoeba histolytica</i> ● <i>Giardia lamblia</i> ● <i>Toxoplasma gondii</i> ● <i>Sarcocystis</i>
Helmintos	<ul style="list-style-type: none"> ● <i>Ancylostoma duodenale</i> ● <i>Ascaris lumbricoides</i> ● <i>Diphyllobothrium latum</i> ● <i>Echinococcus granulosus</i> ● <i>Taenia saginata</i> ● <i>Taenia solium</i> ● <i>Toxocara canis</i> ● <i>Toxocara cati</i> ● <i>Trichuris trichura</i>
Hongos	<ul style="list-style-type: none"> ● <i>Aspergillus fumigatus</i> ● <i>Aspergillus</i> spp. ● <i>Epidermophyton</i> spp. ● <i>Geotrichum candidum</i> ● <i>Phialophora richardsii</i> ● <i>Trichophyton</i> spp.
Levaduras	<ul style="list-style-type: none"> ● <i>Candida albicans</i> ● <i>Candida guilliermondii</i> ● <i>Candida krusi</i> ● <i>Candida tropicalis</i> ● <i>Cryptococcus neoformans</i> ● <i>Trichosporon</i>

Fuente: (Llivichuzca, 2016)

II.2. *Salmonella* spp.

Salmonella spp. y *Escherichia* son géneros relacionados, compartiendo un 50% de homología en su ADN, aunque *Salmonella* spp. tiende a ser patógena en contraste con *Escherichia*. *Salmonella* spp. es una bacteria Gram negativa en forma de bastón, no formadoras de esporas, a menudo móviles mediante flagelos peritricos. Son aerobias-anaerobias facultativas, fermentan glucosa con producción de gas, no fermentan lactosa, reducen nitratos a nitritos y poseen características bioquímicas y serológicas definidas. La mayoría de las cepas, excepto *S. typhi*, son aerógenas y utilizan citrato como fuente de carbono. También realizan reacciones bioquímicas específicas como descarboxilación de lisina, arginina y ornitina, y producen sulfuro de hidrógeno. Presentan reacciones características en pruebas como rojo de metilo, Voges-Proskauer e Indol. Sin embargo, no desaminan fenilalanina, no hidrolizan urea ni licuan gelatina rápidamente en medios nutritivos. No producen DNAasa ni lipasa (14) (15).

Salmonella se subdivide en siete especies que se diferencian entre sí mediante la hibridación ADN/ADN o por las propiedades bioquímicas:

- *S. entérica*
- *S. salamae*
- *S. arizonae*
- *S. diarizonae*
- *S. houtenae*
- *S. bongori*
- *S. indica*

Cada especie del género *Salmonella* se subdivide en serovariedades con características inmunológicas basadas en tres antígenos superficiales: O de pared celular (somático), H flagelar y Vi (capa externa de polisacáridos) presentes en las cepas que causan fiebres tifoideas. Aunque existen más de 2300 serotipos en la

familia de *Salmonella*, *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium* son los más comunes en casos de salmonelosis.

Las bacterias del género *Salmonella* están presentes en afluentes de ríos contaminados, heces secas de animales y lodo residual en el ambiente, lo que conlleva un riesgo de diseminación. En grupos de animales destinados al consumo humano, estas bacterias pueden sobrevivir varios meses y dispersarse por el polvo, generando una contaminación ambiental acumulativa (17).

II.2.1. Características de crecimiento y supervivencia

El género *Salmonella* está compuesto por microorganismos resistentes y altamente adaptables a condiciones ambientales extremas. Se proporciona en la Tabla 3 las condiciones de temperatura y pH características para este género (17).

Tabla 3: Condiciones límites para el crecimiento de *Salmonella*.

CONDICIONES	MÍNIMO	ÓPTIMO	MÁXIMO
Temperatura °C	5.2	35 – 43	46.2
pH	3.8	7 – 7.5	9.5

Fuente: (Alfaro, 2018)

Las cepas mesófilas de *Salmonella typhimurium* expuestas a estrés térmico prolongado pueden desarrollar mutaciones que les permiten crecer a temperaturas más altas, como 54°C. Aunque el mecanismo exacto no está claro, se ha observado que dos mutaciones independientes habilitan a *S. typhimurium* para crecer activamente a 48°C y 54°C. La capacidad de adaptación fisiológica de *Salmonella* spp. demuestra su habilidad para multiplicarse en condiciones de pH extremadamente bajos (por debajo de 3.8) y altos (por encima de 9.5). La resistencia a medios ácidos también puede conferir resistencia a otras condiciones adversas, como el estrés térmico y osmótico elevado, así como la exposición a agentes antibacterianos (17).

II.2.2. Patogenicidad

Ciertas serovariedades de *Salmonella*, como *S. typhi*, están especializadas en hospedarse en humanos y suelen causar el síndrome septicémico-tifoideo. Otras serovariedades causan gastroenteritis en humanos. La fiebre tifoidea es común en países en desarrollo, mientras que, en países desarrollados, la gastroenteritis por *Salmonella* spp. es una causa importante de enfermedad transmitida por alimentos. Las serovariedades varían según la ubicación geográfica e incluyen *S. typhimurium*, *S. enteritidis* y otras. *Salmonella* sp se adhiere a células epiteliales del íleon y células M, que carecen de ciertas características estructurales, facilitando la entrada. Utiliza un mecanismo llamado "disparo" para invadir células del hospedero, causando cambios en el citoesqueleto y formando ondulaciones en la superficie. Proteínas efectoras como SipA, SopE, SopE2 y SopB están involucradas en estos procesos.

Las Islas de Patogenicidad (IP) como conjuntos extensos de genes que contribuyen a un fenotipo específico de virulencia, generalmente manifestándose en momentos clave del proceso infeccioso. En ciertas bacterias entéricas, la adquisición de una sola IP puede convertir un microorganismo comensal en patógeno, lo que puede explicar la emergencia de nuevos patógenos a partir de cepas no virulentas. Sin embargo, adquirir una IP no siempre garantiza la conversión a patógeno, ya que la virulencia depende del microorganismo receptor y su hospedador.

Las Islas de Patogenicidad de *Salmonella* spp. (SPIs) son grupos largos de genes en el cromosoma bacteriano que codifican determinantes para interactuar específicamente con el hospedador y son necesarios para la virulencia en modelos animales. Las SPIs, como otras islas genéticas, tienden a tener un contenido de GC menor que el resto del cromosoma y a menudo se insertan en genes que codifican ARNt. Esto sugiere que se adquirieron horizontalmente de fagos o plásmidos, permitiendo que especies rápidamente adquieran funciones de virulencia complejas. Algunas SPIs inestables muestran secuencias asociadas a elementos genéticos móviles como integrasas, transposasas y genes fágicos (16) (17) (40).

II.2.3. Genes para la identificación de *Salmonella* spp.

El gen *invA* es crucial para la virulencia de *Salmonella* spp. y está relacionado con la invasión del epitelio intestinal. También es utilizado por otros patógenos intestinales como *Shigella* sp. Está presente en todas las variedades invasoras y se encuentra codificado en el cromosoma bacteriano en la región conocida como Isla de Patogenicidad 1 de *Salmonella* spp. (SPI1). Esta región también codifica proteínas del sistema de secreción tipo III. El gen *invA* se utiliza ampliamente en la detección de *Salmonella* spp. en alimentos debido a su estabilidad genética (54).

Por otro lado, el gen *hilA* (*hiper invasive locus*) fue descubierto debido a su capacidad de conferir hiperinvasión a *Salmonella* sp cuando se sobreexpresa. Este gen codifica un regulador que activa promotores de genes como *inv*, *spa*, *sip* y *org*. También se localiza en la Isla de Patogenicidad I de *Salmonella* sp, la cual regula el sistema de secreción tipo III involucrado en la invasión de células intestinales. La detección del gen *hilA* en diversas serovariedades de *Salmonella*. sugiere similitud en la regulación de genes de virulencia. Un estudio usó PCR múltiple y convencional para diagnosticar *hilA*, demostrando alta especificidad (100%) y ventajas para la detección de contaminación por *Salmonella* spp. en huevos (40) (49).

II.2.4. Técnicas de detección de *Salmonella* spp.

La detección de *Salmonella* spp. puede realizarse mediante diferentes métodos. Dentro de los métodos tradicionales, se encuentran los cultivos en medios selectivos y la posterior caracterización de colonias mediante pruebas bioquímicas. Estos métodos requieren mayor inversión de tiempo para obtener los resultados. El método ideal debe tener una alta especificidad y al mismo tiempo ser rápido y económico (18).

II.2.4.1. Cultivos microbiológicos

Este procedimiento es utilizado para realizar detección, aislamiento e identificación de *Salmonella* spp..

Enriquecimiento selectivo: Se realiza en medios líquidos de enriquecimiento, los cuales promueven el crecimiento de bacterias compatibles con *Salmonella* spp. e inhiben la proliferación de bacterias intestinales y coliformes. Este paso vendría a ser la primera etapa para la detección de *Salmonella* spp.. Dentro de los medios líquidos, encontramos (18):

- **Caldo de Tetrionato:** Medio selectivo que provee fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y aminoácidos. También contiene sales biliares que inhiben microorganismos Gram positivos, además, el tetrionato es formado por la reacción del tiosulfato con la solución yodo-yoduro que inhibe la proliferación de bacterias de la flora fecal.
- **Caldo Selenito Cistina:** Contiene selenito de sodio que actúa como inhibidor de microorganismos Gram positivos y retarda el desarrollo de otras bacterias Gram negativas, como las coliformes. También contiene el aminoácido L-Cisteína, que modera el efecto tóxico del selenito, a la vez aporta radicales sulfuros y favorece el crecimiento de *Salmonella* spp.. Además, contiene peptonas que aportan aminoácidos, vitaminas y sales minerales esenciales. Finalmente, contiene lactosa que actúa como fuente de energía.

