



## Identificación bioquímica de los diversos tipos de *Salmonella* en el Área Natural Protegida “Las Musas” en Manuel Doblado, Guanajuato

Ramírez-Corona Ana Brenda<sup>1</sup>, Márquez-Lucio Maria Azucena<sup>2</sup>, Alejo-Iturvide Francisco<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato | is15111602@es.itesi.edu.mx

<sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato | mamarquez@itesi.edu.mx

<sup>3</sup>Departamento de Licenciatura en Biología | frajelo@itesi.edu.mx

### Resumen

La determinación de microorganismos patógenos en agua es de gran importancia a través de parámetros microbiológicos para garantizar la inocuidad del medio. En el presente trabajo se realizó la determinación de *Salmonella* y sus especies en muestras de agua en el Área Natural Protegida “Las Musas” en Manuel Doblado, Guanajuato usando como referencia la NOM-210-SSA1-2014. Se registró la presencia de especies patógenas de *Salmonella* en la mayoría de las muestras del cuerpo hídrico. Entre ellas se encontró *Salmonella typhi* con origen presuntivo de escorrentías fecales de ganado aledaño a la zona de estudio que abastece a las comunidades de agua, siendo de vital importancia puesto que en la zona se desempeñan actividades tanto recreativas como ecoturismo, lo que significa la potencial generación de enfermedades gastrointestinales en los visitantes o habitantes de la zona de estudio.

### Introducción

Los parámetros microbiológicos de calidad del agua son de gran relevancia desde el punto de sector salud debido a su impacto en la proliferación de enfermedades



(principalmente gastrointestinales) y su posible diseminación en el ambiente y la población, siendo foco de infección en las comunidades o zonas afectadas.

Bajo el presente proyecto se seleccionó *Salmonella spp.* como parámetro microbiológico de calidad del agua debido a su distribución en el ambiente y su patogenia en la población y cantidad de casos presentados. *Salmonella spp.* es un género de bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, asociados a enfermedades entéricas y siendo causa importante de mortalidad en lactantes, niños y ancianos (Parra, 2002). En el caso de las especies de mayor relevancia clínica destacan las especies: *typhi*, *paratyphi* y *entérica*, teniendo una estimación del 99% de los casos de salmonelosis son causados por *Salmonella entérica* subespecie I (Betancor & Yim, 2012).

Para elucidar el comportamiento y patogenia de las especies de *Salmonella spp.* Se desglosará la determinación en el cuerpo de agua del ÁNP Las Musas, a lo largo de un año con base a la NOM-210-SSA1-2014 y las especificaciones que se indica, una vez establecida la presencia, se obtiene una identificación bioquímica de las especies cotejando los resultados con manuales previamente establecidos, cada una de las cepas provenientes de diferentes cultivos con la finalidad de comparar resultados y características morfológicas, bioquímicas y tipos de colonias macroscópicas en medios como *Salmonella-Shigella* o xilosa-lisina-desoxicolato. Finalmente se realizará un antibiograma usando diferentes concentraciones de diversos antibióticos que brinda una particularidad de resistencia o sensibilidad de las especies ante los antibióticos y principalmente posibles resistencias desarrolladas, siendo de carácter principal una bacteria permanente que una bacteria emergente en la zona.

## Objetivos

1. Realizar la determinación de *Salmonella spp.* en muestras de agua usando la norma NOM-210-SSA1-2014.
2. Realizar la identificación bioquímica de las especies aisladas de *Salmonella* en muestras de agua.



3. Obtener el grado de sensibilidad de las especies de *Salmonella* bajo diferentes concentraciones de diversos antibióticos usando antibiogramas como referencia.
4. Realizar muestreos en diferentes estaciones del año que permitan establecer dinámica de comportamiento y presencia.

### **Justificación**

Las Musas es un ÁNP ubicada en el municipio de Manuel Doblado, Guanajuato. Es considerada un área de uso sustentable; cuenta con una flora de 218 especies registradas y una fauna de 149 especies registradas (Instituto de Ecología del Estado). En el ÁNP se realizan actividades recreativas como ecoturismo y/o pesca; su cuerpo hídrico abastece comunidades aledañas por lo que la determinación de las especies patógenas de *Salmonella* como foco de infección es de vital importancia para obtener los principales orígenes de enfermedades entéricas en la zona y poder elucidar cuáles son los principales períodos en los cuales se manifiesta una mayor concentración a través de un año.

