



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
DOCTORADO EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

“Caracterización genética de las bacterias específicas del deterioro
en carne de pollo”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de:

Doctor en Ciencia de los Alimentos

Presenta:

M en C. Cinthia Elizabeth Sáenz García

Dirigido por:

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales

Co- director:

Dra. María del Pilar Castañeda Serrano

Querétaro, Qro. a Noviembre, 2021



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Doctorado en Ciencias de los Alimentos

“Caracterización genética de las bacterias específicas del deterioro en carne de pollo ”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Doctorado en Ciencias de los Alimentos

Presenta:

M. en C. Cinthia Elizabeth Sáenz García

Dirigido por:

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales

Co-dirigido por:

Dra. María del Pilar Castañeda Serrano

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales
Presidente

Dra. María del Pilar Castañeda Serrano
Secretario

Dra. Edmundo Mateo Mercado Silva
Vocal

Dra. María Estela Vázquez Barrios
Suplente

Dr. Christine Alvarado
Suplente

Centro Universitario Querétaro, Qro.
Noviembre 2021

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado durante todo este trayecto.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por brindarme el apoyo durante toda mi estancia.

A todos los miembros de mi comité por su valiosa contribución a este proyecto

A mi director el Dr. Gerardo Nava, gracias por acompañarme durante tanto tiempo, por creer en mí.

A mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Molecular, gracias por el apoyo para el desarrollo de este proyecto.

A Iván Regalado, gracias por siempre estar y creer en mí aún cuando a veces yo no lo hacía. Te amo.

A mi mamá Thelma García Reyes, espero sientas orgullo de la persona que soy, gracias a tí pude hacer todo lo necesario para concluir este proyecto, sin tu apoyo esto nunca lo pude haber logrado.

A Thelma Sáenz García, mi alma gemela, mi confidente, mi voz interna, pero sobre todo mi compañera de vida, absolutamente nada de lo que hago sería posible sin ti, eres mi gran amor y espero este éxito los sientas tuyo.

A Daniel Guerrero Sáenz, mi principal inspiración y motivación en la vida, gracias por impulsar todos mis movimientos, para ti van dedicados todos mis logros, te amo al infinito y más allá.

Resumen

El desperdicio es un grave problema a nivel mundial, se estima en un tercio de los alimentos que se producen se pierden. Aproximadamente el 29% de la carne fresca de pollo que se produce en México se pierde. En los últimos años, se ha logrado identificar diversos géneros de Bacterias Asociadas al Deterioro (BAD); sin embargo, hasta el momento se desconocen las Bacterias Específicas o Causantes del Deterioro (BCD), las cuales se consideran como causantes del deterioro. Se sabe que las BCD tienen un metabolismo oligotrófico y psicrótrofo que les permite adaptarse y crecer en ambientes hostiles (fríos y con pocos nutrientes). La presente propuesta tuvo por objetivo asilar, identificar y caracterizar géneros de BCD de la carne de pollo. Para lograr este objetivo, se desarrollaron medios no convencionales para identificar las bacterias con las características de las BCD y a través de un modelo *in vitro* se evaluó su capacidad deterioradora mediante la producción de Nitrógeno Volátil Total (TVB-N). Además, se realizaron análisis genotípicos (genes asociados al deterioro *AprX*, *kb-lip*, *esta*, *rhIA* y *rhIB*) y fenotípicos (actividad proteolítica, lipolítica y biosurfactante) a los aislamientos obtenidos de la carne de pollo. Se identificaron 7 géneros de bacterias asociados a los grupos BAD ($n=100$). Se encontró que *Pseudomonas* es el principal BCD en carne de pollo y se reveló la presencia de dos grupos de *Pseudomonas*; *Pseudomonas* Causantes Deterioro (PCD) y *Pseudomonas* Asociadas al Deterioro (PAD), 31 % y 69 %, respectivamente. Por otro lado, los estudios genotípicos revelaron una correlación entre la presencia del gen *AprX* y las PCD, así mismo se demostró una correlación positiva entre la actividad proteolítica y las PCD. Los resultados del presente estudio sientan las bases para el estudio de las PCD en carne de pollo, esta información será fundamental para disminuir o controlar estas poblaciones.

Palabras clave: *Pseudomonas*, deterioro, carne de pollo

Abstract

Waste is a serious problem worldwide, and it is estimated that one-third of the food produced is lost. Approximately 29% of the fresh chicken meat produced in Mexico is lost. In recent years, it has been possible to identify Spoilage Associated Organisms (SAO); These represent all the bacterial genera that are recovered from chicken meat during the spoilage process; However, up to now, the Specific Spoilage Organisms (SSO) are unknown, which represent only a fraction of the population of SAO and are those that are considered to cause deterioration. SSOs are known to have oligotrophic and psychrotrophic metabolism that allows them to adapt and grow in harsh (cold and nutrient-poor) environments. The objective of this proposal is to isolate, identify and characterize BCD genera from fresh chicken meat. For this goal, we developed unconventional media to identify bacteria with the characteristics of SSOs and through an in vitro model to evaluate their spoilage capacity through the production of Total Volatile Nitrogen (TVB-N). In addition, we evaluated genotypic (metabolic genes, *AprX*, *kb-lip*, *esta*, *rhIA*, and *rhIB*) and phenotypic activity (lipolytic, proteolytic, and biosurfactant) in isolates obtained from chicken meat. There were identified seven genera of bacteria associated with BAD ($n=100$). *Pseudomonas* was found to be the main SSO in chicken meat. It was demonstrated the presence of two *Pseudomonas* groups; *Pseudomonas* associated with spoilage (PAS) and *Pseudomonas* Specific of Spoilage (PSS), 31% and 69%, respectively. Genotypic and phenotypic analyses demonstrate a positive correlation among *AprX* gene, proteolytic activity and PSS. The present study results lay the foundations for the study of PCD in chicken meat; this information will be essential to reduce or control these populations.

Key words: Specific Spoilage organism, chicken meat, *Pseudomonas*

Declaración de Responsabilidad del Estudiante

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Índice

Agradecimientos	i
Resumen	ii
Abstract	iii
Declaración de Responsabilidad del Estudiante	iv
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 Desperdicio de alimentos	3
2.2 Producción de carne de pollo y su desperdicio	4
2.3 Mecanismos de deterioro en la carne	6
2.4 Metabolismo microbiano asociados al deterioro de la carne	7
2.4.1 Lipasas Bacterianas	8
2.4.2 Proteasas Bacterianas.....	9
2.5 Indicadores del deterioro microbiano	12
2.5.1 Nitrógeno Volátil Total (TVB-N)	12
2.5.2 pH	13
2.6 Modelos de deterioro en carne de pollo	15
2.7 Detección del deterioro a través de ensayos genotípicos	15
3. Hipótesis	16
4. Objetivo General	17
4.1 Objetivos Específicos	17
5. Materiales y Métodos	18
5.1 Materiales	18
5.1.2 Medios de Cultivo	18
5.1.3 Reactivos	19
5.1.4 Otros.....	19
5.2 Métodos	20
5.2.1 Identificación de microorganismos oligotróficos y psicrótrofos asociados al deterioro de la carne de pollo	20
5.2.2 Evaluación fenotípica de la actividad enzimática (metabólica)	21

5.2.3 Identificación de genes funcionales para el deterioro.....	23
5.2.5 Análisis de los genes asociados al deterioro en el género <i>Pseudomonas</i>	26
5.2.7 Estandarización de ensayos moleculares para la detección de genes asociados al deterioro.....	27
5.2.9 Ensayo de la capacidad deterioradora de aislamientos oligotróficos y psicrótrofos	28
6. Resultados y Discusión.....	30
6.1 Diversidad de microorganismos asociados al deterioro.....	30
6.1.1 Diversidad de microorganismos por día de aislamiento.....	31
6.2 Capacidad deterioradora de aislamientos oligotróficos y psicrótrofos obtenidos de pollo deteriorado.	32
6.3.1 Actividad proteolítica en las Bacterias asociadas al deterioro	34
6.3.2 Actividad lipolítica en las Bacterias asociadas al deterioro	37
6.3.3 Actividad Biosurfactante en las Bacterias asociadas al deterioro.....	38
6.4 Correlaciones entre la actividad enzimática y la concentración de TVB-N.....	38
9. Conclusiones	45
10. Referencias	46

Índice de Figuras

Figura	Página
Figura 1. Demanda global de carne.	4
Figura 2. Estructura del operón <i>AprX – Kb-LipA</i> para <i>Pseudomonas</i>	8
Figura 3. Prueba colapso de gota para determinar la actividad biosurfactante.....	22
Figura 4. Diversidad de bacterias oligotróficas obtenidas de carne de pollo deteriorada.	30
Figura 5. Diversidad de aislamientos oligotróficos obtenidos de carne de pollo deteriorada por día.....	31
Figura 6. Capacidad de deteriorar de aislamientos inoculados en carne de pollo.	32
Figura 7. Actividad fenotípica de aislamientos obtenidos de carne de pollo deteriorada.	37
Figura 8. Correlación de Pearson entre valores de TVB-N y la actividad proteolítica en aislamientos obtenidos de carne de pollo deteriorada.	40
Figura 9. Correlación de Pearson entre valores de TVB-N y la actividad lipolítica en aislamientos obtenidos de carne de pollo deteriorada.	41
Figura 10. PCR para los genes asociados al deterioro.....	42
Figura 11. Gradiente de temperatura para la PCR del gen <i>AprX</i> (850pb)..	43
Figura 12. PCR para el gen <i>AprX</i> en aislamientos obtenidos de carne de pollo deteriorado	44

Índice de Cuadros

Cuadro	Página
Cuadro 1. Genes que codifican para enzimas asociadas al deterioro	23
Cuadro 2. Identificación de genoma de <i>Pseudomonas</i> de referencia.....	24
Cuadro 3. Genes constitutivos del género <i>Pseudomonas</i>	24
Cuadro 4. Diversidad de genes completos de <i>Pseudomonas</i>	25
Cuadro 5. Genes identificados en genomas completos de <i>Pseudomonas</i>	26
Cuadro 6. Iniciadores de genes asociados al deterioro	27
Cuadro 7. Iniciadores con modificaciones de genes asociados al deterioro.....	27
Cuadro 8. Diversidad de familias que causan deterioro.....	33
Cuadro 9. Actividad proteolítica, lipolítica, biosurfactante, TVB-N de <i>Pseudomonas</i>	35

Dirección General de Bibliotecas UIQ

1. Introducción

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) un tercio de los alimentos que se producen a nivel mundial se desperdicia (Read y Muth, 2021). El desperdicio es la disminución de alimentos como consecuencia de las acciones en proveedores de servicios alimentarios (transporte y distribución), minoristas (comercialización) y consumidores; por otro lado, la pérdida de alimentos se, principalmente ocurren en las primeras etapas de la cadena de suministro de alimentos (etapas de producción y poscosecha) (Karwowska *et al.*, 2021). En el año 2019, el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) dio a conocer que ~ 931 millones de toneladas de alimentos fueron desperdiciados, esto equivale al 17% de la producción total de alimentos. En EE. UU. el impacto económico del desperdicio de alimentos e los \$190 mil millones de dólares al año (Flanagan *et al.*, 2019). y el costo anual para empresas y organizaciones minoristas es superior a los \$65 mil millones de dólares (Hickey y Ozbay, 2014).