Medios selectivos: Esta etapa permite la diferenciación de colonias de *Salmonella* spp, deteniendo el crecimiento de otras bacterias. Dicha diferenciación radica en la composición de los medios, como por ejemplo la presencia de sustancias inhibitorias, que permiten aislar y diferenciar colonias de *Salmonella* spp.. con aspectos característicos.

Estos medios selectivos pueden ser: Agar MacConkey, Agar Salmonella-Shigella (SS), Agar Triple Azúcar Hierro (TSI), Agar Lisina Hierro (LIA), Agar Verde Brillante, Agar Entérico Hekton, entre otros, siendo los medios más empleados: Agar XLD, Agar SB (18)(19).

II.2.4.2. Pruebas bioquímicas

Dentro de las pruebas microbiológicas, las pruebas bioquímicas permiten determinar las características metabólicas de las bacterias a identificar. Entonces, tras haber obtenido,

en las pruebas microbiológicas, las presuntas colonias morfológicamente compatibles con *Salmonella* spp. se procede a realizar las diferentes pruebas bioquímicas (ver Tabla 4)

Cabe resaltar que al igual que las pruebas microbiológicas, estas pruebas también tienen un tiempo de espera prolongado para poder leer los resultados, que varía entre 18 a 48h. No obstante, algunas de estas pruebas bioquímicas pueden realizarse de forma rápida tras incubación de 2 a 6h (19).

Tabla 4. Presuntas colonias morfológicamente compatibles con *Salmonella* spp.

TEST	RESULTADO	
	NEGATIVO	POSITIVO
ONPG	Incoloro	Amarillo
ADH	Amarillo	Rojo/anaranjado
LDC	Amarillo	Rojo/anaranjado
ODC	Amarillo	Rojo/anaranjado
CIT	Verde pálido/Amarillo	Azul-verde/azul
H ₂ S	Incoloro/grisáceo	Depósito negro/fin liserado
URE	Amarillo	Rojo/anaranjado
TDA*	Amarillo	Marrón-rojizo
IND*	Incoloro/verde pálido/amarillo	Rosa
VP	Incoloro	Rosa/rojo
GEL	No difusión	Difusión pigmento negro
GLU	Azul/azul verdoso	Amarillo/amarillo grisáceo
MAN	Azul/azul verdoso	Amarillo
INO	Azul/azul verdoso	Amarillo

SOR	Azul/azul verdoso	Amarillo
RHA	Azul/azul verdoso	Amarillo
SAC	Azul/azul verdoso	Amarillo
MEL	Azul/azul verdoso	Amarillo
AMY	Azul/azul verdoso	Amarillo
ARA	Azul/azul verdoso	Amarillo

*Prueba inmediata

II.2.4.3. Métodos moleculares de identificación bacteriana

Dado que las pruebas microbiológicas y bioquímicas presentan ciertos inconvenientes en la identificación, ya que no todas las cepas de una misma especie presentan características homogéneas, sino que una misma cepa puede generar distintos patrones en ensayos repetidos, además, existen limitaciones en las bases de datos de dichas pruebas. Los métodos moleculares a través del tiempo se han desarrollado, siendo estos métodos más sensibles, específicos y de un tiempo de detección mucho más corto.

– Métodos de extracción y purificación del ADN

La aplicación de métodos moleculares empieza con la extracción de ADN íntegro y puro. La pureza y el rendimiento de los ácidos nucleicos extraídos son un elemento clave para el rendimiento en aplicaciones posteriores, tales como la PCR y la secuenciación molecular (19) (20).

Los kits de extracción de ADN genómico manual varían dependiendo del tipo de muestra. Entre ellas tenemos al kit de extracción Powersoil, que se utiliza para aislar altos rendimientos de ADN microbiano no puro de todo tipo de suelos, tales como lodos, arcilla, compost, etc. Por otro lado, tenemos el kit de extracción Promega, que se utiliza para aislar ADN microbiano a partir de cepas puras.

Durante la purificación del ADN, todas las muestras pasan por una serie de etapas en común de manipulaciones: lisis celular, limpieza, inactivación de nucleasas, unión de ácidos

nucleicos, lavado y elución. El ácido nucleico debe purificarse sin ningún contaminante, incluidas proteínas, ácidos nucleicos no deseados u otros componentes no deseados (20) (21).

– **Pruebas Moleculares - Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

A lo largo del tiempo se han desarrollado métodos más específicos y sensibles para detectar *Salmonella* spp. Siendo uno de estos métodos la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanca es copiada. Para esta reacción ocurra, es necesario la actividad de la enzima ADN polimerasa que trabaja a altas temperaturas y tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN de las células (22) (23) (24).

Los elementos necesarios para esta reacción son:

- El molde (ADN), la secuencia de ADN que se va a amplificar.
- La enzima ADN polimerasa, tiene como función sintetizar las nuevas cadenas de ADN que llevan la secuencia blanco.
- Los primers, son secuencias de oligonucleótidos que delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a esta.
- Los nucleótidos libres, desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, guanina y citosina) necesarias para la unión complementaria de las cadenas sintetizadas.
- El ión magnesio (Mg^{+}), un exceso de este ión tiende a producir amplificaciones inesperadas, mientras que concentraciones insuficientes generan un bajo rendimiento.
- Solución amortiguadora o buffer que regula el pH de la reacción para el funcionamiento de la ADN polimerasa, puede ser: Ácido acético, Tris, EDTA (TAE).
- H_2O (agua destilada), disolvente de la reacción.

Todos estos elementos van a interactuar en tres principales etapas de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión.

- **Desnaturalización:** Las cadenas de ADN son separadas debido a las altas temperaturas (95°C) durante 20 - 30 segundos. Una vez que las cadenas están separadas, se prosigue al siguiente paso.
- **Hibridación:** Los primers se alinean al extremo 3' de las cadenas obtenidas en la desnaturalización y se unen a su secuencia complementaria en el ADN molde, es importante que la temperatura de hibridación sea óptima, para ello debe oscilar entre 50 - 60°C.
- **Extensión:** El ADN polimerasa actúa sobre la cadena sintetizada (complementaria) a partir de la cadena molde y los primers. Dicha enzima inicia una reacción catalítica; es decir, sintetiza una nueva cadena de ADN complementaria a la hebra molde, se adicionan los dNTP's complementarios para formar las cadenas completas de ADN. Este paso se realiza a una temperatura de 72°C, puesto que es la temperatura óptima para cumplir su función de dicha enzima (25).

III. HIPÓTESIS

La técnica molecular de la PCR del gen *hila* es una prueba confirmativa más rápida y específica para la detección de *Salmonella* spp. que las pruebas microbiológicas con base a la normatividad mexicana para la disposición segura de lodos residuales.

IV. OBJETIVOS

IV.1. OBJETIVO GENERAL

- Demostrar que la PCR del gen *hila* es una herramienta técnicamente eficaz y alterna a las pruebas confirmativas (microbiológicas y bioquímicas) establecida por la norma mexicana, NOM-004-SEMARNAT-2002, para la detección de *Salmonella* spp. en lodos residuales.

IV.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar *Salmonella* spp. mediante las pruebas microbiológicas, en los agares selectivos XLD y SB, como también por medio de pruebas bioquímicas, API-20E, con base en los parámetros establecidos en la NOM-004-SEMARNAT-2002 en lodos residuales.
- Comparar la PCR del gen *hilA* con las pruebas microbiológicas para la confirmación de presencia de *Salmonella* spp. en lodos residuales.
- Identificar *Salmonella* spp., aisladas en agares XLD y SB, mediante la secuenciación del gen *16S rRNA*.

V. METODOLOGÍA

V.1. Marco legal

El marco legal de este proyecto está basado en la normatividad mexicana NOM-004-SEMARNAT-2002 en donde se siguieron los protocolos indicados para la identificación de *Salmonella* spp. en muestras de lodos y biosólidos.

V.2. Toma de muestra del lodo primario

La toma de muestra de lodo residual primario se realizó aproximadamente a las 11:00 am cada 15 días durante los meses de marzo y abril del año 2022 en la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) Cerro de la Estrella, ubicada en la colonia San Juan Xalpa en Iztapalapa, Ciudad de México-México. Se utilizó un balde esterilizado de 4L para sacar el lodo y llenar una galonera esterilizada de 20L, previamente se tamizó para retirar las partículas de grandes dimensiones, para ello se empleó un tamiz de 0.5 cm, con la finalidad de obtener una consistencia de lodo uniforme. A continuación, la galonera fue llevada al laboratorio del Instituto de Ingeniería Ambiental a condiciones de temperatura de 4°C para

su posterior tratamiento. Se tomaron un total de 4 muestras, las cuales se denominaron como lote 1, lote 2, lote 3 y lote 4.

V.3. Concentración del lodo

El lodo extraído de la PTAR se dejó sedimentar aproximadamente por 18h en el cuarto frío del Laboratorio del Instituto Ingeniería Ambiental a una temperatura de 4°C. Transcurridas las 18h, se retiró el sobrenadante con una jeringa y una manguera, posteriormente se almacenó en bidones.

V.4. Enriquecimiento y aislamiento de *Salmonella* spp. en agares selectivos

Las pruebas de enriquecimiento y aislamiento se realizaron siguiendo los protocolos para la cuantificación de *Salmonella* spp. de la Norma Mexicana NOM-004-SEMARNAT-2002. Sin embargo, es importante resaltar que algunas etapas del procedimiento se han adaptado para los fines de este proyecto. Como es el caso de las diluciones sucesivas, el cual es un procedimiento que se usa para la cuantificación de *Salmonella* spp. por el método de Número Más Probable (NMP), pero en este proyecto no se realizó la cuantificación, sólo la identificación.

El enriquecimiento se realizó inoculando 20 mL de lodo primario en 36 mL de Caldo de Tetrionato, luego se agitó suavemente utilizando un vortex a 800 rpm, seguidamente se incubó por 24 horas a 37 °C.

Luego, transcurrido el tiempo de incubación, se prepararon las diluciones sucesivas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}) transfiriendo 1 ml de Caldo de Tetrionato (previamente inoculado con lodo primario) en 9 ml de agua de dilución. En cada dilución se homogeneizó agitando ligeramente (800 rpm) con un vortex. Es importante efectuar la agitación siempre de la misma manera, para obtener resultados comparables y utilizar una pipeta estéril diferente, para cada una de las diluciones.