### **Metodología**

#### *1. Muestreo*

El procedimiento para el muestreo de agua en el ÁNP se realizó con base a los procedimientos establecidos en la Norma Oficial mexicana NOM-014-SSA1-1993 “Procedimientos sanitarios para el muestreo de agua para uso y consumo humano en sistemas de abastecimiento de agua públicos y privados” (Diario Oficial de la Federación, 1994).

La toma de muestra se realizó en 7 puntos representativos al cuerpo hídrico de los cuales en cada punto se tomó 125 mL de agua en un frasco previamente esterilizado y con flujo a contracorriente con enjuagues hasta en 3 ocasiones previas a la toma de muestra, siendo posteriormente transportadas a 2-6°C en un periodo menor a 8 horas a su procesamiento para la determinación de *Salmonella spp.*



## 2. Determinación de la presencia de *Salmonella* en agua

Para la determinación de *Salmonella spp.* en muestras de agua se realizó con base a la Normas Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014 “Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos” (Diario Oficial de la Federación, 2015).

El procedimiento de la norma indica un pre-enriquecimiento de la muestra usando como medio Caldo Lactosado de cual se preparan 125 mL de medio en un frasco para su esterilización y posteriormente se inoculan 25 mL de muestra obteniendo una dilución 1:10, para su incubación a una temperatura de  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $24\text{h} \pm 2\text{h}$ . Posteriormente se realiza un enriquecimiento de la muestra empleando como medio Caldo Tetrionato y Caldo Selenito Cistina, inoculando 1 mL de muestra por cada 9 mL de medio en un tubo para su posterior incubación a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $24\text{h} \pm 3\text{h}$ .

Posteriormente se realiza el aislamiento e identificación de las especies, resemebrando de las muestras de Caldo Tetrionato y Caldo Selenito Cistina a Agar XLD (Xilosa Lisina Desoxicolato) y Agar SS (*Salmonella- Shigella*) mediante técnica de estría masiva bajo las mismas condiciones de incubación que Caldo Tetrionato, todo el procedimiento descrito previamente en la determinación de *Salmonella* se realizó para cada una de las muestras analizadas.

## 3. Identificación bioquímica de las especies de *Salmonella spp.*

Para la identificación bioquímica de las especies de *Salmonella* en muestras de agua se realizaron las pruebas bioquímicas de:

- Agar Triple Hierro Azúcar (TSI): medio preparado en pico de flauta en tubo y sembrado en estría simple
- Agar Hierro Lisina (LIA): medio preparado en pico de flauta en tubo y sembrado en estría simple
- Agar hierro Kligler (KIA): medio preparado en pico de flauta en tubo y sembrado en estría simple



- Agar Sulfato Indol Motilidad (SIM): medio preparado en tubo y sembrado con punción

Cada una de las muestras se incubaron a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $24\text{h} \pm 3\text{h}$  para su posterior interpretación de resultados y usando como referencia la tabla 1 de comparación de crecimiento con las obtenidas en el presente trabajo (Organización Mundial de la Salud (OMS), 2004).

*Tabla 1. Cotejo de resultados para pruebas bioquímicas de identificación de especies de Salmonella*

MEDIO / ESPECIE	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Salmonella paratyphi A</i>	<i>Salmonella paratyphi B o C</i>
<b>TSI - (color rojo)</b>	Superficie/Profundidad: reacción alcalina (color rojo) /reacción ácida (color amarillo)	Superficie/Profundidad: reacción alcalina (color rojo) /reacción ácida (color amarillo)	Superficie/Profundidad: reacción alcalina (color rojo) /reacción ácida (color amarillo)
	Producción de gas (-)	Producción de gas (-)	Producción de gas (+)
	Producción de ácido sulfhídrico $\text{H}_2\text{S}$ (+) (negro débil)	Producción de ácido sulfhídrico $\text{H}_2\text{S}$ (-)	Producción de ácido sulfhídrico $\text{H}_2\text{S}$ (+): (negro débil)
<b>LIA - (color púrpura rojizo - tenue)</b>	Descarboxilación de Lisina (fondo) (+): color púrpura	Superficie/Profundidad: reacción alcalina (color púrpura) /reacción ácida (color amarillo)	Superficie/Profundidad: reacción alcalina (color púrpura) /reacción alcalina (color púrpura)
	Desaminación de Lisina	Producción de gas (-)	Producción de gas