En particular, para la industria de la carne, se ha estimado que a nivel mundial se desperdician más de 260 millones de toneladas de carne al año (FAO, 2015) de las cuales más de 5 millones de toneladas se desperdician a consecuencia del deterioro microbiano (Flanagan *et al.*, 2019). El deterioro microbiano se favorece durante el prolongado tiempo que toma la distribución de alimentos, aunado a las fluctuaciones de temperatura (cuando se rompe la cadena de frío) y a las malas condiciones sanitarias durante el procesamiento (elevadas cuentas bacterianas y pH alto en el producto) (Boziaris y Parlapani, 2017). En las últimas décadas numerosos estudios han logrado identificar a los microorganismos asociados al deterioro (Boziaris y Parlapani, 2017; Rukchon *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2012); sin embargo, hasta el día de hoy, no se ha podido identificar a las bacterias que causan el deterioro.

En el presente trabajo se identificaron y caracterizaron las bacterias causantes del deterioro en carne fresca de pollo por medio de ensayos fenotípicos (capacidad metabólica) y genotípicos (repertorio genético). Esta información será fundamental para establecer nuevas medidas de control y alargar la vida de anaquel del producto.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

2. Antecedentes

2.1 Desperdicio de alimentos

El desperdicio de alimentos es uno de los problemas más importantes en el mundo, se ha estimado que se desperdician 931 millones de toneladas de alimentos comestibles al año (Karwowska *et al.*, 2021), este generalmente ocurre en las últimas etapas, a nivel minorista y con el consumidor (FAO, 2019). En términos generales los alimentos que no se consumen tiene un impacto en los recursos naturales, representa el 24 % del total de los recursos de agua utilizada para el riego, el 23 % de las tierras de cultivo y el 23 % de uso total de fertilizantes a nivel mundial (Kummu *et al.*, 2012). Además, se estimó que ~300 millones de barriles de petróleo se desperdician cada año, debido al transporte y distribución de productos que no se consumen por causa del deterioro; esto representa ~4% del consumo anual de petróleo de EE. UU. (Spiker *et al.*, 2017). Por otro lado, la pérdida de alimentos se genera por diferentes razones, por ejemplo, problemas durante el procesamiento, la comercialización, fluctuación de temperatura en el almacenamiento e inestabilidad de los mercados (Sams, 2001).

En EE.UU ~35% del suministro de alimentos se pierde antes de que llegue a los consumidores (Spiker *et al.*, 2017) y representan, al menos, el 17% de los rellenos sanitarios en los EE.UU., lo cual genera gastos superiores a los \$1.3 millones de dólares en gestión de residuos (Buzby y Hyman 2012). En Japón, se desperdician ~17 millones de toneladas métricas de alimentos anualmente, esto representa ~30% de la producción (Spiker *et al.*, 2017). En la India, casi el 30% de las frutas y hortalizas se pierden debido a la falta de infraestructura durante el almacenamiento (Flanagan *et al.*, 2019). En Reino Unido, se pierden más de 8 millones de toneladas métricas de alimentos y bebidas cada año, con un valor superior a los \$18 mil millones de dólares (Buzby y Hyman 2012).

Se estima que una cuarta parte de la oferta mundial de alimentos se pierde por el deterioro microbiano (Flanagan *et al.*, 2019). En particular, en la carne fresca se

estima ~305 millones de toneladas se pierden la anualmente, estas pérdidas deben principalmente al deterioro (Luong *et al.*, 2020). Esto genera considerables pérdidas económicas para el sector.

2.2 Producción de carne de pollo y su desperdicio

La producción mundial de carne de pollo superó los 100 millones de toneladas en el 2016, de las cuales América contribuyó con 44.3 millones de toneladas. Se estima que el consumo per cápita a nivel mundial de carne de pollo es de ~13.8 kg (Luong *et al.*, 2020). De acuerdo con la Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés) la producción de carne de pollo tendrá un crecimiento anual del 3.4% a nivel mundial (USDA, 2016).

La carne de pollo es una de las principales fuentes de proteína animal en la dieta humana. Su bajo precio, en comparación con otras carnes, y su valor nutricional la hacen uno de los productos cárnicos más demandados en el mundo (Spyrelli *et al.*, 2021). De acuerdo con la FAO se estima que para el 2050 la demanda de carne se incrementará en un 110% alcanzando los 181 millones de toneladas (**Figura 1**) (FAO, 2019).



Figura 1. Demanda global de carne. Fuente: FAO, 2019

En México, se ha estimado que la producción de carne de pollo incrementa ~2.5% al año; esto equivale a un aumento de ~3 millones de toneladas y ~\$99,786 millones

de pesos (M.N.) en producción (UNA, 2020). En México, el consumo per cápita anual de pollo es de 33.12 kg (UNA, 2020) y en la zona centro del país, se consume aproximadamente el 70% de la producción nacional (Avicultura, 2017). El 62.9% de la producción pecuaria del país es aportado por la avicultura y el 34.8% por la producción de carne de pollo (UNA, 2020). México es el séptimo productor de pollo y el quinto consumidor de este producto a nivel mundial (USDA, 2016). En conjunto, estos datos resaltan la importancia de la producción cárnica avícola a nivel mundial y nacional.

Actualmente, el 29 % de la carne de pollo que se producen en el país se desperdicia esto equivale a ~0.7 millones de toneladas (UNA, 2019), de los cuales ~0.28 millones de toneladas se pierden por el deterioro microbiano (Luong *et al.*, 2020). El proceso de deterioro microbiano proviene de la proliferación de microorganismos psicótrofos (rango de proliferación 0 - 25°C) a través del consumo de nutrientes de la carne, propiciando la producción de metabolitos indeseables que afectan de manera significativa la calidad (Zhang *et al.*, 2021). Se reconocen 4 mecanismos de deterioro en la carne fresca de pollo: microbiológica, autólisis enzimática, oxidación lipídica y la oxidación de proteínas (Rouger *et al.*, 2017). El deterioro microbiano en carne depende de diversos factores, como la disponibilidad de glucosa, ácido láctico, aminoácidos u otros compuestos nitrogenados que pueden utilizarse como fuente de energía para el crecimiento de microorganismos (Bozianis y Parlapani, 2017). Se ha propuesto que la microbiota de la carne es el resultado de asociaciones microbianas entre dos grupos bacterianos, las Bacterias que Causan el Deterioro (BCD) y las Bacterias Asociadas al Deterioro (BAD) (Bozianis y Parlapani, 2017). Las BAD son todos los géneros bacterianos que se recuperan de la carne de pollo durante el proceso de deterioro. Por otro lado, las BCD representan sólo una fracción de la población de las BAD y son los que se consideran como causantes del deterioro (Ammor *et al.*, 2008; Gram *et al.*, 2002).

Las BCD tienen una tasa de crecimiento lenta en comparación con los miembros de las BAD (Doulgeraki *et al.*, 2012). El aislamiento y la identificación de las BCD ha

sido un desafío debido a las complejas interacciones entre los miembros de la microbiota cárnica y la falta de métodos microbiológicos adecuados; por ejemplo, estudios han revelado que algunas especies bacterianas con potencial de deterioro no se pueden aislar en medios convencionales (Broekaert *et al.*, 2011). A pesar de desconocer muchas características biológicas de los BCD; se sabe que se encuentran en concentraciones bajas ($\sim 10^2$ UFC) (Rukchon *et al.*, 2014) al momento del procesamiento y proliferan durante el almacenamiento en condiciones de refrigeración, una vez que las BAD consumen la glucosa presente en la carne es por esto, que se sugiere que las BCD tienen características metabólicas que les permite obtener nutrientes de la carne de pollo (Gill y Badoni, 2005; Wickramasinghe *et al.*, 2019). Para obtener información relevante sobre las BCD es importante aprovechar el progreso en la genómica microbiana para descubrir algunos rasgos biológicos de estas bacterias. Por ejemplo, se ha demostrado que las bacterias adaptadas a entornos fríos y hostiles poseen un tamaño genómico extenso reflejando una adaptación evolutiva que le permite proliferar en ambientes complejos donde los nutrientes son escasos (Broekaert *et al.*, 2011); Konstantinidis y Tiedje, 2004; Stover, 2000).

Estudios previos de análisis genómicos comparativos, revelaron que miembros de la familia Pseudomonadaceae pueden ser los BCD en carne de pollo, esto debido a que pueden adaptarse para poder sobrevivir y desarrollarse en ambientes fríos (metabolismo psicrótrofo) y ambientes con pocos nutrientes (metabolismo oligotrófico), esta versatilidad se ve reflejada en una adaptación evolutiva que le permite adaptarse a las condiciones del procesamiento (escaldado y enfriamiento) y causar deterioro (Saenz-García *et al.*, 2020).

2.3 Mecanismos de deterioro en la carne

Durante el deterioro microbiano de la carne, la glucosa se cataboliza generalmente durante la primera fase del crecimiento microbiano en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Pothakos *et al.*, 2015). El ácido láctico que se produce es la segunda fuente principal de carbono y energía, éste se utiliza de manera eficiente a menudo después de que se agotan los sustratos de glucosa. Cuando estos (glucosa y ácido

láctico) se terminan, pueden usarse otros sustratos como lactato, glucanato, piruvato, urea y proteínas solubles en agua (Pothakos *et al.*, 2015) como fuentes de Carbono y Nitrógeno. La dinámica del crecimiento microbiano y las especies dominantes varían dependiendo de la disponibilidad del sustrato preferido, del oxígeno, la humedad y el pH de la carne. Además, algunos microorganismos tienen la capacidad de penetrar en la carne, esto es resultado del rompimiento del tejido conectivo entre las fibras musculares, debido a la acción de enzimas proteolíticas secretadas por bacterias (Gill, 1976).