Como medio selectivo se utilizó el caldo de Selenito Cistina, para ello se adiciona por triplicado 1 ml de cada una de las diluciones preparadas en tubos conteniendo caldo selenito cistina correctamente etiquetados, seguidamente se incubó durante 24 horas a 41°C.

Finalizado este tiempo, se observó el cambio de coloración en la muestra. Un color anaranjado se considera resultado positivo o en caso contrario, negativo. A partir de los tubos positivos, se realizó el aislamiento de las colonias mediante la siembra por estría sobre la superficie de placas de los medios diferenciales selectivos Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) y Sulfito de Bismuto (SB), se incubó durante 24h a 37°C. Transcurrido el tiempo, se identificó aquellas colonias que presentaban una morfología típica de *Salmonella* spp. como también las que no.

En la siguiente Tabla 5 se muestra la interpretación de los resultados de colonias sospechosas para *Salmonella* spp. en medios selectivos según la NOM-004-SEMARNAT-2002

Tabla 5. Interpretación de los resultados de colonias sospechosas para *Salmonella* spp. en medios selectivos según la NOM-004-SEMARNAT-2002.

AGAR	CONTROL POSITIVO
SB	Colonias negras con o sin brillo metálico, rodeadas de un halo café que posteriormente se transforma en negro.
VB	Colonias rojas o rosas rodeadas del medio rojo.
XLD	Colonias rojas, generalmente presentan el centro negro.
SS	Colonias translúcidas, transparentes u opacas y algunas veces con centro negro.

V.5. Pruebas Bioquímicas

Es importante resaltar que las pruebas bioquímicas son comúnmente reconocidas como una parte integral de las pruebas microbiológicas, debido a su papel en la identificación y caracterización de microorganismos. En esta etapa, para la identificación bioquímica, con ayuda de un asa de siembra se recogió la muestra del agar selectivo donde creció la colonia sospechosa para *Salmonella* spp. y se sembró por estría en una placa que contenía agar nutritivo. Se incubó a $35^{\circ}\text{C}\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, esto con la finalidad de tener las colonias más aisladas.

Pasado este lapso, a partir de las colonias correctamente aisladas, se realizó la Tinción Gram, posteriormente se observó la coloración y las características morfo-coloniales de la cepa. En el caso de la obtención de bacterias Gram negativas, se procedió a realizar las pruebas bioquímicas (API-20E). Es importante mencionar que solo se realizaron 8 pruebas API-20E debido a un tema logístico. El criterio para escoger las cepas fue aquellas que en medios selectivos (agares XLD y SB) presentaban características no típicas para *Salmonella* spp., adicionalmente se escogieron 2 cepas con características morfológicas típicas de *Salmonella* spp..

Se suspendió el crecimiento obtenido en 5 mL de solución salina de NaCl 0.85%, seguidamente se homogeneizó. A continuación, se procedió a inocular en el sistema API-20E conforme la siguiente metodología:

- Los tubos de las pruebas CIT, VP, GEL fueron llenados hasta la cúpula con la suspensión bacteriana.
- Los demás tubos de las pruebas fueron llenados, pero no hasta las cúpulas.
- Las cúpulas de las pruebas ADH, LDC, ODC, URE y H₂S fueron llenadas con aceite mineral estéril para obtener anaerobiosis.
- Incubar a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18-24 h.

Pasado el tiempo de incubación se añadieron los reactivos en los tubos correspondientes y posteriormente se interpretaron los resultados, es decir se generó un código de identificación característico para cada especie.

Finalmente, para la determinación del género y especie de la cepa aislada, se consultó el Manual de API para su identificación.

V.6. Prueba Molecular

Las pruebas moleculares fueron realizadas en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Ingeniería Ambiental, el cual tiene ambientes diferenciados y adecuados para cada experimento.

Se inició la prueba aumentando la biomasa de las cepas aisladas inoculando en tubos con 10 mL de caldo BHI con ayuda de un asa de siembra; posteriormente, los tubos se incubaron a 36°C de 24 horas. Se extrajo ADN a partir de 1 ml de cultivo en caldo BHI con el Kit de Extracción Promega siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se midió la pureza del ADN recientemente extraído utilizando el equipo Nanodrop. Una vez que se verificó la obtención de una buena calidad y cantidad del ADN con el equipo ya mencionado se procedió a realizar la PCR mediante el siguiente procedimiento:

- Se encendió la luz UV de la cabina de flujo laminar para PCR entre 20-30 minutos, conteniendo micropipetas, puntas de 10 uL, 20 uL y 1000 uL, tubos Eppendorf de 0.2 mL, guantes, marcador indeleble y demás materiales necesarios para la prueba molecular.
- Transcurrido el tiempo indicado, se procedió a esterilizar con alcohol la superficie para evitar cualquier contaminación como posibles trazas de ADN.
- A continuación, se procedió a descongelar los reactivos. Una vez que estos fueron descongelados, se mantuvieron en coolers con hielo para evitar la degradación de dichos reactivos.
- Se preparó la PCR en la cabina de flujo laminar con puntas con filtro esterilizados de la siguiente manera: En un tubo Eppendorf esterilizado (un tubo Eppendorf por cada muestra de ADN) se adicionaron 5 uL de GoTaq Green Master Mix, 0.5 uL de cada primers (forward y reverse), 2 uL del ADN de la muestra y 2 uL de Agua MiliQ. Luego se sometió a una agitación ligera utilizando el vórtex.
- Los tubos Eppendorf preparados fueron colocados en el termociclador y se programó a las condiciones ya establecidas para el gen a usar.

- En tanto se realizaba la amplificación, se preparó el gel de agarosa. Para ello se pesó 0,25 g de agarosa, disolviéndose en 25 ml de Tris Acetato-EDTA (TAE) para lograr una concentración del 1%. A continuación, se calentó en un microondas por 1 minuto para que se disuelva, observando que no se formen burbujas.
- Se esperaron unos minutos para que la solución de agarosa se enfriara un poco y se le adicionó 2,5 uL de gel red, reactivo fluorescente que se intercala entre los pares de bases de los ácidos nucleicos. Es importante almacenar dicho gel lo menos expuesto a la luz.
- Se consideró el ADN de *Salmonella Enterica* 35664 como control positivo, *Escherichia coli* ATCC 25922 como control negativo y como control de reactivo Agua MiliQ. Una vez realizado la amplificación en el termociclador, se llevó el gel a la cámara de electroforesis conteniendo el tampón TAE para poder llevar a cabo la electroforesis (luego de haber colocado las muestras y el marcador de peso molecular) a 115 voltios por 20 minutos.
- Transcurrido el tiempo indicado, se transportó el gel de agarosa al fotodocumentador, en donde se pudo realizar la visualización del ADN amplificado. En la PCR del gen *hila* se observó un amplicón aproximadamente a 200 pb, mientras que para la PCR del gen *16S rRNA*, se observó un amplicón a 1500 pb.

PCR del gen *hila*

Para realizar la PCR del gen *hila*, se utilizó el GoTaq-Green Master Mix y los primers: *hila*-Forward y *hila*-Reverse, los cuales fueron diseñados en un estudio previo (52), siendo la secuencia de los primers la siguiente:

- *hila* F: 5' CAACCTACGACTCATACA 3'
- *hila* R: 5' GCGTAATTGATCCATGAG 3'

Las condiciones usadas para la amplificación del gen *hila* fueron las siguientes:

Tabla 6. Condiciones para la amplificación del gen *hila*.

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Desnaturalización inicial	95	5
Desnaturalización	95	1
Alineación	65	1
Extensión	72	1
Extensión final	72	10
Número total de ciclos	30	

PCR del gen *16S rRNA*

La PCR *16S-rRNA* se realizó a partir de los ADN extraídos, se amplificó el gen *16S-rRNA* utilizando los primers 27F y 1492R, los cuales fueron diseñados en un estudio previo (53), siendo la secuencia de los primers la siguiente:

- 27F: 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'
- 1492R: 5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3'

El experimento se realizó bajo los siguientes parámetros:

Tabla 7. Condiciones para la amplificación del gen *16S-rRNA*

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Desnaturalización inicial	95	7
Desnaturalización	95	1
Alineación	55	1
Extensión	72	1
Extensión final	72	10
Número total de ciclos	30	

A continuación, se realizó una corrida de amplicones obtenidos en la PCR *16S-rRNA* en gel de Agarosa. Se purificó los productos de PCR usando el QIAquick PCR Purification Kit-QIAGEN siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, los productos de PCR purificados fueron enviados a servicios externos en Macrogen-Korea para su secuenciación por el método de Sanger utilizando el primer 1942R.

Una vez que se obtuvo las secuencias se siguió el siguiente procedimiento:

- Se analizó la calidad de las secuencias mediante la visualización de los cromatogramas con el software BioEdit 7.0.5.3.
- Las secuencias fueron exportadas en formato fasta y reunidas en un bloc de notas.
- Se realizó un alineamiento de secuencias con el Software Clustal X 2.1 y se exportó el alineamiento en formato fasta.
- Las secuencias alineadas fueron recortadas en los extremos con el software SeaView 5.0.1; en el extremo izquierdo se recortaron alrededor de 15 pb y en el extremo derecho alrededor de 150 pb que corresponden a picos no específicos según el paso 1. Las secuencias alineadas-recortadas fueron exportadas en formato fasta.
- Se eliminaron los gaps de las secuencias alineadas-recortadas con el software Clustal X 2.1 y se exportó las secuencias en formato fasta.
- Se realizó la asignación taxonómica de las secuencias recortadas sin gaps mediante la herramienta en línea BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) disponible en <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

VI. RESULTADOS

Los resultados descritos a continuación muestran los resultados de los 4 lotes de lodos primarios evaluados. En la determinación de *Salmonella* spp. con caldo de Selenito-Cistina, se observó un vire a color naranja, lo cual fue indicativo de la posible presencia de *Salmonella* spp. en lodos primarios. A partir de estos resultados obtenidos, se pudo aislar 23 cepas, es decir las pruebas microbiológicas nos permitieron identificar 23 colonias mediante el uso de 2 medios de cultivos selectivos para *Salmonella* spp. (XLD y SB). En el medio XLD se logró aislar 13 cepas, de las cuales se pudo identificar que 5 cepas presentan características morfológicas de *Salmonella* spp. las 8 cepas restantes presentan características morfológicas desconocidas. Y en medio SB se aisló 10 cepas, de las cuales se pudo identificar que 7 presentan características morfológicas de *Salmonella* spp. las 3 cepas restantes presentan características morfológicas desconocidas. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Resultados de las pruebas microbiológicas de los 4 lotes de lodos primarios.