	(-): color púrpura		(+)
	Producción de ácido sulfhídrico H <sub>2</sub> S (+): (color negro)	Producción de ácido sulfhídrico H <sub>2</sub> S (-)	Producción de ácido sulfhídrico H <sub>2</sub> S (+): (negro débil)
<b>KIA - (color rojo)</b>	Superficie/Profundidad: reacción alcalina (color rojo) /reacción ácida (color amarillo)	Superficie/Profundidad: reacción alcalina (color rojo) /reacción ácida (color amarillo)	Superficie/Profundidad: reacción alcalina (color rojo) /reacción ácida (color amarillo)
	Producción de gas (-)	Producción de gas (-)	Producción de gas (+)
	Producción de ácido sulfhídrico H <sub>2</sub> S (+): (negro débil)	Producción de ácido sulfhídrico H <sub>2</sub> S (-)	Producción de ácido sulfhídrico H <sub>2</sub> S (+): (negro débil)
<b>SIM</b>	Motilidad (+): presencia de turbidez o crecimiento más allá de la línea de siembra	Motilidad (+): presencia de turbidez o crecimiento más allá de la línea de siembra	Motilidad (+): presencia de turbidez o crecimiento más allá de la línea de siembra
	Indol (-): el color del reactivo permanece incoloro-amarillento	Indol (-): el color del reactivo permanece incoloro-amarillento	Indol (-): el color del reactivo permanece incoloro-amarillento
	Producción de ácido sulfhídrico H <sub>2</sub> S (+): ennegrecimiento del medio	Motilidad positiva, indol positivo y sulfuro negativo	Motilidad positiva, indol y sulfuro positivos



#### 4. Prueba de sensibilidad de antibióticos para *Salmonella* por antibiograma

Se empleó el método de Kirby-Bauer (Bernal & Guzmán, 1984), realizando un antibiograma de discos, el cual consiste en preparar medio Mueller-Hinton con un pH de 7.2-7.4. Después se prepara el inóculo seleccionando de 4 a 5 colonias del microorganismo obtenido de un cultivo puro o que haya sido obtenido antes de 24 h, se transfieren las colonias a tubos con 3-5 cm<sup>3</sup> de caldo estéril Soya-Trypticase, se incuba a 35 °C por 8-10 horas, una vez teniendo el inóculo incubado, se toma un aplicador de algodón estéril el cual se sumerge en el inóculo que ha sido incubado, se siembra el inóculo con el aplicador de algodón sobre la superficie del medio Mueller-Hinton en la caja de Petri posterior a ello se deja secar la caja con la tapa cerrada alrededor de 5-10 minutos y finalmente se colocan los discos sobre la superficie del agar con unas pinzas estériles. A continuación, en la tabla 2 se muestran los antibióticos que se emplean en el antibiograma:

*Tabla 2. Antibióticos empleados para el antibiograma de Salmonella*

ANTIBIÓTICO	CONCENTRACIÓN
Amikacina	30 mcg
Ampicilina	10 mcg
Cefalotina	30 mcg
Ceftriaxona	30 mcg
Cloranfenicol	30 mcg
Dicloxacilina	1 mcg
Enoxacina	10 mcg
Eritromicina	15 mcg
Gentamicina	10 mcg
Netilmicina	30 mcg
Penicilina	10 U
Trimetoprim-Sulfametoxazol	25 mcg



## Resultados

Se determinó *Salmonella* spp. En los puntos de muestreo usando medio XLD (ilustración 1) y medio SS (ilustración 2) en los muestreos realizados siguiendo el punto 2 de la metodología descrita.