Se ha reportado que durante el deterioro ocurren diferentes cambios físicos y químicos en la carne de pollo. Estos cambios pueden determinar el desarrollo de algunos microorganismos (BAD) debido a la producción de compuestos como enzimas que son excretadas al medio por las BCD (Zhang *et al.*, 2012); por eso la producción de enzimas proteolíticas y lipolíticas es considerado como uno de los mecanismos de deterioro.

2.4 Metabolismo microbiano asociados al deterioro de la carne

La carne fresca es reconocida como uno de los alimentos más perecederos. Esto se debe a su composición química (principalmente proteína y glucógeno) y su alta actividad de agua que favorece el crecimiento microbiano afectando la vida útil de la misma (Wang *et al.*, 2017). Durante el almacenamiento refrigerado de la carne se generan compuestos orgánicos de bajo peso molecular que les permite ser volátiles; entre ellos destacan: ésteres, compuestos sulfúricos, ácidos grasos, alcoholes, aldehídos y cetonas (Zhang *et al.*, 2021). Dependiendo de la temperatura de almacenamiento y las condiciones de empaqueo, las concentraciones de estos metabolitos cambian debido al desarrollo de diferentes poblaciones bacterianas (Zhang *et al.*, 2021).

El deterioro en la carne se ha estudiado en función de los parámetros físicos y químicos que se presentan en los alimentos, como cambios en el valor de pH, cambios en el color, la formación de aminas biogénicas, entre otros (Doulgeraki *et al.*, 2012; Qiao *et al.*, 2001); sin embargo, estas características no siempre se

pueden asociar fácilmente con actividades enzimáticas específicas o con vías metabólicas (compuestos volátiles, ácidos orgánicos, aminas biogénicas, entre otros) en alimentos deteriorados por acción microbiana. Esto se debe a que estos cambios en los alimentos son consecuencia de una sucesión compleja de reacciones enzimáticas propias del alimento o causadas por la actividad microbiana (como la decoloración en la carne o la actividad proteolítica de las enzimas de las células musculares) (Rawat, 2015). Por eso es importante considerar las interacciones entre el crecimiento microbiano y la actividad enzimática (Nychas *et al.*, 2008; Gram *et al.*, 2002, Remenant *et al.*, 2014).

2.4.1 Lipasas Bacterianas

Las lipasas bacterianas se han asociado al deterioro de los alimentos, particularmente la enzima *Kb-lipA* es una lipasa responsable del desarrollo de sabores amargos en productos lácteos (Yuan *et al.*, 2018). Además, se ha encontrado en carne de pollo deteriorada (Rashid *et al.*, 2001). El gen *Kb-lipA* codifica para una lipasa con un peso ~45 kDa (Rashid *et al.*, 2001) y se ha demostrado su presencia en los género *Pseudomonas*, *Enterococcus* y *Serratia* (Martins *et al.*, 2015). Se encuentra localizado en el extremo del operón *aprX – Kb-LipA* (**Figura 2**) y su expresión es dependiente de una fuente de carbono y de hierro (Yuan *et al.*, 2018).



(Yuan *et al.*, 2018)

Figura 2. Estructura del operón *aprX – Kb-LipA* para *Pseudomonas*

2.4.2 Proteasas Bacterianas

Se sabe que la secreción de enzimas proteasas y lipasas de origen bacteriano son una causa importante durante el deterioro, debido a que, una vez en la carne, se generan compuestos que son fácilmente utilizados por los microorganismos para causar deterioro. Se ha estudiado la producción de la proteasa *AprX* como compuesto importante durante el deterioro de lácteos (Caldera *et al.*, 2016; Machado *et al.*, 2016; Martins *et al.*, 2015; Meng *et al.*, 2017). Se caracteriza porque requiere un ion metálico divalente para poder ser activa, su pH de actividad está entre 6.5 y 8.0 (Caldera *et al.*, 2016), esta enzima es la principal responsable en la degradación de la leche. El gen *aprX* codifica para esta enzima con un peso ~50 kDa y está ampliamente extendido en el género *Pseudomonas*. El gen se localiza en el extremo del operón *aprX -kb-lipA*, formado por el gen *aprX*, el gen *inh* (inhibidor de proteasa), dos genes auto transportadores (*tliD* y *tliE*), un sistema de secreción (*aprDEF*) y al extremo el gen *kb-lipA* (**Figura 2**) (Yuan *et al.*, 2018). Tiene un sistema de transporte tipo I dependiente de ATP, no contiene un péptido señal; sin embargo, es rico en residuos de alanina y glicina y pobre en residuos de cisteína y metionina. La falta de residuos de cisteína permite evitar las restricciones estéricas debidas a los enlaces disulfuro y aumenta su flexibilidad (McCarthy *et al.*, 2004).

Diversos estudios han demostrado que la producción de esta proteasa está regulada por el *quorum sensing*, es decir por la temperatura óptima de 20°C y los niveles altos de hierro (20 µM), estos factores influyen en su expresión (Woods *et al.*, 2001). Por otro lado, el calcio mejora la actividad y estabiliza la enzima, así como el zinc, que es esencial para su sitio activo (Caldera *et al.*, 2016; Woods *et al.*, 2001). *P. fluorescens* es uno de los principales microorganismos que secreta esta enzima, por un sistema de secreción de tipo 1 (T1SS), que está compuesto por tres componentes del transportador ABC (Delepelaire, 2004). Se ha encontrado que la enzima *AprX* secretada por *P. fragi* degrada principalmente la miosina y la actina (proteínas miofibrilares primarias de la carne), en lugar de las proteínas sarcoplasmáticas del pollo (Ercolini *et al.*, 2010). Por otro lado, la enzima *AprX*, se ha encontrado en exudados de carne de pollo deteriorada (Martins *et al.*, 2015); sin

embargo, cuando se llegan a degradar proteínas sarcoplasmáticas se puede deber a la inclusión de biosurfactantes durante la extracción de las proteínas del pollo, esto debido a que los biosurfactantes permiten que los nutrientes se encuentren más disponibles y puedan interactuar con otros compuestos como lipasas y proteasas (Mellor *et al.*, 2011). Generalmente, la producción de proteasas ocurre hasta el final de la fase logarítmica de crecimiento, cuando la carne ya se encuentra en un estado avanzado de deterioro (Ercolini *et al.*, 2010).

2.4.3 Biosurfactantes Bacterianos

Otro mecanismo que pueden utilizar las bacterias que causan deterioro, es la producción de biosurfactantes (Mellor *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2021). Los biosurfactantes son metabolitos que tienen varias funciones fisiológicas y aplicaciones industriales (Martinez *et al.*, 2020). Tienen la capacidad de reducir la tensión superficial del agua, mejoran la emulsión de diferentes compuestos inmiscibles con ella y modifican la superficie de contacto entre líquidos o entre un líquido y una superficie (Shao *et al.*, 2017). Se clasifican de manera general como glicolípidos, lipoproteínas, lipopéptidos, fosfolípidos, ácidos grasos o lípidos naturales, surfactantes poliméricos y surfactantes en partículas (Irorere *et al.*, 2017). Generalmente se producen durante la fase estacionaria del crecimiento microbiano y se considera como una ventaja para las bacterias, ya que son capaces de aumentar la disponibilidad de sustratos utilizables en la carne de pollo mediante la solubilización de grasa y aceites presentes en la superficie de la carne (Mellor *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2017).

La producción de biosurfactantes está influenciada positivamente por la limitación de carbono y la disponibilidad de otros nutrientes (hierro y nitrógeno) (Gudina *et al.*, 2016). Los ramnolípidos, es uno de los biosurfactantes de mayor interés tecnológico es producido principalmente por bacterias del género *Pseudomonas* y *Burkholderia* (Wittgens *et al.*, 2017). Los ramnolípidos pertenecen al grupo de los glicolípidos, compuesto por una fracción de azúcar ramnosa hidrófila, que está unida a través de un enlace β -glicosídico a un ácido graso hidrófobo (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010).

El número de moléculas de ramnosa permite una distinción sistemática entre mono y di-ramnolípidos. Los ramnolípidos desempeñan múltiples funciones como: la toma de nutrientes, motilidad celular, mejoran la disponibilidad de sustratos inmiscibles en agua, actúan como moduladores, mejoran la absorción de sustratos hidrófobos y la biodegradación de sustratos poco solubles (Shao *et al.*, 2017).

En la síntesis de mono-ramnolípidos el principal precursor es el azúcar dTDP-L-ramnosa, esta se puede sintetizar a partir de D-glucosa, mientras que el resto hidrófobo se puede sintetizar a través de la síntesis de ácidos grasos (Chong y Li, 2017). Las enzimas necesarias para sintetizar los precursores de la biosíntesis de ramnolípidos se encuentran en los géneros *Pseudomonas* sp. y *Burkholderia* sp. (Wittgens *et al.*, 2018).

La enzima *RhlA* es una ramnosiltransferasa involucrada en la síntesis de mono-ramnolípidos (Boles *et al.*, 2005). El gen *RhlA* codifica para esta enzima con un peso ~52 kDa (Déziel *et al.*, 2003) y se encuentra en los géneros *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Streptomyces* (Shahina, 2018). Se encuentra localizado en el operón *RhlAB* y su producción está influenciada por el tipo y concentración de nutrientes, el pH y la temperatura (Palomino *et al.*, 2017).

Por otro lado, la enzima *RhlB* es una helicasa importante en la biosíntesis de ramnolípidos. El gen *rhlB* codifica para esta enzima con un peso ~40 kDa y se encuentra localizado en el operón *RhlAB* (Boles *et al.*, 2005; Chong y Li, 2017). Se encuentra presente en los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Bacillus* (Wittgens *et al.*, 2018; Zulfiqar Ali Malik, 2013).

Otra enzima involucrada en la biosíntesis de ramnolípidos, es la proteína de autotransporte *EstA*, que es una esterasa unida a la membrana externa. El gen *estA* codifica para esta enzima como un peso ~45 kDa, se encuentra en los géneros *Pseudomonas* y *Acinetobacter* (Wilhem *et al.*, 2007; Winsor *et al.*, 2009). La

sobreexpresión de *estA* es igual a una sobreexpresión de ramnolípidos (*Wittgens et al.*, 2017).