N° Lote	N° Cepa	Medio	Morfología macroscópica
LOTE 1	C1	XLD	Colonia roja con centro negro. Típica de Salmonella
LOTE 1	C2	XLD	Colonia puntiforme, color crema. No típica para Salmonella
LOTE 1	C3	XLD	Colonia puntiforme, color crema más claro. No típica para Salmonella
LOTE 1	C4	SB	Colonia negra con brillo metálico. Típico de Salmonella
LOTE 2	C1	SB	Colonia negra con brillo metálico. Típico de Salmonella
LOTE 2	C2	XLD	Colonia roja con centro negro. Típica de Salmonella
LOTE 2	C3	XLD	Colonia circular, color crema con brillo. No típica para Salmonella
LOTE 2	C4	XLD	Colonia puntiforme, color crema. No típica para Salmonella
LOTE 2	C5	SB	Colonia negra sin brillo metálico. Típico de Salmonella
LOTE 2	C6	SB	Colonia negra con bordes irregulares. No típico de Salmonella
LOTE 3	C1	XLD	Colonia roja con centro negro. Típica de Salmonella
LOTE 3	C2	XLD	Colonia puntiforme, color crema. No típica para Salmonella
LOTE 3	C3	XLD	Colonia circular, color crema con brillo. No típica para Salmonella
LOTE 3	C4	SB	Colonia negra con brillo metálico y halo café. Típico de Salmonella
LOTE 3	C5	SB	Colonia puntiforme marrón claro. No típico de Salmonella
LOTE 3	C6	SB	Colonia negra con brillo metálico. Típico de Salmonella
LOTE 3	C7	XLD	Colonia roja con centro negro. Típica de Salmonella
LOTE 3	C8	XLD	Colonia circular, color crema con brillo. No típica para Salmonella
LOTE 4	C1	SB	Colonia negra sin brillo metálico. Típico de Salmonella

LOTE 4	C2	SB	Colonia puntiforme marrón claro. No típico de Salmonella
LOTE 4	C3	SB	Colonia negra con brillo metálico. Típico de Salmonella
LOTE 4	C4	XLD	Colonia roja con centro negro. Típica de Salmonella
LOTE 4	C5	XLD	Colonia circular, color crema con brillo. No típica para Salmonella

Por otro lado, se caracterizaron taxonómicamente 8 cepas mediante el uso de una prueba bioquímica miniaturizada API-20E. Los resultados se presentan en la Tabla 9. La cepa C2 del Lote 1, C2 y C3 del Lote 2 y C4 del Lote 3 fueron identificadas como *Salmonella* spp., a diferencia de la C4 y C6 del Lote 2 y C5 del Lote 3 fueron identificadas como *Providencia stuartii* y C5 del Lote 4 fue identificada como *Proteus mirabilis*.

Tabla 9. Resultados obtenidos en la prueba bioquímica miniaturizada API-20E realizada en las 8 cepas.

N° Lote	N° Cepa	Medio	Identificación taxonómica API-20E
LOTE 1	C1	XLD	--
LOTE 1	C2	XLD	<i>Salmonella</i> spp.
LOTE 1	C3	XLD	--
LOTE 1	C5	SB	--
LOTE 2	C1	SB	--
LOTE 2	C2	XLD	<i>Salmonella</i> spp.
LOTE 2	C3	XLD	<i>Salmonella</i> spp.
LOTE 2	C4	XLD	<i>Providencia stuartii</i>
LOTE 2	C5	SB	--
LOTE 2	C6	SB	<i>Providencia stuartii</i>
LOTE 3	C1	XLD	--
LOTE 3	C2	XLD	--
LOTE 3	C3	XLD	--
LOTE 3	C4	SB	<i>Salmonella</i> spp.
LOTE 3	C5	SB	<i>Providencia stuartii</i>
LOTE 3	C6	SB	--
LOTE 3	C7	XLD	--
LOTE 3	C8	XLD	--
LOTE 4	C1	SB	--
LOTE 4	C2	SB	--
LOTE 4	C3	SB	--
LOTE 4	C4	XLD	--
LOTE 4	C5	XLD	<i>Proteus mirabilis</i>

VI.1. Prueba de amplificabilidad del ADN

El ADN utilizado para la prueba de especificidad para *Salmonella* spp. de la PCR del gen *hliA* fue previamente extraído de 15 bacterias resistentes a antibióticos (no *Salmonella* spp.) aisladas de lodos primarios de la PTAR Cerro de la Estrella. Debido a que el ADN se encontraba en conservación a -20 °C. Primero se realizó una prueba para conocer si aún era amplificable; para ello, se realizó una PCR del gen *16S rRNA* utilizando los primers 342F y 907R (ver Figura 2)

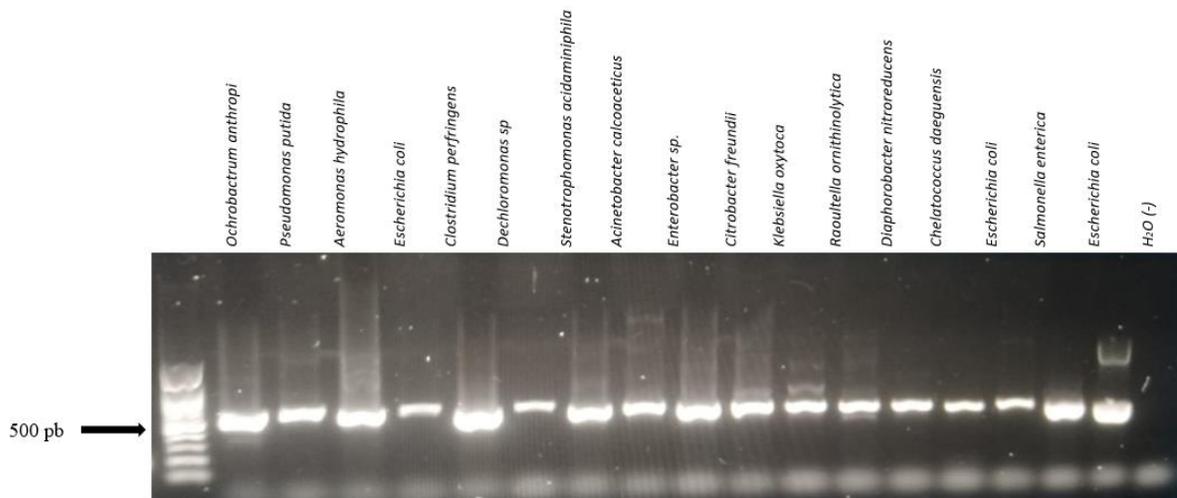


Figura 2. Prueba de amplificabilidad del ADN para géneros distintos a *Salmonella* spp..

VI.2. Prueba de especificidad de la PCR del gen *hila*

Posteriormente se realizó la PCR con los primers *hila* F: 5' CAACCTACGACTCATACA 3' y *hila* R: 5' GCGTAATTGATCCATGAG 3'.

Como se muestra en la Figura 3, el gen *hila* amplifica para *Salmonella enterica* (donde se observa una banda muy marcada) y no para otras especies bacterianas aisladas a partir de los lodos primarios, aunque, se observa una banda tenue para *Diaphorobacter nitroreducens*.

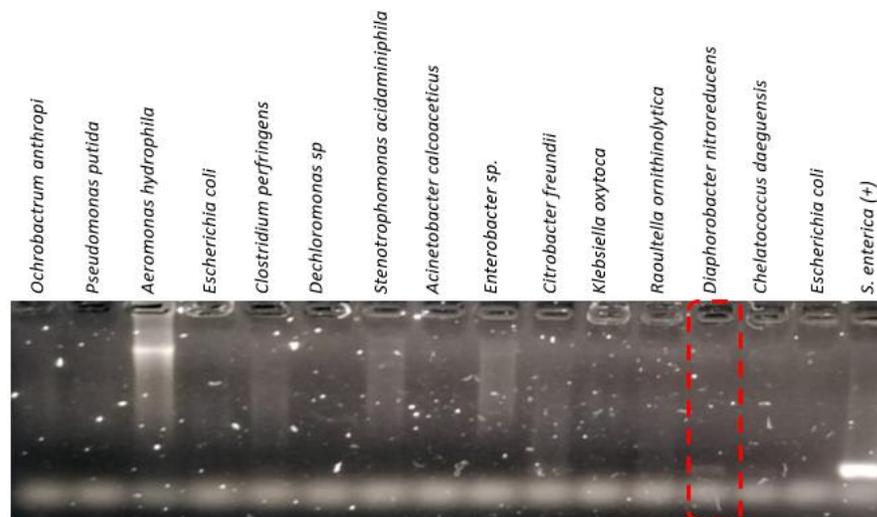


Figura 3. Prueba de especificidad de la PCR del gen *hila*.

VI.3. PCR del gen *hila* para las cepas bacterianas aisladas de lodo primario

Los resultados de la PCR del gen *hila* realizada a las cepas aisladas en las pruebas microbiológicas, provenientes de lodos primarios, se presentan en la Figura 4, se encuentra señalado por 4 recuadros de diferentes colores, siendo el recuadro rojo para identificar a las cepas obtenidas del lote 1, el recuadro naranja para identificar a las cepas del lote 2, el recuadro verde para identificar a las cepas del lote 3 y el recuadro celeste para identificar a las cepas del lote 4.