Posteriormente se realizaron las pruebas bioquímicas de identificación tomando diferentes cepas provenientes de las placas de XLD y SS ya sea de Caldo Selenito Cistina (SC) o Caldo Tetrionato (CT) siendo cada una la más representativa de un punto de muestreo y desglosada la identificación en la tabla

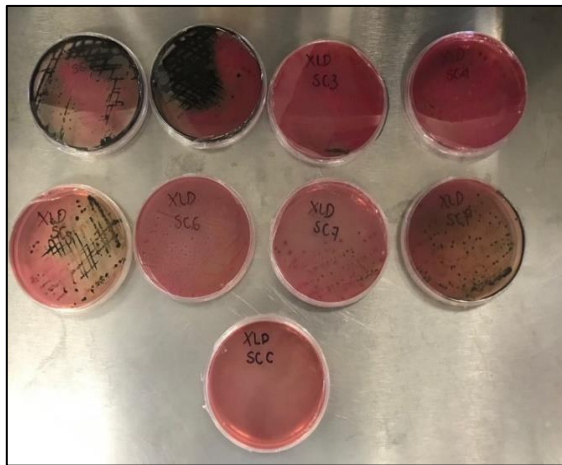


Ilustración 2. Determinación de *Salmonella* spp. en medio XLD

3.

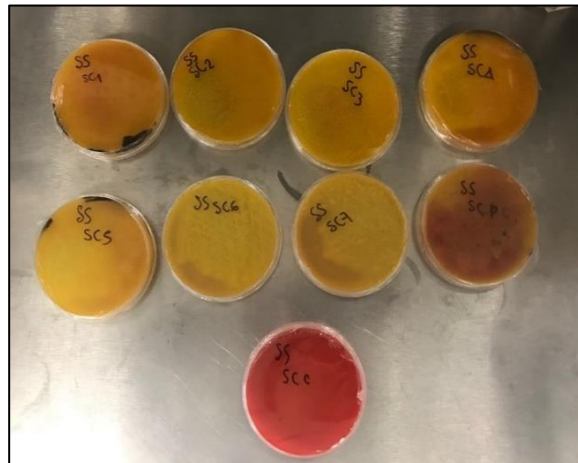


Ilustración 1. Determinación de *Salmonella* spp. en medio SS

Tabla 3. Identificación de especies de *Salmonella* acorde al medio y muestra procesada

PUNTO	CEPA	ESPECIE, MUESTREO 1	ESPECIE, MUESTREO 2
E1	Placa SS proveniente de SC	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. typhimurium</i>
	Placa XLD proveniente de SC	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. typhimurium</i>
E2	Placa SS proveniente de CT	<i>S. paratyphi A</i>	<i>S. paratyphi B</i>
	Placa XLD proveniente de SC	<i>S. paratyphi A</i>	<i>S. paratyphi B</i>
	Placa XLD proveniente de CT	<i>S. paratyphi A</i>	<i>S. paratyphi B</i>
	Placa SS proveniente de CT	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. paratyphi A</i>





<b>E3</b>	Placa XLD proveniente de SC	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. paratyphi A</i>
	Placa XLD proveniente de CT	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. paratyphi A</i>
<b>E4</b>	Placa SS proveniente de SC	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. typhimurium</i>
	Placa SS proveniente de CT	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. typhimurium</i>
	Placa XLD proveniente de CT	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. typhimurium</i>
<b>E5</b>	Placa SS proveniente de SC	<i>S. paratyphi A</i>	<i>S. paratyphi A</i>
	Placa XLD proveniente de SC	<i>S. paratyphi A</i>	<i>S. paratyphi A</i>
	Placa XLD proveniente de CT	<i>S. paratyphi A</i>	<i>S. paratyphi A</i>
<b>E6</b>	Placa XLD proveniente de CT	<i>Salmonella spp.</i>	<i>S. paratyphi B</i>
<b>E7</b>	Placa SS proveniente de CT	<i>Salmonella spp.</i>	<i>S. typhimurium</i>

Finalmente se realizaron las pruebas de sensibilidad de antibióticos con multidiscos a diferentes concentraciones de antibióticos en placa con la metodología del punto 3 descrita anteriormente, presentando resistencia y crecimiento en diferentes antibióticos (ilustración 3).