Mellor *et al.*, 2011, realizaron un estudio, donde aislaron *Pseudomonas* de carne de pollo deteriorada ($n = 200$), el 72% de los aislamientos presentaron actividad biosurfactante; de ellos seleccionaron 6 cepas con actividad biosurfactante y se inocularon en carne de pollo, encontrando que la carne inoculada incrementó en 2 Log_{10} de CVT en comparación con el control. Estos resultados sugieren que la producción de ramnolípidos juega un rol importante en el deterioro en la carne de pollo.

2.5 Indicadores del deterioro microbiano

Una gran cantidad de estudios han demostrado que parámetros como nitrógeno volátil total (TVB-N), pH, temperatura, actividad de agua y nutrientes del alimento (aminoácidos, carbohidratos simples o complejos, etc.) influyen en la diversidad y proliferación de los microorganismos presentes en los alimentos (*Gram et al.*, 2002; *Rukchon et al.*, 2014; *Wang et al.*, 2017; *Zhang et al.*, 2012).

2.5.1 Nitrógeno Volátil Total (TVB-N)

El TVB-N es un compuesto que se asocia al deterioro en carne de pollo durante el almacenamiento donde compuestos nitrogenados proteicos (aminoácidos) y no proteicos (catabolitos de nucleótidos) se degradan dando lugar a la acumulación de aminas orgánicas que se conocen comúnmente como nitrógeno volátil total (TVB-N por sus siglas en inglés) (*Bekhit et al.*, 2021; *Wang et al.*, 2021). Se ha detectado que las aminas volátiles como la dimetilamina y trimetilamina generan un olor característico de pescado en descomposición en concentraciones bajas y un olor similar al amoníaco en concentraciones altas (*Gram y Dalgaard*, 2002).

En la evaluación del TVB-N los compuestos que se miden son la trimetilamina ($(\text{CH}_3)_3\text{N}$), dimetilamina ($(\text{CH}_3)_2\text{N}$), y amoníaco NH_3 , estos compuestos volátiles son los que aparecen durante los últimos estadios del deterioro (*Zhang et al.*, 2012). La trimetilamina se forma debido a la reducción bacteriana del Óxido de Trimetilamina

(OTMA), el cual se encuentra de manera natural en el tejido vivo (Urmila *et al.*, 2015). La dimetilamina se produce durante el almacenamiento y es formada por acción de la enzima OTMA dimetilada, que convierte el OTMA en Dimetilamina (DM) y formaldehído (FA) (Khulal *et al.*, 2016). Por otro lado, el amoniaco es formado principalmente por la degradación bacteriana o desaminación de proteínas, péptidos y aminoácidos (Urmila *et al.*, 2015).

El TVB-N es uno de los principales parámetros relacionados al deterioro microbiano (Bekhit *et al.*, 2021) y sus niveles son utilizados para evaluar la frescura de la carne, se cuantifica en mg/100 g de muestra (Hwang *et al.*, 2015). El contenido de TVB-N incrementa con el tiempo de almacenamiento, generalmente su patrón de acumulación es similar a otros biomarcadores de deterioro (Bekhit *et al.*, 2021). Zhang *et al.*, (2012) evidenciaron, que carne de pollo almacenada a 4°C presento una concentración de 7,6 mg/100 g de TVB-N al día 0 de almacenamiento, mientras que para el día 4 de almacenamiento se alcanzaron concentraciones de 12.88 mg/100 g de TVB-N. Se establecieron límites de TVB-N, se sugiere que 20 mg de TVB-N por 100 g es el límite para la carne de pollo “fresca” almacenada en presencia de aire a temperatura de refrigeración (Bekhit *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2012).

2.5.2 pH

Los cambios en el valor de pH es un indicador importante durante el deterioro microbiano (Luong *et al.*, 2020). El pH final de la carne es dependiente de la cantidad de ácido láctico presente en el músculo, este es producido a partir de glucógeno generado durante la glucólisis anaeróbica (Wang *et al.*, 2021). Este glucógeno se agota en los músculos de las aves que han sido expuestas a estrés antes del sacrificio, por lo tanto, el estrés previo al sacrificio puede estar relacionado con el pH del músculo (Gorsuch y Alvarado, 2010).

Durante los primeros estadios del deterioro de la carne, el valor de pH tiende a bajar (~5.5) (Ghollasi-Mood *et al.*, 2017), esto se debe principalmente al metabolismo de las bacterias ácido lácticas (BAL) que producen ácido láctico, generado una

disminución del pH; sin embargo, durante el almacenamiento el pH aumenta (~6.5), debido a la formación de compuestos nitrogenados, este incremento en el pH influyen en la velocidad de los procesos bioquímicos y proporciona mejores condiciones de crecimiento para la microbiota de la carne (Gorsuch y Alvarado, 2010).

Además, las enzimas microbianas y endógenas que actúan sobre compuestos de bajo peso molecular presentan actividad a pH alto (6.0 – 6.5), dando como resultado la producción de amonio, aminos y sulfuros orgánicos (Katiyo *et al.*, 2020). Así mismo, el pH se ha asociado a la degradación del tejido muscular durante el deterioro de la carne (Wang *et al.*, 2021) por lo que se usa como estrategia para evaluarlo (Zhang *et al.*, 2012).

2.5.3 Color

El color es un parámetro importante para evaluar el deterioro microbiano. En la carne de pollo puede variar entre un tono blanco-azulado a colores amarillos, esto depende principalmente de la dieta, la estirpe y la edad del animal. De manera general las aves con menos grasa debajo de la piel tienden a presentar colores azulados, mientras que la coloración amarilla es debido a los pigmentos utilizados en la alimentación (xantofilas amarillas) (Gorsuch y Alvarado, 2010). Se ha reportado que el valor de la luminosidad L^* (50- 55) puede ser utilizado como parámetro de calidad ya que esta relacionado con la frescura de la carne (Pennacchia *et al.*, 2011; Rukchon *et al.*, 2014; Sams, 2001).

En condiciones aerobias, el color de la carne se puede ver afectado por el crecimiento microbiano, esto debido a que se reduce el nivel de oxígeno en la superficie del tejido porque las bacterias aeróbicas lo utilizan (Qiao *et al.*, 2001). Una vez que se reduce la presión parcial de oxígeno en la superficie de la carne, la mioglobina se oxida formando metamioglobina que provoca carne de color pardusco, o se forma desoximioglobina que genera carne color violáceo (Katiyo *et al.*, 2020).

2.6 Modelos de deterioro en carne de pollo

Existen escasos estudios que comprueban la participación de bacterias en el proceso del deterioro de la carne. Wang *et al.*, (2017) aislaron *Aeromonas spp.*, *Pseudomonas spp.* y *Serratia spp.* a partir de carne de pollo deteriorada, e inocularon pechuga de pollo a una concentración de 3 log de UFC/ g. Las muestras que fueron inoculadas con *P. fragi* y *P. fluorescens* tuvieron una vida de anaquel (sensorial y química) de 5 días, alcanzado valores de TVB-N de 28 mg/100 g; esas mismas muestras presentaron 58 mg/100g de TVB-N en el día 8 además de un aumento en el valor de pH (6.5 para el día 5 a 7.5 para el día 8). En la evaluación sensorial, al día 5 se detectaron olores desagradables en comparación con las muestras inoculadas con *Aeromonas* y *Serratia* o el grupo control. Estos resultados son similares a lo reportado por Saenz *et al.*, (2017), donde carne de pollo inoculada con cepas de *Pseudomonas* alcanzaron niveles de 21 mg/100 g, de TVB-N y aumento de pH de 5.9 a 6.4. En conjunto, estos resultados sugieren que miembros de la familia *Pseudomonadaceae* podrían ser los agentes causales del deterioro (BCD) en la carne de pollo.

2.7 Detección del deterioro a través de ensayos genotípicos

La identificación y caracterización de las bacterias asociadas al deterioro se puede realizar a través de técnicas fenotípicas o genotípicas. Las técnicas fenotípicas son consideradas como los métodos estándar, en donde los microorganismos se aíslan con el uso medios de cultivo, para posteriormente analizar sus características metabólicas (Bozaris y Parlapani, 2017). Este tipo de análisis se pueden ver sesgados, debido a que sólo se puede analizar a los microorganismos que se pueden aislar, por lo que aquellos que no se aíslan y son importantes para el deterioro no se estudian. Por esta razón, en las últimas décadas se ha utilizado los métodos cultivo – independientes (genotípicos), estos métodos se basan en el uso del ADN de los microorganismos, el uso de técnicas moleculares ha aumentado la identificación de las BAD (Broekaert *et al.*, 2011). Estos métodos son eficientes para identificar microorganismos, pero también para poder estudiar sus genes y su capacidad metabólica.

3. Hipótesis

Los miembros de la familia *Pseudomonadaceae* son las bacterias que causan deterioro en la carne de pollo debido a que contienen un repertorio de genes asociados al deterioro (*AprX*, *rhIA*, *estA*, *rbbf*, *Kb-lip* y *lipA*), un metabolismo psicrótrofo y oligotrófico.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

4. Objetivo General

Identificar y caracterizar a través de ensayos fenotípicos y genotípicos las bacterias causantes del deterioro en carne de pollo; así mismo, establecer una estrategia de detección basada en genes funcionales del metabolismo deteriorador.

4.1 Objetivos Específicos

1. Aislar y caracterizar bacterias psicrótrofas y oligotróficas asociadas al deterioro en carne de pollo.
2. Determinar el repertorio genético (*AprX*, *rhlA*, *estA*, *rffB*, *Kb-lip* y *lipA*) y capacidad metabólica (actividad biosurfactante, proteolítica y lipolítica) de bacterias asociadas al deterioro en carne de pollo.
3. Evaluar en un modelo de deterioro de carne *in vitro* la capacidad deterioradora de cepas bacterianas psicrótrofas y oligotróficas.