Debido a los primers usados para el gen *hila* en esta prueba, para todas aquellas cepas que amplifican se observa una única banda (amplicón) de una longitud de 200 pb (Figura 4). Respecto a los resultados de amplificación, se observaron 3 tipos: bandas que amplifican,

bandas que no amplifican y bandas que amplifican tenuemente, esta última es considerada como un resultado negativo. En el lote 1, se observa que todas las cepas (C1, C2, C3 y C4) amplifican. En el lote 2, amplifica para las cepas C1, C2 y C3, en las cepas C4 y C6 amplifican tenuemente, y en cuanto a la C5, no se le realizó la PCR. Respecto al lote 3, las cepas C1, C3, C4, C5 y C7 amplifican, a diferencia de la cepa C2 que no amplifica, a la C6 no se le realizó la prueba, la C8 amplifica tenuemente. En cuanto al lote 4, las cepas C1, C3 y C4 amplifican, la cepa C2 no amplifica y la C5 amplifica tenuemente. Finalmente, se observa un amplicón para el control negativo, *E. coli*.

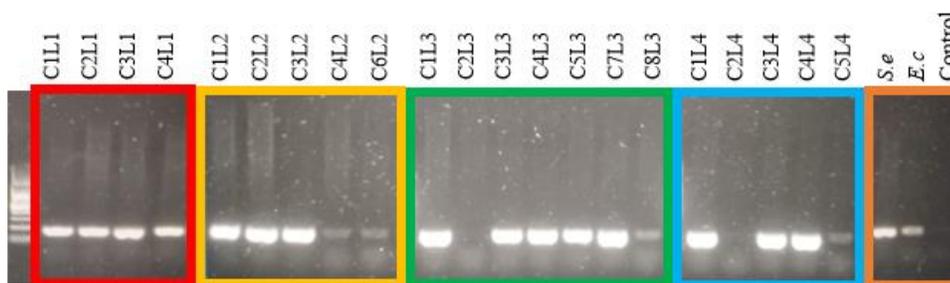


Figura 4. PCR del gen *hila* para las cepas bacterianas aisladas de LP. Los recuadros rojo, amarillo, verde y azul representan los lotes 1, 2, 3 y 4 respectivamente.

VI.4. Caracterización taxonómica mediante la secuenciación del gen *16S-rRNA*

Las asignaciones taxonómicas se realizaron con base a los alineamientos con Nucleotide BLAST de NCBI. Además, los porcentajes de identidad de estos últimos fueron altos; del 94 al 100%. Los resultados se observan en la Tabla 10.

Tabla 10. Resumen de resultados de pruebas microbiológicas, bioquímicas y moleculares.

N° Lote	N° Cepa	Medio	Morfología macroscópica	Tinción Gram	Identificación taxonómica API-20E	PCR con el gen <i>hlyA</i>	Identificación taxonómica basados en el gen <i>16S rRNA</i>	Porcentaje de identidad (%) BLAST	Foto de la colonia
LOTE 1	C1	XLD	Colonia roja con centro negro. Típica de <i>Salmonella</i>	-	--	Amplifica	--	--	
LOTE 1	C2	XLD	Colonia puntiforme, color crema. No típica para <i>Salmonella</i>	-	<i>Salmonella</i> spp.	Amplifica	<i>Salmonella enterica</i>	100.00	
LOTE 1	C3	XLD	Colonia puntiforme, color crema más claro. No típica para <i>Salmonella</i>	-	--	Amplifica	<i>Salmonella enterica</i>	98.98	
LOTE 1	C4	SB	Colonia negra con brillo metálico. Típico de <i>Salmonella</i>	-	--	Amplifica	--	--	
LOTE 2	C1	SB	Colonia negra con brillo metálico. Típico de <i>Salmonella</i>	-	--	Amplifica	--	--	
LOTE 2	C2	XLD	Colonia roja con centro negro. Típica de <i>Salmonella</i>	-	<i>Salmonella</i> spp.	Amplifica	<i>Salmonella enterica</i>	100.00	
LOTE 2	C3	XLD	Colonia circular, color crema con brillo. No típica para <i>Salmonella</i>	-	<i>Salmonella</i> spp.	Amplifica	<i>Salmonella enterica</i>	100.00	
LOTE 2	C4	XLD	Colonia puntiforme, color crema. No típica para <i>Salmonella</i>	-	<i>Providencia stuartii</i>	No amplifica	<i>Providencia</i> spp.	100.00	
LOTE 2	C5	SB	Colonia negra sin brillo metálico. Típico de <i>Salmonella</i>	-	--	--	--	--	
LOTE 2	C6	SB	Colonia negra con bordes irregulares. No típico de <i>Salmonella</i>	-	<i>Providencia stuartii</i>	No amplifica	<i>Providencia</i> spp.	100.00	
LOTE 3	C1	XLD	Colonia roja con centro negro. Típica de <i>Salmonella</i>	-	--	Amplifica	<i>Salmonella enterica</i>	96.25	
LOTE 3	C2	XLD	Colonia puntiforme, color crema. No típica para <i>Salmonella</i>	-	--	No amplifica	<i>Enterobacter</i> sp.	96.02	
LOTE 3	C3	XLD	Colonia circular, color crema con brillo. No típica para <i>Salmonella</i>	-	--	Amplifica	<i>Providencia stuartii</i>	94.07	
LOTE 3	C4	SB	Colonia negra con brillo metálico y halo café. Típico de <i>Salmonella</i>	-	<i>Salmonella</i> spp.	Amplifica	<i>Salmonella</i> sp.	99.90	
LOTE 3	C5	SB	Colonia puntiforme marrón claro. No típico de <i>Salmonella</i>	-	<i>Providencia stuartii</i>	Amplifica	<i>Providencia stuartii</i>	96.97	
LOTE 3	C6	SB	Colonia negra con brillo metálico. Típico de <i>Salmonella</i>	-	--	--	--	--	
LOTE 3	C7	XLD	Colonia roja con centro negro. Típica de <i>Salmonella</i>	-	--	Amplifica	<i>Salmonella enterica</i>	97.75	
LOTE 3	C8	XLD	Colonia circular, color crema con brillo. No típica para <i>Salmonella</i>	-	--	No amplifica	<i>Providencia stuartii</i>	98.78	
LOTE 4	C1	SB	Colonia negra sin brillo metálico. Típico de <i>Salmonella</i>	-	--	Amplifica	<i>Salmonella</i> sp.	99.90	
LOTE 4	C2	SB	Colonia puntiforme marrón claro. No típico de <i>Salmonella</i>	-	--	No amplifica	<i>Providencia stuartii</i>	99.90	
LOTE 4	C3	SB	Colonia negra con brillo metálico. Típico de <i>Salmonella</i>	-	--	Amplifica	<i>Salmonella enterica</i>	100.00	
LOTE 4	C4	XLD	Colonia roja con centro negro. Típica de <i>Salmonella</i>	-	--	Amplifica	--	--	
LOTE 4	C5	XLD	Colonia circular, color crema con brillo. No típica para <i>Salmonella</i>	-	<i>Proteus mirabilis</i>	No amplifica	<i>Proteus mirabilis</i>	99.80	

VI.5. Análisis estadístico Kappa

El análisis estadístico Kappa se realizó tomando como referencia a la combinación del API-20E y del secuenciamiento del ADN del *16S rRNA* con la PCR con el gen *hlyA*, en las cuales la variable fue la detección de *Salmonella* spp. y la no detección de *Salmonella* spp. Se analizó un total de 17 cepas de los 4 lotes (Ver Tabla 11).

Tabla 11. Análisis estadístico Kappa

		PCR <i>hlyA</i>		
		<i>Salmonella</i> spp.	No <i>Salmonella</i> spp.	Total
API-20E y PCR <i>16S rRNA</i>	<i>Salmonella</i> spp.	9	0	9
	No <i>Salmonella</i> spp.	2	6	8
	Total	11	6	17

Los resultados del análisis estadístico fueron los siguientes:

- $Kappa = 0.761$
- $SE \text{ de } kappa = 0.154$
- *Intervalo de confianza del 95%: De 0.458 a 1.000*

VII. DISCUSIÓN

El contenido de *Salmonella* en los lodos primarios se debe a que las aguas residuales provienen de las aguas residuales domésticas; es decir, *Salmonella* spp. está presente en varios alimentos de consumo cotidiano como carne de pollo, res, cerdo, huevos, frutas, vegetales e incluso en los alimentos procesados (26) (27) y las heces de pacientes con Salmonellosis, ya que la bacteria se aloja en el intestino de animales y humanos y es expulsado a través de éstas, generando su propagación (50) (51). Al realizar nuestras actividades cotidianas desechamos las aguas servidas a los desagües con una elevada carga bacteriana (incluida *Salmonella* spp.), estas aguas contaminadas llegan a las PTAR, donde el tratamiento primario de estas implica la sedimentación de la materia suspendida en las aguas y genera lodos primarios con microorganismos patógenos como *Salmonella* spp.

Respecto a los resultados obtenidos en los cultivos con el caldo de selenito cistina. Para todos los lotes del lodo primario, se obtuvo un cambio de coloración de color amarillo pálido a naranja con presencia de turbidez, este resultado se interpreta como un resultado positivo para la presencia de *Salmonella* spp. o alguna otra bacteria que se vea favorecido por ese medio. Es importante destacar que este cambio de color no es específico para *Salmonella* spp., debido a que otras bacterias también pueden producir sulfuro de hidrógeno y generar un resultado positivo (35). Además, es importante resaltar que las muestras de lodo primario son muestras que contienen diversas bacterias (39). En ese sentido, es posible que un cambio de color (resultado positivo) no sea exclusivo *Salmonella* spp., sino también pueden estar presente otras bacterias productoras y no productoras de sulfuro de hidrógeno (32) (33) (34).