Ilustración 3. Antibiograma de especies de *Salmonella*, usando multidiscos

Los resultados obtenidos para todas las muestras se desglosan en la tabla 4 donde S representa sensibilidad de la bacteria al antibiótico, es decir, no presenta



crecimiento cercano al multidisco y R que representa la resistencia al antibiótico, es decir, se manifiesta crecimiento cercano al multidisco.

*Tabla 4. Resultados de antibiograma a especies de Salmonella bajo diferentes antibióticos y concentraciones. Donde S:sensible; R:resistente*

<b>Salmonella</b>			
<b>MUESTREO</b>	<b>ANTIBIÓTICO</b>	<b>CONCENTRACIÓN DEL ANTIBIÓTICO</b>	<b>SENSIBILIDAD</b>
<b>1</b>	Amikacina (AK)	30 mcg	S
	Ampicilina (AM)	10 mcg	R
	Cefalotina (CF)	30 mcg	R
	Ceftriaxona (CRO)	30 mcg	S
	Cloranfenicol (CL)	30 mcg	S
	Dicloxacilina (DC)	1 mcg	R
	Enoxacina (ENX)	10 mcg	S
	Eritromicina (E)	15 mcg	R
	Gentamicina (GE)	10 mcg	S
	Netilmicina (NET)	30 mcg	S
	Penicilina (PE)	10 U	R
	Trimetroprim- Sulfametoxazol (SXT)	25 mcg	S
<b>2</b>	Amikacina (AK)	30 mcg	S
	Ampicilina (AM)	10 mcg	R
	Cefalotina (CF)	30 mcg	R
	Ceftriaxona (CRO)	30 mcg	S
	Cloranfenicol (CL)	30 mcg	S
	Dicloxacilina (DC)	1 mcg	R
	Enoxacina (ENX)	10 mcg	S
	Eritromicina (E)	15 mcg	R
	Gentamicina (GE)	10 mcg	S
	Netilmicina (NET)	30 mcg	S



	Penicilina (PE)	10 U	R
	Trimetroprim- Sulfametoxazol (SXT)	25 mcg	S

### Conclusiones

El análisis de muestras de agua para la identificación de especies de *Salmonella* arroja una alta concentración y resistencia a una amplia diversidad de antibióticos que pudieran inhibir su crecimiento. En el caso de puntos extremos del cuerpo de agua (1,7), se puede observar una mayor sensibilidad a antibióticos por la bacteria esto a causa de un aislamiento del contacto humano con la zona.

Las especies determinadas son en su mayoría patógenas (*Salmonella typhimurium*), siendo más resaltadas en los puntos centrales (3,4,5) esto en zonas donde se realiza ecoturismo y por lo que pueden causar enfermedades entéricas en los habitantes y visitantes de la zona, sobre todo en los periodos determinados. El origen de la contaminación del cuerpo de agua para presentar especies de *Salmonella* se manifiesta en escorrentías fecales provenientes de ganado aledaño a la zona y de contaminación de carácter antropogénico de visitantes que realizan ecoturismo.

### Referencias

- Bernal, M., & Guzmán, M. (1984). El antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-Bauer. *Biomédica vol. IV n°3-4*, 112-121.
- Betancor, L., & Yim, L. (2012). *Samonella y salmonelosis*. Uruguay: Departamento de Bacteriología y Virología, Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Facultad de Medicina, UdelaR.
- Diario Oficial de la Federación. (1994). *Norma Oficial Mexicana. NOM-014-SSA1-1993 "Procedimientos sanitarios para el muestreo de agua para uso y consumo humano en sistemas de abastecimiento de agua públicos y privados"*. Ciudad de México.
- Diario Oficial de la Federación. (2015). *Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2010, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos*.



*Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.* Ciudad de México.

Instituto de Ecología del Estado. (s.f.). *Área Natural Protegida Las Musas.* Guanajuato: IEEG.

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2004). *Salmonella* Serotipo Typhi. En *Manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos de importancia para la salud pública en el mundo en desarrollo* (Vol. 1, págs. 118-120). Atlanta, Georgia: OMS.

Parra, M. (2002). Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. *MVZ-Córdoba*, 187-189.