5. Materiales y Métodos

5.1 Materiales

- Placas de petri
- Micropipetas de 10ml y 1ml (Lab systems)
- Incubadoras de precision (30 – 35°C y 22°C) (Precision Scientific, Seward 400)
- Autoclave eléctrica de mesa, 121 °C (Market-Forge, Sterilimatic)
- Balanza analítica digital, 120g x 0.0001g (Sartorius)
- Campana de flujo laminar (Alder y Veco)
- Potenciómetro (Hanna, HI-222, EE. UU.).
- Colorímetro Minolta (CR- 400).
- Espectofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA)
- Vortex modelo G650 (Daiger Vortex Genie 2, Scientific Industries Inc.)
- Fotodocumentador (MiniBis Pro)
- Licuadora
- Termociclador, modelo c100 de 96 pozos (Bio-rad)
- Termociclador tiempo real de alta capacidad (formato de 96-pozos). Modelo CFX96touch™ real-time PCR detectionsystem, marca bio-rad
- Cámaras de Conway®
- Papel Filtro Whatman #1

5.1.2 Medios de Cultivo

- Caldo soya tripticasa (CST) (BD Bioxon)
- Agar soya tripticasa (BD Bioxon)
- Agar de peptona (BD Bioxon)
- Agar Bacteriológico, (BD Bioxon)
- Agar Nutritivo (BD, Bioxon)
- Caldo Peptona de carne, (BD Bioxon)

5.1.3 Reactivos

- Solución amortiguadora de fosfato a 0.1M
- Solución salina isotónica (SSI) 0.85% (cloruro de sodio, Productos Químicos Monterrey).
- Reactivos para PCR: MgCl₂, 10X taq Buffer, dNTP, Taq Hot Start
- Agarosa al 2% (Invitrogen)
- Kit de Extracción de ADN (Quick- gDNA Zymo Research®)
- Verde de bromocresol
- Rojo de metilo
- Carbonato de Potasio K₂CO₃
- Ácido Bórico H₃BO₃
- Ácido Sulfúrico H₂SO₄
- Solución Salina
- Etanol al 90%
- Tween 80
- Aceite Mineral

5.1.4 Otros

- Pechuga de pollo
- Aislamientos de *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Aeromonas* y *Brochotrrix thermosphacta*.
- Leche en polvo descremada

5.2 Métodos

5.2.1 Identificación de microorganismos oligotróficos y psicrótrofos asociados al deterioro de la carne de pollo

Con la finalidad de aislar bacterias adaptadas a un ambiente frío y con nutrientes escasos, se diseñó la siguiente estrategia; se obtuvieron pechugas de pollo en un supermercado de la ciudad de Querétaro, las muestras fueron trasladadas al laboratorio y cortadas en trozos de ~25 g. Las muestras se almacenaron en bolsas de polietileno en condiciones asépticas por 14 días a temperaturas de refrigeración. Se recuperaron bacterias los días 0, 4, 8 10 y 14, se realizó un lavado manual con 50 ml de solución salina durante 3 minutos con la finalidad de desprender las células bacterianas del tejido (en una bolsa se frotó el pollo con el agua). Posteriormente se realizaron diluciones decimales de estos lavados y se colocaron 100 μ l en los medios oligotróficos que se desarrollaron en el laboratorio:

1. **Medio A:** 1.5 g de Tripteína, 0.5 g de Peptona de soya, 0.5 g de Cloruro de sodio y 15 g de Agar bacteriológico (BD Bioxon, EE.UU) por litro.
2. **Medio B:** 0.15 g de Tripteína, 0.05 g de Peptona de soya, 0.05 g de Cloruro de sodio y 15 g de Agar bacteriológico (BD Bioxon, EE.UU) por litro.
3. **Medio C:** con 0.015 g de Tripteína, 0.005 g de Peptona de soya, 0.005 g de Cloruro de sodio y 15 g de Agar bacteriológico (BD Bioxon, EE.UU) por litro.

Las placas inoculadas se incubaron a 22 °C por 48 h, se seleccionaron colonias representativas con diferentes morfologías y se obtuvieron cultivos puros en Agar Soya Tripicasa (AST). Para la identificación de los aislamientos los cultivos puros se propagaron en Caldo Soya Tripticasa por 48 h a 22°C. Se realizó la extracción de ADN con el kit comercial Quick- gDNA Zymo Research (Zymo, EE. UU.), para lo cual 1 ml del caldo de cultivo se centrifugó a 13,000 rpm por 3 min y el agregado celular se sometió al proceso de extracción. Se midió la concentración y pureza del ADN con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, EE. UU.). La concentración de ADN fue normalizada a 5 ng/ μ l para posteriormente utilizarse en

el ensayo de PCR con el gen *16S rRNA*. Se utilizaron los iniciadores 8F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y 1510 (CGGTTACCTTGTTACGACTT) con el siguiente protocolo: desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min, seguido de 20 ciclos de 94 °C por 45 s, alineación de 5.3 °C por 30 s, una extensión de 72 °C por 30 s y extensión final a 72 °C por 5 min (Frank *et al.*, 2008). Los productos de la PCR se secuenciaron con el método Sanger (Genewiz, EE. UU.), las secuencias del gen *16S rRNA* fueron almacenadas en un archivo de Excel en formato FASTA y se analizaron a través de la base de datos del Ribosomal Database Project, 11,0 (Cole *et al.*, 2014) para lograr su identificación.

5.2.2 Evaluación fenotípica de la actividad enzimática (metabólica)

Con la finalidad de evaluar la actividad metabólica asociada al deterioro de los aislamientos obtenidos de carne de pollo deteriorada se determinó la producción de biosurfactantes, la actividad lipolítica y proteolítica por métodos fenotípicos.

5.2.2.1 Actividad biosurfactante

Para determinar la actividad biosurfactante de los aislamientos obtenidos se realizó el método colapso de gota. Todos los aislamientos se propagaron en caldo soya triplicasa (CST) por 48 h a 22°C. Para este ensayo, se colocó una gota de ~2 µl de aceite mineral y 5 µl del caldo de cultivo en la parte superior de la gota, se dejó incubar por 2 minutos a temperatura ambiente. La determinación se consideró positiva si las gotas se aplanan y se consideró negativa si la gota quedó intacta (**Figura 3**) (Morales *et al.*, 2016). Las evaluaciones se realizaron por triplicado.

Actividad Biosurfactante



Figura 3. Prueba colapso de gota para determinar la actividad biosurfactante

5.2.2.2 Actividad Lipolítica

Las cepas obtenidas del punto 5.2.1 se propagaron en CST a 22°C por 48 h. Para el análisis se prepararon placas con 10 g de Peptona, 5 g de NaCl₂, 0.1 g de CaCl₂, 10 ml de Tween 80 y 15 g de Agar bacteriológico por litro. En las placas se colocaron discos de ~3 mm de papel filtro previamente esterilizados. Las placas fueron inoculadas con ~ 20 µl del caldo sobre los discos de papel filtro. Las placas se incubaron a 22°C por 5 días y se evaluó la formación de un halo o zona clara alrededor de las colonias para determinar como positiva la prueba (Wang *et al.*, 2017). Los experimentos se realizaron por triplicado.

5.2.2.3 Actividad Proteolítica

Para determinar la actividad proteolítica de los aislamientos, todas las cepas se propagarán en CST a 22°C por 48 horas. Para el análisis las placas de prepararon con agar nutritivo suplementado al 2% con leche descremada en polvo (Andreani *et al.*, 2016). La inoculación se realizó como la actividad lipolítica previamente descrita. Las placas se incubaron a 22°C por 5 días y se evaluó la formación de un halo o zona clara alrededor de las colonias para determinar como positiva la prueba. Los experimentos se realizaron por triplicado.

5.2.3 Identificación de genes funcionales para el deterioro

Con la finalidad de identificar genes asociados al deterioro, se realizó una búsqueda exhaustiva en la literatura de las enzimas asociadas al deterioro y de los genes que codifican para estas proteínas. Se identificó el tipo de proteína para la que codifican los genes, el número de acceso y el tamaño de la secuencia (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Genes que codifican para enzimas asociadas al deterioro

Genes	Código de Acceso	Id protein	Referencias
<i>AprX</i>	DQ146945.2	AAZ76880.1	Martins <i>et al.</i> , 2015, 2005; Marchand <i>et al.</i> , 2009; Caldera <i>et al.</i> , 2016
<i>KB-Lip</i>	AB063391	BAB64913.1	Rashid <i>et al.</i> , 2001; Martins <i>et al.</i> , 2015; Neewm <i>et al.</i> , 2001; Son <i>et al.</i> , 2002
<i>rhIA</i>	CP00011.2	Q51559	Rahim <i>et al.</i> , 2001; Lescic <i>et al.</i> , 2010; Winsor <i>et al.</i> , 2005
<i>rhIB</i>	Q51559	AAG06867.1	Wittgens <i>et al.</i> , 2017; Nelson <i>et al.</i> , 2002
<i>EstA</i>	AF005091.1	AAB61674.1	Wilhem <i>et al.</i> , 2007; Winsor <i>et al.</i> , 2009; Tielezn <i>et al.</i> , 2010

Una vez identificados los genes asociados al deterioro se analizaron con la base de datos de los genomas completos de *Pseudomonas*.

5.2.4 Análisis de los genomas de *Pseudomonas*

Se realizó una base de datos con los genomas completos de *Pseudomonas* reportados en el GenBank-NCBI, para lograr este objetivo se utilizó una secuencia de referencia de *Pseudomonas* del gen 16S *rRNA*, (**Cuadro 2**), esta se obtuvo en el programa Ribosomal Data Base Project. Con la secuencia de referencia, se identificaron los genomas de *Pseudomonas* en la página del NCBI, eligiendo secuencias con un rango de entre 3,000,000 a 7,000,000 de pares de bases.

Cuadro 2. Identificación de genoma de *Pseudomonas* de referencia

1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain FDAARGOS_571 chromosome, complete genome
6,999,770 bp circular DNA
CP033833.1 GI:1519117106

Los códigos de las secuencias que cumplieron con el rango fueron descargados y analizados en un archivo de Excel; estas se evaluaron con la secuencia de referencia del gen *16S rRNA* para corroborar que las secuencias fueran identificadas en la base de datos del NCBI mediante la herramienta BLAST. Se obtuvieron 738 secuencias, estas fueron analizadas con los genes constitutivos para el género *Pseudomonas* (**Cuadro 3**), los cuales se obtuvieron del Multilocus Sequences Typing.

Cuadro 3. Genes constitutivos del género *Pseudomonas*

Genes Constitutivos
<i>acsA</i> (Acetyl coenzyme A synthetase)
<i>aroE</i> (Shikimate dehydrogenase)
<i>guaA</i> (GMP synthase)
<i>mutL</i> (DNA mismatch repair protein)
<i>nuoD</i> (NADH dehydrogenase I chain C, D)
<i>ppsA</i> (Phosphoenolpyruvate synthase)
<i>trpE</i> (Anthralite synthetase component I)

Se obtuvieron 731 secuencias (99 %) con las que se generó la base de datos de los genomas completos de *Pseudomonas*. Se realizó un análisis de las secuencias para identificar la diversidad de especies del género *Pseudomonas* (**Cuadro 4**), esta información se utilizó para poder hacer el análisis de los genes asociados al deterioro.