Los agares XLD y SB son agares selectivos (28); es decir, favorecen el crecimiento de *Salmonella* spp.. El agar XLD es un medio selectivo diferencial, que se utiliza para aislar y diferenciar patógenos entéricos Gram negativos como *Salmonella* spp. y *Shigella* spp., de modo similar, el agar SB es un medio selectivo que sirve para aislar e identificar preliminarmente *Salmonella* spp. a partir de aguas residuales, suministros de agua, alimentos y otros productos sospechosos de contener estos patógenos. En ese sentido, se esperaría que en estos dos medios se inhibiera el crecimiento de otras bacterias a excepción de *Salmonella* spp. y *Shigella* spp.(36)(37), sin embargo, al evaluar las características de forma y color

(morfología macroscópica), ver Tabla 10, se observó que crecieron bacterias con fenotipos distintos a los esperados para *Salmonella* spp. (Ver la Tabla 5). Estos resultados nos indicaron que los agares XLD y SB no fueron tan selectivos y favorecen el crecimiento de otras bacterias, incluso hay estudios en los que el agar XLD es usado para cultivar bacterias del género *Proteus* (38).

La PCR del gen *hila* se pudo haber realizado directamente del lodo primario utilizando el kit de extracción PowerSoil, sin embargo en experimentos previos se demostró que no amplificaba el mencionado gen, probablemente debido a que la cantidad de ADN en el medio no era lo suficiente para ser detectado por la PCR, es por ello que se optó por el enriquecimiento de las cepas en medios como Caldo de Tetrionato y Selenito Cistina, tal y como lo indica la NOM-004-SEMARNAT-2002.

Previo a la prueba de la PCR del gen *hila* a las muestras obtenidas, se realizó la prueba de amplificabilidad (Figura 2) y la prueba de especificidad (Figura 3) para tener un control negativo y positivo adicionalmente. Las muestras de ADN no pertenecen a ninguna bacteria obtenida en los lotes 1, 2, 3 y 4, sino que fueron obtenidas a partir de lodo primario en un proyecto de caracterización de análisis metataxonómica "Removal of bacterial pathogens and antibiotic resistance bacteria by anaerobic sludge digestion with thermal hydrolysis pre-treatment and alkaline stabilization post-treatment" (39), es por ello que se realizó la prueba de PCR del gen *hila* para comprobar la amplificabilidad del ADN de dichas bacterias. Esta prueba dio como resultado que los ADNs de las bacterias obtenidas en el proyecto mencionado aún se encontraban amplificables y viables para realizar la prueba de especificidad con el gen *hila*. Estos resultados se muestran en la Figura 3, donde se observa una banda ligera que pertenece a la especie *Diaphorobacter nitroreducens*, cabe mencionar que dicha especie no se manipuló junto al ADN de *Salmonella* spp. a diferencia de este proyecto.

Respecto a la banda tenue que se observa para *Diaphorobacter nitroreducens*, indica que el gen *hila* estaba presente en el ADN de esta especie, por lo que nos da un indicio de la baja especificidad de dicho gen para serovares de *Salmonella*, sin embargo, la literatura científica menciona que este gen pertenece a la Isla de Patogenicidad 1 (SPI-1) de *Salmonella* spp., por

lo que no podría encontrarse en otras bacterias. Cabe resaltar que las muestras de los estudios mencionados no fueron tan contaminadas como lo son los lodos residuales (40) (41) (42). Adicionalmente, en la literatura científica no se encontró información de que este gen *hila* forme parte del ADN de *Diaphorobacter nitroreducens*, lo que nos da sospecha que probablemente el gen *hila* haya sido adquirido por transferencia horizontal de genes por estas bacterias ya que estas muestras fueron extraídas de lodos primarios, en las cuales se pueden encontrar una variedad de bacterias incluidos *Salmonella* spp. Otra posibilidad es que el ADN de estas bacterias encontradas hayan sido contaminadas con el gen *hila*.

Los resultados que se muestran en la Figura 4, las cuales corresponden a la PCR del gen *hila*, muestran que amplifica para las cepas C1-L1, C2-L1, C3-L1, C4-L1, C1-L2, C2-L2, C3-L2, C1-L3, C2-L3, C3-L3, C4-L3, C5-L3, C7-L3, C1-L4, C2-L4, C3-L4 y C4-L4. Estas bandas que amplifican indican que el gen *hila* estaba presente en *Salmonella* spp. e incluso en bacterias identificadas como *Providencia stuartii*, y *Proteus mirabilis*. No es de esperar que el gen *hila* se encuentren en bacterias que no son *Salmonella*, debido a que este gen forma parte de la Isla de Patogenicidad 1 en bacterias de la especie *Salmonella enterica* y sus diferentes serovares, también se observa que amplifica nuestro control negativo (*E. Coli*); una de las razones probables de este resultado puede ser debido a que en alguna etapa del procedimiento experimental haya habido una contaminación, ya que la PCR es una técnica muy sensible (49). Dicha contaminación pudo haber sucedido durante la preparación de la reacción de PCR, una de las fuentes de contaminación pudo provenir directamente de las muestras biológicas analizadas. Probablemente al trabajar con el ADN de aquellas cepas que no son *Salmonella* spp. conjuntamente con el ADN de *Salmonella* spp., esta última pudo contaminar el ADN de las demás muestras, generando amplicones inespecíficos; como es el caso de las bandas tenues de las cepas: C4-L2, C6-L2, C8-L3 y C5-L4, estas bandas probablemente se deban a una posible contaminación con una muestra mínima de material genético de *Salmonella* spp. hacia otras cepas diferentes a *Salmonella* spp. previo a la PCR. La literatura científica menciona que las bandas tenues pueden deberse a diversos factores como por ejemplo la baja concentración del material genético, la degradación del ADN o que el ADN se haya salido por un extremo del gel (55). En esta investigación, probablemente se deba a una baja concentración de material genético, esto debido a una contaminación con el

gen *hilA* hacia otras muestras que no contienen este gen. Es por ello que en esta investigación, las bandas tenues han sido consideradas como resultados negativos.

Es importante el uso de guardapolvos y manguillas desechables, así como guantes de talla adecuada para evitar una contaminación cruzada en esta etapa del procedimiento experimental. Además, se deben abrir cuidadosamente los microtubos para evitar una posible contaminación.

Otra posibilidad del porqué se encontró el gen *hilA* en otras bacterias que no son *Salmonella* spp. es porque probablemente el gen *hilA* pudo haber sido transferido horizontalmente desde *Salmonella* hacia las otras bacterias. Cabe precisar que los lodos son muestras que contienen gran diversidad de bacterias, en las cuales hay mucha interacción entre las bacterias y el medio, es decir se encuentra en un estado dinámico. Estudios recientes han demostrado que cuando las bacterias sufren estrés físico-químico, las membranas celulares se vuelven más permeables, lo que genera que se promueva la transferencia horizontal de genes (43) (44) (45) (46) (47). En ese sentido, es probable que este fenómeno haya ocurrido con el gen *hilA*, ya que se encontró este gen en bacterias que no son *Salmonella* spp.. Adicionalmente, es importante resaltar que el gen *hilA*, es parte de las islas genómicas (SPI) de *Salmonella* spp., adquiridas por microorganismos a través de transferencia genética horizontal. Estas SPI se encuentran en organismos patógenos, pero no en organismos no patógenos de especies relacionadas. Estas se caracterizan por ser elementos genéticos móviles de entre 10 y 200 kb, y pueden contener genes que contribuyen a la virulencia del patógeno (48).

Algunos estudios de PCR del gen *hilA* para la detección de *Salmonella* spp. en muestras de alimentos como huevos de aves de corral y carnes, así como muestras de sangres (diagnóstico de fiebre entérica por *Salmonella* spp.) han mostrado una alta sensibilidad y especificidad (41) (49) (52). A diferencia del presente estudio, en el cual se trabajó con muestras de lodos residuales, las cuales se encontraban muy contaminadas y con una elevada carga bacteriana. Adicionalmente, otro estudio propone la PCR del gen *invA* para la detección de *Salmonella* spp., en este caso el estudio fue realizado en muestras de lechugas, en donde sugiere el uso del gen *invA* para futuros estudios de detección de *Salmonella* spp. en alimentos y agua contaminada, la cual es de interés para la salud pública (54).

Por otro lado, los resultados que se muestran en el Anexo 1, sobre la PCR del gen *16S rRNA*, nos permitió identificar a las 17 cepas bacterianas aisladas de lodos primarios. Existen 3 cepas interesantes (C2 y C3 del Lote 1 y C3 del Lote 2), las cuales en el análisis morfológico de las cepas en las pruebas microbiológicas mostraron que aparentemente no se trataba de *Salmonella* spp., sin embargo, en la PCR del gen *16S rRNA*, estas cepas fueron identificadas como *Salmonella* spp.. Un resultado parecido se obtuvo en la prueba bioquímica y la PCR del gen *hila*, que identificó a las cepas C2 del Lote 1 y C3 del Lote 2 como *Salmonella* spp.. Este resultado refuerza la hipótesis de que las pruebas microbiológicas no son tan confiables para la identificación de *Salmonella* spp. en lodos primarios.

Adicionalmente, la PCR del gen *16S rRNA* nos brindó información sobre el porcentaje de identidad de las cepas. Un porcentaje de identidad bajo es indicativo de que probablemente se encuentre contaminada con el ADN de otras bacterias. Como se muestra en el Anexo 3, en el segmento de ADN 270 a 320 pb de la secuencia del gen *16S rRNA* de una cepa encontrada en un lodo tratado que fue ajeno a este estudio, donde se observan picos inespecíficos (traslapados entre sí), lo cual da un indicio que estamos tratando con más de un ADN bacteriano. A diferencia de lo que se observa en el anexo 4, en el segmento de ADN de 270 a 320 pb de la secuencia del gen *16S rRNA* de C2-L1, en donde se observan picos más uniformes y definidos, lo cual es un reflejo del alto porcentaje de identidad (94% - 100%) como se obtuvieron en este estudio.

Son necesarios más estudios que demuestren la transferencia horizontal de genes en lodos primarios durante el tratamiento de aguas residuales, como es el caso del gen *hila*, así como investigaciones (secuenciación genómica) que demuestren que dicho gen puede estar contenido en el ADN de bacterias como *Providencia stuartii* y *Proteus mirabilis*.

Finalmente, los resultados obtenidos al realizar el análisis estadístico Kappa tomando como referencia a la combinación del API-20E y del secuenciamiento del ADN del *16S rRNA* con la PCR con el gen *hila* se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.761, este valor del coeficiente de correlación nos indica que hay un acuerdo sustancial entre ambas técnicas para detectar *Salmonella* spp. en lodos residuales. Un valor de Kappa >0.8 indicaría un acuerdo perfecto entre ambas técnicas, por el contrario un valor de Kappa <0.000 nos indicaría un

desacuerdo total entre ambas técnicas. El resultado obtenido en este análisis estadístico Kappa ($Kappa = 0.761$) es coherente, ya que las pruebas bioquímicas API-20E y la PCR son específicas para la detección de *Salmonella* spp, además esta última técnica, incluso es más sensible y específica para detectar la presencia de *Salmonella* spp. en una muestra de lodo residual mediante la detección del gen *hila* en una muestra de material genético. (49).

VIII. CONCLUSIONES

- Las pruebas microbiológicas, en los medios selectivos agar XLD y SB, nos permitieron identificar preliminarmente *Salmonella* spp. Estos resultados fueron confirmados mediante las pruebas bioquímicas API-20E.
- La PCR del gen *hila* es una prueba alterna confirmativa a las pruebas microbiológicas para la detección de *Salmonella* spp. en muestras de lodo primario.
- El análisis estadístico de Kappa entre las pruebas API-20E combinado con el secuenciamiento del ADN *16S rRNA* y la PCR con el gen *hila* para identificar *Salmonella* spp. en lodos primarios mostró una correlación sustancial.
- La secuenciación del gen *16S rRNA* a partir de las cepas aisladas en agares XLD y SB permitió identificar *Salmonella* spp. y otras bacterias encontradas, con un elevado grado de porcentaje de identidad.

IX. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar estudios de repetibilidad para identificar las posibles causas (contaminación, transferencia horizontal, entre otros) del porqué se encontró el gen *hilA* en el ADN de bacterias que no son *Salmonella* spp.
- Se recomienda realizar la secuenciación genómica del ADN de cada cepa identificada en muestras de lodo primario, con el fin de corroborar la presencia del gen *hilA* dentro del ADN de dichas cepas.
- Se recomienda ser meticulosos durante el desarrollo de los procedimientos experimentales. Además, es importante el uso de mandiles y manguillas desechables, guantes de talla adecuada, de igual manera se recomienda trabajar en ambientes diferenciados y adecuados para cada procedimiento con el objetivo de disminuir el riesgo de contaminación de la muestra.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amador-díaz A, Veliz-lorenzo E, Bataller-venta M. Tratamiento de lodos, generalidades y aplicaciones. Rev CENIC Ciencias Químicas. 2015;46:1–10.
2. Uggetti E, Ferrer I, Nielsen S, Arias C, Brix H, García J. Characteristics of biosolids from sludge treatment wetlands for agricultural reuse. Ecol Eng [Internet]. 2012;40:210–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.12.030>
3. WWAP (Programa Mundial de Evaluación de los Recursos Hídricos de las Naciones Unidas). AGUAS RESIDUALES EL RECURSO DESAPROVECHADO [Internet]. UNESCO. 2017 [cited 2021 Oct 12]. p. 16–16. Available from: [https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/9A13A8A4E16D102F05258175006A9AD1/\\$FILE/1__15.247647s.pdf](https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/9A13A8A4E16D102F05258175006A9AD1/$FILE/1__15.247647s.pdf)
4. US EPA. Biosolids Generation , Use , and Disposal in The United States. US EPA Munic Ind Solid Waste Div. 1999;EPA530-R-9(September).
5. MVCS. Resolución Ministerial 093-2018-vivienda Protocolo de Monitoreo de Biosolidos [Internet]. Vol. martes 13, El Peruano. 2018. Available from: <http://nike.vivienda.gob.pe/dgaa/Archivos/RM-093-2018-VIVIENDA.pdf>
6. DOF - Diario Oficial de la Federación [Internet]. Gob.mx. [citado el 30 de junio de 2023]. Disponible en:

https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=691939&fecha=15/08/2003

7. Ruiz MJ, Ramallo G, Colello R, Villalobo C, Monteavaro C, Etcheverría A, et al. Diferentes métodos para aislamiento y detección de *Salmonella* spp. en canales porcinos. Rev Colomb Biotecnol. 2018;20(2):117–23.
8. OEFA, editor. Fiscalización Ambiental en Aguas Residuales. https://www.oefa.gob.pe/?wpfb_dl=7827; 2014.
9. Lopez EGH. Evaluación del proceso de tratamiento de agua residual y sus lodos como subproducto, en una planta compacta de depuración por lodos activados. [Arequipa]: Universidad Nacional De San Agustín De Arequipa; 2020.
10. Pérez E. Tratamiento de lodos residuales procedentes de plantas de tratamiento de aguas residuales mediante procesos electroquímicos para la disminución de metales pesados (Pb). Univ Politécnica Sales - Ecuador [Internet]. 2016;114. Available from: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/12048/1/UPS-CT005871.pdf>
11. López Moreno LM, López Santillán JA, Rivera Ortiz P. Lodos residuales de origen doméstico: disminución de coliformes fecales y *Salmonella* spp. Rev Cienc UANL. 2018 Sep 1;21(91).

12. Sobrados Bernardos L. PRODUCCIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LOS FANGOS - PDF Free Download [Internet]. 2017 [cited 2021 Oct 12]. p. 1–27. Available from: <https://docplayer.es/40208252-Produccion-y-caracteristicas-de-los-fangos.html>
13. Markis F, Baudez JC, Parthasarathy R, Slatter P, Eshtiaghi N. Rheological characterisation of primary and secondary sludge: Impact of solids concentration. *Chem Eng J.* 2014 Oct 1;253:526–37.
14. Fibras y Normas de Colombia S.A.S. LODOS ACTIVADOS: DEFINICION, CLASIFICACION Y TIPOS, TÉRMINOS Y DEFINICIONES [Internet]. 2019 [cited 2021 Nov 19]. Available from: <https://blog.fibrasynormasdecolombia.com/lodos-definicion-clasificacion-tipos/>
15. Villalba Pastrana ME. Remoción de patógenos (Coliformes fecales, Salmonella) en lodos de purga municipal mediante pretratamiento térmico. 2012;142.
16. Torre García A. Diseño y análisis ambiental de una planta de tratamiento de aguas residuales en la ciudad de Huaraz. Pontif Univ Católica del Perú. 2018;104.
17. Alfaro-Mora R. Aspectos relevantes sobre Salmonella sp en humanos. *Rev Cuba Med Gen Integral* [Internet]. 2018 [citado el 28 de julio de 2023];34(3):110–22. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-

21252018000300012

18. Gonzalez Pedraza J, Pereira Sanandres N, Soto Varela Z, Hernández Aguirre E, Villarreal Camacho J. Aislamiento microbiológico de Salmonella spp. y herramientas moleculares para su detección. Salud Uninorte [Internet]. 2014 [citado el 28 de julio de 2023];30(1):73–94. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-55522014000100009
19. González de Buitrago JM. Técnicas microbiológicas básicas. En: González de Buitrago JM, editor. Técnicas y Métodos de Laboratorio Clínico. Elsevier; 2010. p. 457–73.
20. Díaz O. G, Rosadio A. R, Marcelo M. G, Chero O. A, Jiménez A. R, Reyna W. I, et al. Evaluación de una Técnica de PCR-Múltiple para la Detección Rápida de Salmonella Typhimurium y Enteritidis en Cuyes (Cavia porcellus) Naturalmente Infectados. Rev Investig Vet Peru [Internet]. 2017 [citado el 28 de julio de 2023];28(3):713. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172017000300025
21. Abdulridha FM, Kudhair BK. Evaluation of a rapid and reliable multiplex PCR assay for the detection of Salmonella Typhi in stool samples. Gene Rep [Internet].

- 2023;33(101812):101812. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452014423000742>
22. Pusterla N, Naranatt P, Swadia H, Winfield L, Hartwig A, Barnum S, et al. Multi-centered field evaluation of a Salmonella spp. Point-of-care PCR assay using equine feces and environmental samples. J Equine Vet Sci [Internet]. 2023;126(104538):104538. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080623003283>
23. Deng K, Wang SS, Kiener S, Smith E, Chen K-S, Pamboukian R, et al. Multi-laboratory validation study of a real-time PCR method for detection of Salmonella in baby spinach. Food Microbiol [Internet]. 2023;114:104299. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002023000862>
24. Lunara Santos Pavelquesi S, Carolina Almeida de Oliveira Ferreira A, Fernandes Silva Rodrigues L, Maria de Souza Silva C, Cristina Rodrigues da Silva I, Castilho Orsi D. Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella spp. Isolated from chilled chicken meat commercialized at retail in Federal District, Brazil. J Food Prot [Internet]. 2023;86(9):100130. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0362028X2306814X>
25. Pedrosa Amado A. Reacción en cadena de la polimerasa. Arch méd Camagüey [Internet]. 1999 [citado el 1 de agosto de 2023];3(2):0–0. Disponible en:

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02551999000200011

26. Méndez IA, Andrés Badillo C, Ortiz Parra G, Álvaro A, Microbiólogo B. Caracterización microbiológica de Salmonella en alimentos de venta callejera en un sector [Internet]. Unam.mx. [citado el 2 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://biblat.unam.mx/hevila/MedicasUIS/2011/vol24/no1/3.pdf>
27. RENAPRA (Red Nacional de Protección de Alimentos), editor. Salmonelosis. Vol. 1. Anmat;
28. Gonzalez Pedraza J, Pereira Sanandres N, Soto Varela Z, Hernández Aguirre E, Villarreal Camacho J. Aislamiento microbiológico de Salmonella spp. y herramientas moleculares para su detección. Salud Uninorte [Internet]. 2014 [citado el 16 de agosto de 2023];30(1):73–94. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-55522014000100009
29. L. L, H. A, L. B, V. G, R. T, L. F, et al. Resistencia térmica de Salmonella. Efecto del pH y la actividad del agua [Internet]. Gov.ar. [citado el 2 de agosto de 2023]. Disponible en: https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/33792/CONICET_Digital_Nro.9a753453-d55c-45d2-8f9d-b26be961910d_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y