Cuadro 4. Diversidad de genes completos de Pseudomonas

Especie	Cantidad de genomas	Especie	Cantidad de genomas
<i>aeruginosa</i>	276	<i>agarici</i>	1
<i>putida</i>	38	<i>alcaligenes</i>	1
<i>syringae</i>	37	<i>alcaliphila</i>	1
<i>chlororaphis</i>	32	<i>asplenii</i>	1
<i>fluorescens</i>	29	<i>asturiensis</i>	1
<i>stutzeri</i>	20	<i>avellanae</i>	1
<i>synxantha</i>	9	<i>brenneri</i>	1
<i>monteilii</i>	8	<i>cedrina</i>	1
<i>brassicacearum</i>	7	<i>cerasi</i>	1
<i>mendocina</i>	7	<i>cichorii</i>	1
<i>orientalis</i>	6	<i>citronellolis</i>	1
<i>amygdali</i>	4	<i>cremoricolorata</i>	1
<i>azotofromans</i>	4	<i>extremaustralis</i>	1
<i>fragi</i>	4	<i>extremorientalis</i>	1
<i>koreensis</i>	4	<i>furukawaii</i>	1
<i>protegens</i>	4	<i>fuscovaginae</i>	1
<i>coronafaciens</i>	3	<i>graminis</i>	1
<i>entomophila</i>	3	<i>granadensis</i>	1
<i>frederiksbergensis</i>	3	<i>guangdongensis</i>	1
<i>fulva</i>	3	<i>kribbensis</i>	1
<i>oryzihabitans</i>	3	<i>litoralis</i>	1
<i>paraFulva</i>	3	<i>luteola</i>	1
<i>simiae</i>	3	<i>mandelii</i>	1
<i>thivervalensis</i>	3	<i>moraviensis</i>	1
<i>alkylphenolica</i>	2	<i>multiresinivorans</i>	1
<i>antarctica</i>	2	<i>nitroreducens</i>	1
<i>arsenicoxydans</i>	2	<i>oleovorans</i>	1
<i>balearica</i>	2	<i>oryzae</i>	1
<i>corrugata</i>	2	<i>otitidis</i>	1
<i>denitrificans</i>	2	<i>palleroniana</i>	1
<i>knackmussii</i>	2	<i>pelagia</i>	1
<i>libanensis</i>	2	<i>pohangensis</i>	1
<i>lini</i>	2	<i>prosekii</i>	1
<i>lurida</i>	2	<i>reinekei</i>	1
<i>mediterranea</i>	2	<i>resinovorans</i>	1
<i>mosselii</i>	2	<i>rhizosphaerae</i>	1
<i>mucidolens</i>	2	<i>sabulinigri</i>	1
<i>plecoglossida</i>	2	<i>salegens</i>	1
<i>poae</i>	2	<i>sihuiensis</i>	1
<i>pseudoalcaligene</i>	2	<i>silesiensis</i>	1
<i>psychrophila</i>	2	<i>soli</i>	1
<i>psychrotolerans</i>	2	<i>tolaasii</i>	1
<i>rhodesiae</i>	2	<i>vancouverensis</i>	1
<i>savastanoi</i>	2	<i>viridiflava</i>	1
<i>taetrolens</i>	2	<i>xanthomarina</i>	1
<i>trivialis</i>	2	<i>xinjiangensis</i>	1
<i>umsongensis</i>	2	<i>yamanorum</i>	1
<i>veronii</i>	2		

5.2.5 Análisis de los genes asociados al deterioro en el género *Pseudomonas*.

Una vez identificados los códigos de acceso de cada uno de los genes asociados al deterioro (**Cuadro 5**), las secuencias de cada uno de los genes fueron analizadas con los 731 genomas completos de *Pseudomonas* previamente obtenidos. Se seleccionaron las secuencias que cumplieron con el 70% de porcentaje de identidad (percentage identity) y el 70% de cobertura (query coverage) (**Cuadro 5**). Las secuencias que cumplieron con el 70 – 70% fueron descargadas y alineadas con el programa MEGA 10 (Tamura *et al.*, 2013). Se seleccionaron secuencias significativas con una homología del 100% y se identificó la diversidad de especies del género *Pseudomonas* para cada uno de los genes para generar una base de datos y hacer los análisis posteriores.

Cuadro 5. Genes identificados en genomas completos de *Pseudomonas*

Gen	Secuencias identificadas	Secuencias al 70 - 70%	Tamaño (pb)
<i>AprX</i>	694	215	711
<i>Kb-lip</i>	407	169	1368
<i>estA</i>	668	277	1938
<i>rhlA</i>	688	278	885
<i>rhlB</i>	100	64	711

5.2.6 Identificación y especificidad de iniciadores de PCR para genes asociados al deterioro

Con la finalidad de identificar iniciadores universales para cada uno de los genes seleccionados, se realizó una búsqueda exhaustiva en la literatura de los iniciadores para cada uno de los genes (**Cuadro 6**). Se evaluó la especificidad de los iniciadores, para lograr este objetivo, los oligonucleótidos fueron sometidos a un ensayo de *PCR in silico* con la ayuda del programa *In Silico PCR amplification* (Tamura *et al.*, 2013)

Cuadro 6. Iniciadores de genes asociados al deterioro

Gen	Nombre	Secuencia	Referencias
<i>AprX</i>	SM2F	AAATCGATAGCTTCAGCCAT	Caldera <i>et al.</i> , 2016
	SM3R	TTGAGGTTGATCTTCTGGTT	
	FP apr I	TAYGGBTTCAAYTCCAAYAC	Scatamburlo <i>et al.</i> , 2015
	RF apr II	VGCGATSGAMACRTRCC	
<i>rhlA</i>	RhIAF	GCGCGAAAGTCTGTTGGTATC	Shatila <i>et al.</i> , 2020
	RhIAR	GCTGATGGTTGCTGGCTTTC	
<i>estA</i>	EstR	GACACCCGCACCCGCTGCAAC	Wilhem <i>et al.</i> , 2007
	Est F	GCGCTACATCGTGGTCTGG	
<i>kb-lip</i>	kb-lip-F	CACAACCTSGATAACGGBTT	Yamashiro <i>et al.</i> , 2013
	kb-lip-R	TCGCGGATCGTGTCATTGCC	
<i>rhlB</i>	rhIBF	GTGAGGTTGATYTTCTGGTT	Shanina <i>et al.</i> , 2013
	rhIBR	GTGGCCAGCGAAGCCAT	

La eficiencia se evaluó con la capacidad de los iniciadores para reconocer su secuencia blanco. Se utilizaron las secuencias representativas de cada gen previamente obtenidas. Se hicieron diferentes combinaciones para obtener el mayor número de aciertos (secuencias detectadas) entre el total de secuencias objetivo-existentes en nuestra base de datos. Se modificaron pares de bases de algunos iniciadores con el objetivo de incrementar su especificidad (**Cuadro 7**).

Cuadro 7. Iniciadores con modificaciones de genes asociados al deterioro

Gen	Nombre	Secuencia	Referencias
<i>AprX</i>	SM2F	AAATCGATAGCTTCAGCCAT	Caldera <i>et al.</i> , 2016
	SM3R	KTGAGGTTGATYTTCTGGTT	
<i>rhlA</i>	RhIAF	GCGCGAAAGTCTGTTGGTATC	Shatila <i>et al.</i> , 2020
	RhIAR	GCTGATGGTTGCTGGCTTTC	
<i>estA</i>	EstR	GCGGACACCAACGGCCAYCT	Wilhem <i>et al.</i> , 2007
	Est F	GCGCTACATCGTGGTCTGG	
<i>kb-lip</i>	kb-lip-F	CACAACCTSGATAACGGBTT	Yamashiro <i>et al.</i> , 2013
	kb-lip-R	TCGCGRABBGTTGTCRTRCC	
<i>rhlB</i>	rhIBF	KTGAGGTTKATYTTCTGGTT	Shanina <i>et al.</i> , 2013
	rhIBR	GTGGCCAGCGAAGCCAT	

5.2.7 Estandarización de ensayos moleculares para la detección de genes asociados al deterioro.

- a) Muestras: Se utilizó ADN que se obtuvo previamente (**punto 6.8**) y se realizó una mezcla de 4 aislamientos identificados como *Pseudomonas*.

- b) Iniciadores: Se utilizó el set de iniciadores: *SM2F* – *SM3R* (para el gen *AprX*), *RhIAF* – *RhIAR* (para el gen *rhIA*), *ESTR* – *ESTF* (para el gen *estA*), *kb-lip F* – *kb-lip R* (para el gen *kb-lip*) y *rhIB F* – *rhIB R* (para el gen *rhIb*)
- c) Validación de iniciadores de la PCR: Para optimizar la amplificación de la PCR se realizó un ensayo de gradiente de temperatura para identificar la mejor temperatura de alineación de los oligonucleótidos. Las temperaturas evaluadas fueron 60, 59.3, 58.1, 56.3, 54, 52.3, 50.9 y 50°C, con el siguiente protocolo: desnaturalización inicial a 94°C por 1 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 20 s, alineación de 50.9°C por 20 s, una extensión de 72°C por 20 s y extensión final a 72°C por 45 s.

5.2.8 Ensayo de PCR para la identificación del gen *Aprx* en aislamientos de carne de pollo deteriorada.

Se realizó el ensayo de PCR con la pareja de iniciadores *SM2F* (AAATCGATAGCTTCAGCCAT) y *SM3R* (TTGAGGTTGATCTTCTGGTT) (Caldera *et al.*, 2016) , las condiciones del ensayo de PCR: desnaturalización inicial a 94°C por 1 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 20 s, alineación de 59.3°C por 20 s, una extensión de 72°C por 20 s y extensión final a 72°C por 45 s. La especificidad de los productos amplificados fue evaluada mediante electroforesis en un gel de agarosa a una concentración de 1.5 %, con un tamaño de amplicón esperado de 850 pb.

5.2.9 Ensayo de la capacidad deterioradora de aislamientos oligotróficos y psicrótrofos

Con la finalidad de evaluar la capacidad deterioradora de las cepas identificadas, se realizó un ensayo con todos los aislamientos psicrótrofos y oligotróficos obtenidos en el punto **5.2.1**. Se utilizó pechuga de pollo sin piel que se obtuvo de un supermercado de la ciudad de Querétaro. Para bajar las cargas microbianas, los trozos de pechuga de pollo se lavaron 5 veces con agua destilada estéril, se sumergió durante 1 min en alcohol etílico al 97% para después pasarlo por fuego; posteriormente se cortaron las secciones del tejido expuesto al fuego con un bisturí

estéril (Hwang *et al.*, 2015). Las muestras se colocaron en bolsas de polietileno estériles y fueron inoculadas a una concentración ~4.0 log CFU/g con cada uno de los asilamientos previamente obtenidos.

Las muestras se almacenaron a 4 °C por 8 días y posteriormente se midió la concentración del TVB-N al día 8 de almacenamiento con el método microdifusión de Conway. Para esto, se homogeneizó 15 ml de agua destilada con 5 g de muestra en una licuadora durante 1 min, después se adicionó agua destilada hasta alcanzar un volumen final de 50 ml. El homogeneizado se pasó por papel filtro (Whatman No.1). En el espacio externo de la cámara de Conway se colocó 1 ml del filtrado y en el espacio interno se colocó 1 ml de H₃BO₃ al 0.01N y 200 µl del reagente de Conway (0.066% de rojo de metilo en etanol: 0.066% de verde de bromocresol en etanol = 1:1). Posteriormente se adicionó 1 ml de K₂CO₃ saturado en el espacio exterior de la cámara e inmediatamente se cerró. La concentración de TVB-N se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\text{TVB - N \%mg} = \frac{(a - b) \times f \times 28.014 \times 100}{S}$$

Dónde:

S = tamaño de la muestra en gramos,

a = volumen (ml) de H₂SO₄ adicionados a la muestra,

b = volumen (ml) de H₂SO₄ adicionados al blanco, y

f = factor estándar de H₂SO₄.

Análisis estadísticos

Para los parámetros fisicoquímicos las mediciones se harán por triplicado y se reportará la media ± el error estándar, el análisis estadístico se realizará por medio de un análisis de varianza y una prueba de Fisher con una $p = 0.05$ con el programSTAT Graphics.

6. Resultados y Discusión

6.1 Diversidad de microorganismos asociados al deterioro

Se ha reportado que medios de agar convencionales no permiten recuperar bacterias con potencial para causar deterioro en la carne (Boziaris and Parlapani, 2017), por lo que se desarrolló una nueva estrategia microbiológica. Con la finalidad de tener una mayor diversidad de bacterias, se obtuvieron aislamientos de medios oligotróficos de la carne de pollo almacenada a los días 0, 4, 8 y 10. Un total de 100 aislamientos fueron reconocidos con la secuenciación del gen *16S rRNA*. Se pudieron identificar 8 familias bacterianas (**Figura 4**), de las cuales, dos de ellas no se han asociado al deterioro de carne de pollo, *Micrococcaceae* y *Caulobacteraceae*; la mayoría de los aislamientos (75%) pertenecieron al género *Pseudomonas*.

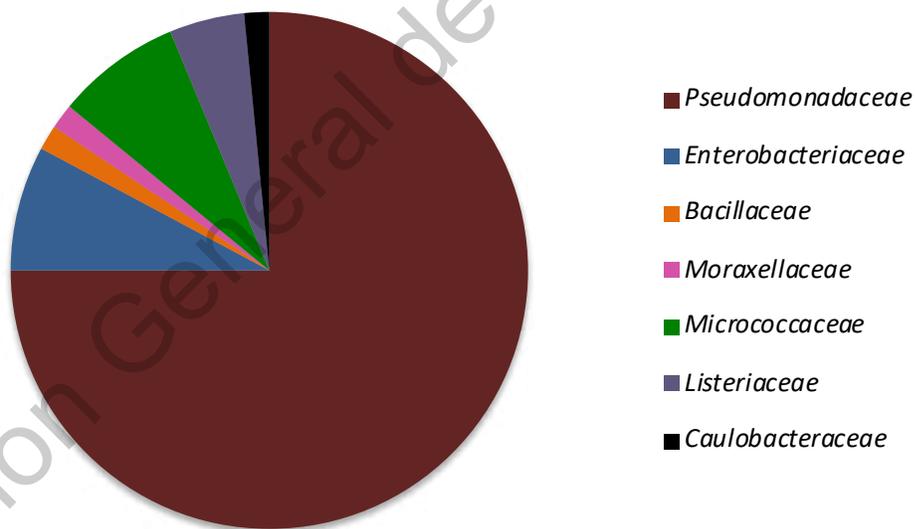


Figura 4. Diversidad de bacterias oligotróficas obtenidas de carne de pollo deteriorada, $n= 100$

6.1.1 Diversidad de microorganismos por día de aislamiento

Se identificó una mayor diversidad de familias en aislamientos del día 14 de almacenamiento (*Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Listeriaceae* y *Micrococcaceae*) en comparación con los del día 8, que sólo se pudieron identificar dos familias (**Figura 5**). Además se identificó *Arthobacter*, un organismo que se ha aislado en productos cárnicos frescos (Chaillou et al., 2015); sin embargo, no se había reportado en aislamientos de carne de pollo deteriorada. Por otro lado, *Brevundimonas* miembro de la familia *Calubacteraceae* no se había asociado al deterioro en carne de pollo, generalmente se puede aislar en medios acuáticos (Joshi y Chien, 2016) Es una bacteria reconocida por crecer en ambientes oligotróficos y crecer en condiciones de bajos nutrientes por largo tiempo (Garrity et al., 2015). Estos resultados sugieren que la diversidad encontrada en este ensayo se debe principalmente al uso de medios no convencionales.

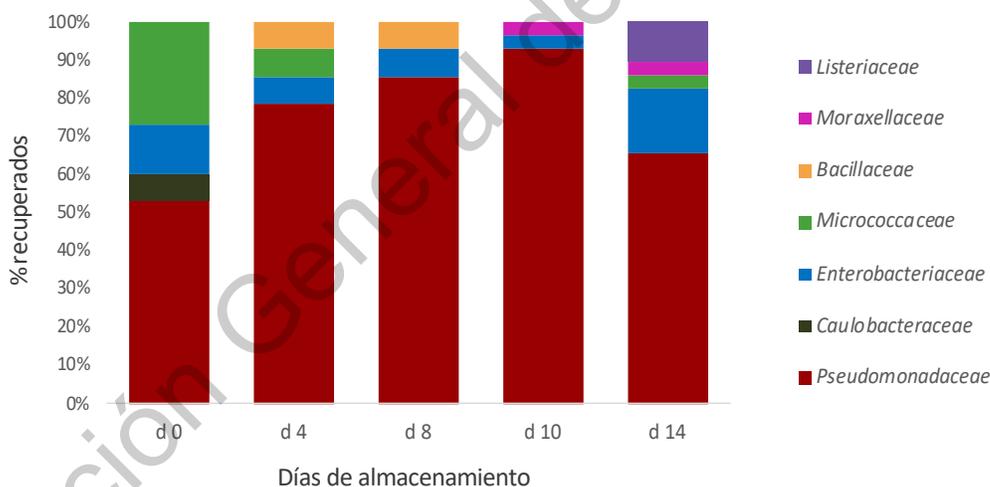


Figura 5. Diversidad de aislamientos oligotróficos obtenidos de carne de pollo deteriorada por día

6.2 Capacidad deterioradora de aislamientos oligotróficos y psicrótrofos obtenidos de pollo deteriorado.

Una vez identificados los aislamientos, estos se sometieron al ensayo de deterioro previamente descrito para evaluar la concentración de TVB-N y poder clasificar los microorganismos en BAD o BCD. Se considero BCD a los microorganismos con una concentración >35 mg TVB-N / 100 g (Zhang *et al.*, 2012), de manera que se identificó que el 35% de los aislamientos tienen la capacidad de deteriorar (BCD) (Figura 6).

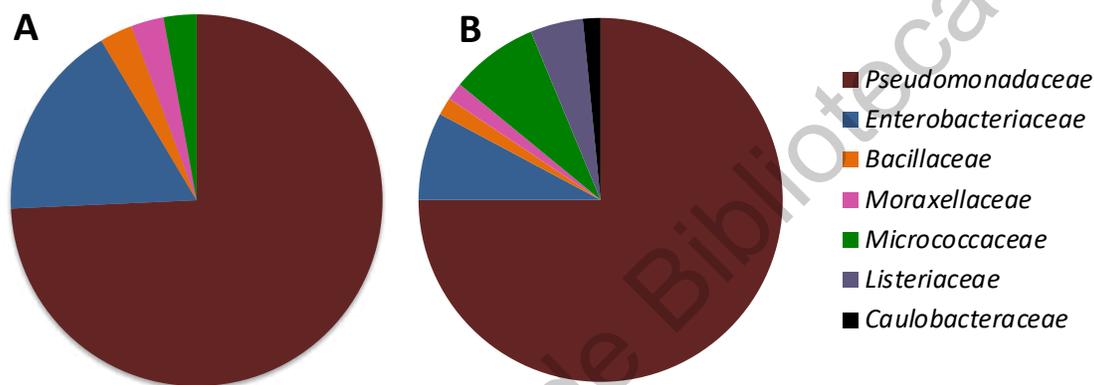


Figura 6. Capacidad de deteriorar de aislamientos inoculados en carne de pollo. (A) diversidad de aislamientos con capacidad para deteriorar (BCD), n=35, (B) Diversidad de familias de bacterias asociadas al deterioro (BAD), n=65.

Es importante destacar que el grupo de Bacterias Asociadas al Deterioro (BAD) tienen una mayor diversidad (7/7), mientras que las Bacterias que Causan Deterioro (BCD) presenta una menor diversidad (5/7), siendo *Pseudomonas* el género predominante en ambos casos. En el caso de las más BCD, el 77 % pertenecen a la familia *Pseudomonadaceae*; se ha descrito en otros estudios que *Pseudomonas* es la bacteria más predominante durante el deterioro debido a su bajo requisito nutricional y su versatilidad metabólica que le permite desarrollarse en diversos ambientes (Caldera *et al.*, 2016).