30. Oliart-Ros RM, Sánchez-Otero MG, Manresa-Presas Á. Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. *CienciaUAT* [Internet]. 2016 [citado el 2 de agosto de 2023];11(1):79. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-78582016000200079
31. Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento [Internet]. Gob.pe. [citado el 2 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/vivienda/normas-legales/12403-24-2017-vivienda>
32. Britania L. Selenito Cistina Caldo. 2021 mar.
33. Caycedo Lozano L, Corrales Ramírez LC, Trujillo Suárez DM. Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. *Nova* [Internet]. 2021 [citado el 2 de agosto de 2023];19(36):49–94. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702021000100049
34. Loddeke M, Schneider B, Oguri T, Mehta I, Xuan Z, Reitzer L. Anaerobic Cysteine Degradation and Potential Metabolic Coordination in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* [Internet]. 2017;199(16). Disponible en:

<http://dx.doi.org/10.1128/jb.00117-17>

35. Álvarez Márquez DE. Principales microorganismos sulfato reductores (MSR) de reactores anaerobios alimentados con efluentes ácidos, una revisión bibliográfica. *Rev Colomb Biotecnol* [Internet]. 2022;24(1):62–76. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v24n1/0123-3475-biote-24-01-62.pdf>
36. Bismuth sulphite agar (modified Wilson & Blair medium) (dehydrated) [Internet]. Thermofisher.com. [citado el 16 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/CM0201B>
37. Ucv.ve. [citado el 16 de agosto de 2023]. Disponible en: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Agar_XLD.pdf
38. Ahmed DA. Prevalence of *Proteus* spp. in some hospitals in Baghdad City [Internet]. Iasj.net. [citado el 16 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://www.iasj.net/iasj/download/0c607a6739ed6862>
39. Cuetero-Martínez Y, Flores-Ramírez A, De los Cobos-Vasconcelos D, Aguirre-Garrido JF, López-Vidal Y, Noyola A. Removal of bacterial pathogens and antibiotic resistance bacteria by anaerobic sludge digestion with thermal hydrolysis pre-

- treatment and alkaline stabilization post-treatment. *Chemosphere* [Internet]. 2023;313(137383):137383. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653522038760>
40. Libros [Internet]. Unam.mx. [citado el 17 de agosto de 2023]. Disponible en: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap4/>
41. Vista de Desarrollo y evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando la secuencia del gen hila para diagnóstico de fiebre entérica por *Salmonella* spp [Internet]. *Revistabiomedica.org*. [citado el 17 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/1265/1380>
42. Cardona-Castro N, Restrepo-Pineda E, Correa-Ochoa M. Detection of hila gene sequences in serovars of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2002 [citado el 17 de agosto de 2023];97(8):1153–6. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/NggXysRCXLVSqm4pXDyCZNK/?lang=en>
43. Al-Gashgari B, Mantilla-Calderon D, Wang T, de los Angeles Gomez M, Baasher F, Daffonchio D, et al. Impact of chemicals and physical stressors on horizontal gene transfer via natural transformation. *Nat Water* [Internet]. 2023 [citado el 17 de agosto de 2023];1(7):635–48. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s44221-023->

00110-8

44. Brouwer MSM, Roberts AP, Hussain H, Williams RJ, Allan E, Mullany P. Horizontal gene transfer converts non-toxigenic *Clostridium difficile* strains into toxin producers. *Nat Commun* [Internet]. 2013 [citado el 17 de agosto de 2023];4(1):1–6. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/ncomms3601>
45. Chen X, Du Z, Song X, Wang L, Wei Z, Jia L, et al. Evaluating the occurrence frequency of horizontal gene transfer induced by different degrees of heavy metal stress. *J Clean Prod* [Internet]. 2023;382(135371):135371. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652622049459>
46. Xu Y, Liu Q, Meng G, Dong C. Horizontal gene transfer of *Ccycy* contributes to virulence of mycoparasite *Calcarisporium cordycipiticola* by interacting with a host heat shock protein. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2023;242(124927):124927. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813023018214>
47. Moura de Sousa J, Lourenço M, Gordo I. Horizontal gene transfer among host-associated microbes. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2023;31(4):513–27. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1931312823001221>

48. 14.1C: Islas de patogenicidad y factores de virulencia [Internet]. LibreTexts Español. Libretxts; 2022 [citado el 17 de agosto de 2023]. Disponible en: [https://espanol.libretxts.org/Biologia/Microbiolog%C3%ADa/Libro%3A_Microbiolog%C3%ADa_\(Sin_1%C3%ADmites\)/14%3A_Patogenicidad/14.1%3A_Entrada_al_Anfitri%C3%B3n/14.1C%3A_Islas_de_patogenicidad_y_factores_de_virulencia](https://espanol.libretxts.org/Biologia/Microbiolog%C3%ADa/Libro%3A_Microbiolog%C3%ADa_(Sin_1%C3%ADmites)/14%3A_Patogenicidad/14.1%3A_Entrada_al_Anfitri%C3%B3n/14.1C%3A_Islas_de_patogenicidad_y_factores_de_virulencia)
49. Pérez CM, Sánchez MM, Henao S, Cardona-Castro NM. Estandarización y evaluación de dos pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa para el diagnóstico de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* en huevos. Arch Med Vet [Internet]. 2008 [citado el 18 de agosto de 2023];40(3):235–42. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2008000300003
50. Godínez-Oviedo A, Tamplin ML, Bowman JP, Hernández-Iturriaga M. *salmonella enterica* in Mexico 2000–2017: Epidemiology, antimicrobial resistance, and prevalence in food. Foodborne Pathog Dis [Internet]. 2020;17(2):98–118. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2019.2627>
51. Cerón López J. Evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana de *Salmonella* spp y *Shigella* spp aisladas de materia fecal de cerdos y humanos en una región de Morelos. [Morelos-México]: UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS; 2021.
52. Liu Y, Cao Y, Wang T, Dong Q, Li J, Niu C. Detection of 12 common food-borne bacterial pathogens by TaqMan real-time PCR using a single set of reaction

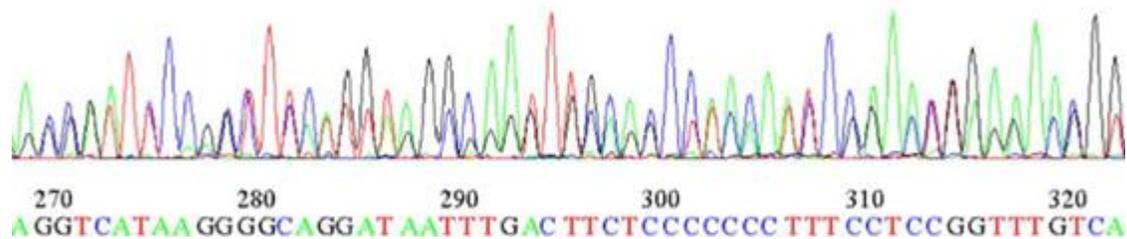
- conditions. *Front Microbiol* [Internet]. 2019;10. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.00222>
53. Pootakham W, Mhuantong W, Yoocha T, Sangsrakru D, Kongkachana W, Sonthirod C, et al. Taxonomic profiling of Symbiodiniaceae and bacterial communities associated with Indo-Pacific corals in the Gulf of Thailand using PacBio sequencing of full-length ITS and 16S rRNA genes. *Genomics* [Internet]. 2021;113(4):2717–29. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.06.001>
54. Chacón L, Barrantes K, García C, Rosario A. Estandarización de una PCR para la detección del gen *invA* de *Salmonella* spp. en lechuga. *Bol Soc Venez Microbiol* [Internet]. 2010 [citado el 3 de mayo de 2024];30(1):18–23. Disponible en: https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562010000100005
55. Kuhn R, Herráez A. Resolución de problemas [Internet]. Uah.es. [citado el 19 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://biomodel.uah.es/an/plasmido/0/probl.htm>

XI. ANEXOS

Anexo 1. Resultado de la secuenciación del ADN de las cepas encontradas por el método de Sanger utilizando el gen *16S rRNA*.

CEPA	NOMBRE CIENTÍFICO	Q. cover (%)	Identidad (%)	Long. de secuencia (pb)
C2-L1	<i>Salmonella enterica</i>	100	100	985
C3-L1	<i>Salmonella enterica</i>	100	98.98	985
C2-L2	<i>Salmonella enterica</i>	99	100	977
C3-L2	<i>Salmonella enterica</i>	100	100	977
C4-L2	<i>Providencia sp.</i>	100	100	977
C6-L2	<i>Providencia sp.</i>	99	100	977
C1-L3	<i>Salmonella enterica</i>	94	96.25	1000
C2-L3	<i>Enterobacter sp.</i>	99	96.02	1000
C3-L3	<i>Providencia stuartii</i>	96	94.07	998
C4-L3	<i>Salmonella sp.</i>	100	99.9	1020
C5-L3	<i>Providencia stuartii</i>	96	96.97	1000
C7-L3	<i>Salmonella enterica</i>	97	97.75	1027
C8-L3	<i>Providencia stuartii</i>	96	98.78	1000
C1-L4	<i>Salmonella sp.</i>	100	99.9	966
C2-L4	<i>Providencia stuartii</i>	99	99.9	987
C3-L4	<i>Salmonella entérica</i>	99	100	1010
C5-L4	<i>Proteus mirabilis</i>	100	99.8	1010

Anexo 2. Segmento de ADN de 270 a 320 pb de la secuencia del gen *16S rRNA* de una cepa extraída de lodo tratado.



Anexo 3. Segmento de ADN de 270 a 320 pb de la secuencia del gen *16S rRNA* de C2-L1