De igual manera, se analizaron las BAD y BCD por familia, en el caso de la familia *Pseudomonadaceae* se identificó que el 31% (31/79) tienen la capacidad de deteriorar, para la familia *Enterobacteriaceae* el 46% (6/13), *Micrococcaceae* 16% (1/6), *Moraxellaceae* y *Bacillaceae* 50% (1/2) y finalmente *Listeriaceae* y *Caulobacteraceae* el 0%. En resumen, estos resultados evidencian que miembros de la misma familia cuentan con un metabolismo distinto, por ejemplo, en *Pseudomonas* algunos miembros pueden causar deterioro (PCD) y otros se asocian al deterioro (PAD), sin embargo, esto no significa que sea excluyente uno del otro. Estos resultados indican que aislamientos pertenecientes al mismo género tiene potenciales metabólicos distintos, como es el caso de *Pseudomonas* (**Cuadro 8**). Esto fue reportado previamente por Wang *et al.*, (2017), donde se inoculó carne de pollo con dos cepas de *Pseudomonas* (*P. fragi* y *P. fluorescens*). *P. fragi* alcanzó niveles superiores a 20 mg / 100 g de TVB-N al día 4 mientras el pollo inoculado con *P. fluorescens* no superó los 20 mg / 100 g de TVB-N.

Cuadro 8. Diversidad de familias que causan deterioro

Familia	# Aislamientos	Causan deterioro	No Causan deterioro
<i>Pseudomonadaceae</i>	79	31	48
<i>Enterobacteriaceae</i>	13	6	7
<i>Micrococcaceae</i>	6	1	5
<i>Listeriaceae</i>	3	0	3
<i>Moraxellaceae</i>	2	1	1
<i>Bacillaceae</i>	2	1	1
<i>Caulobacteraceae</i>	1	0	1

6.3 Capacidad metabólica de las bacterias asociadas al deterioro.

Se evaluó la actividad metabólica de las *Pseudomonas* que causan deterioro (PCD) y las *Pseudomonas* Asociadas al deterioro (PAD) obtenidas de carne de pollo (**Cuadro 9**). Para la actividad lipolítica y proteolítica se midió el halo de inhibición (mm), esto debido a que el diámetro del halo es más grande cuando existe una mayor concentración de la enzima (Samad *et al.*, 1989). El análisis se realizó para los aislamientos del género *Pseudomonas* (79%), estas fueron clasificadas por su

capacidad de deteriorar, TVB-N > 35 mg, como Bacterias que Causan el Deterioro (BCD) y Bacterias Asociadas al deterioro (BAD), TVB-N < 35 mg.

6.3.1 Actividad proteolítica en las Bacterias asociadas al deterioro

Para la actividad proteolítica se midió el halo de inhibición, el promedio en mm para las BCD fue de 1.2 mm, mientras que para las BAD fue de 0.5 mm (**Figura 7A**), por lo que se sugiere que la actividad proteolítica está más relacionada a las BCD. Se observó un aumento significativo en la actividad proteolítica en las BCD en comparación de las BAD. En otros estudios se ha asociado la actividad proteolítica de las *Pseudomonas* en productos cárnicos durante el deterioro (Ercolini *et al.*, 2010.). Por ejemplo, Wang *et al.* (2017) realizó un experimento de carne de pollo inoculada (*P. fluorescens*, *P. fragi*, *Shewanella liquefaciens* y *Aeromonas salmonicida*), donde se evaluó la actividad proteolítica y la concentración de TVB-N al día 6 de almacenamiento, encontró que el pollo inoculado con *Aeromonas* tuvo valores más altos de actividad proteolítica (19 mm del halo de inhibición), sin embargo no logró alcanzar niveles de deterioro (25 mg /100g de TVB-N), mientras que el pollo inoculado con *P. fragi* presentó una actividad proteolítica moderada (21.8 mm) pero una alta capacidad de deteriorar (45.3 mg /100g de TVB-N). Estos datos sugieren que, en la colección de aislamientos analizada, la actividad proteolítica está relacionada con la capacidad para deteriorar de las bacterias.

Cuadro 9. Actividad proteolítica, lipolítica, biosurfactante, TVB-N de *Pseudomonas*

Identificación	TVB-N	Actividad		
		Biosurfactante	Proteolítica	Lipolítica
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	++	+
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	-	+
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	++	-
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	++	++
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	+	+
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	+	++	+
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	+++	++
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	+++	+++
<i>Pseudomonadaceae</i>	+	-	+++	+++
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	+	+	+++
<i>Pseudomonadaceae</i>	+	+	+++	-
<i>Pseudomonadaceae</i>	+	+	++	+
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	++	++
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	+	+
<i>Pseudomonadaceae</i>	+	-	+++	++
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	+	-	-
<i>Pseudomonadaceae</i>	+	+	+++	++
<i>Pseudomonadaceae</i>	+	+	+++	+++
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	-	-
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	-	-
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	-	-
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	+++	++
<i>Pseudomonadaceae</i>	+	-	+++	++
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	++	-
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	-	-
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	-	-
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	-	-
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	-	+
<i>Pseudomonadaceae</i>	+	-	+++	+
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	+	-	-
<i>Pseudomonadaceae</i>	+	-	+	+
<i>Pseudomonadaceae</i>	+	-	++	+
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	-	+
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	++	-
<i>Pseudomonadaceae</i>	+	+	+++	-
<i>Pseudomonadaceae</i>	+	-	++	-
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	-	++
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	-	-
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	+	++	+++
<i>Pseudomonadaceae</i>	+	+	+++	+++

Identificación	TVB-N	Actividad		
		Biosurfactante	Proteolítica	Lipolítica
<i>Pseudomonadaceae</i>	+	-	++	+
<i>Pseudomonadaceae</i>	+	-	+	-
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	-	-
<i>Pseudomonadaceae</i>	+	+	+	++
<i>Pseudomonadaceae</i>	+	-	+++	+++
<i>Pseudomonadaceae</i>	+	-	++	+++
<i>Pseudomonadaceae</i>	+	-	++	++
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	+	+++
<i>Pseudomonadaceae</i>	+	-	++	++
<i>Pseudomonadaceae</i>	+	-	+	++
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	-	-
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	+	+	++
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	++	+++
<i>Pseudomonadaceae</i>	+	-	+++	-
<i>Pseudomonadaceae</i>	+	-	+++	+++
<i>Pseudomonadaceae</i>	+	+	+++	++
<i>Pseudomonadaceae</i>	+	+	+	++
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	-	-
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	-	-
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	+	++	++
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	+	+	-
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	+	+++	++
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	+	+++
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	+++	-
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	-	+
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	+	++	++
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	+	++
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	++	++
<i>Pseudomonadaceae</i>	+	-	++	++
<i>Pseudomonadaceae</i>	+	+	+++	+
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	++	++
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	+	++
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	-	-
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	-	-
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	-	+
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	-	+
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	+	++
<i>Pseudomonadaceae</i>	+	+	++	++
<i>Pseudomonadaceae</i>	+	-	+++	-
<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	-	-

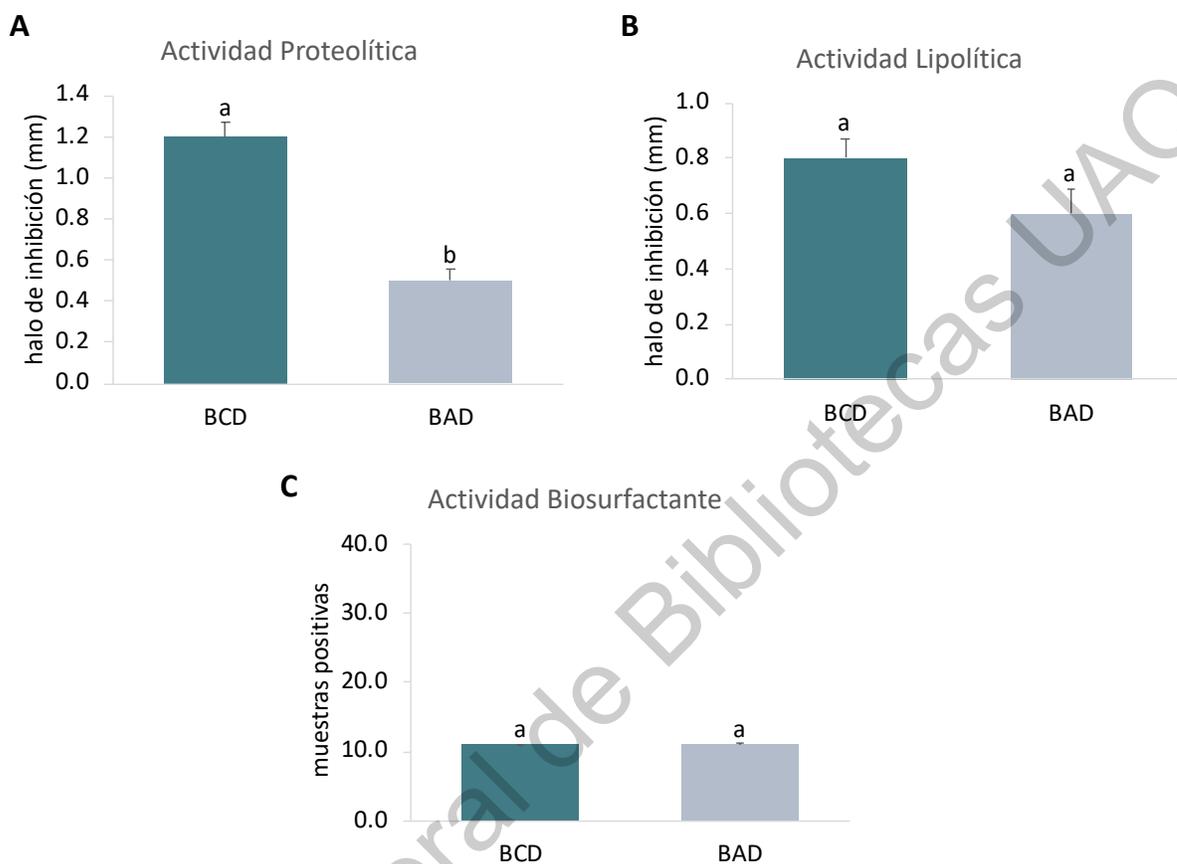


Figura 7. Actividad fenotípica de aislamientos obtenidos de carne de pollo deteriorada.

6.3.2 Actividad lipolítica en las Bacterias asociadas al deterioro

Para la actividad lipolítica, no hubo diferencia significativa entre los promedios del tamaño del halo, siendo para las BCD de 0.8 mm y para las BAD de 0.6 mm (**Figura 7B**). Estos resultados sugieren que esta actividad no está tan relacionada con el deterioro, esta información es consistente con estudio previos (Yuan *et al.*, 2018). De cualquier manera, esta actividad es de relevancia en el deterioro, debido a la hidrólisis de las grasas y los cambios oxidativos de los ácidos grasos insaturados

que se presentan durante el almacenamiento dando como resultado la formación de olores desagradables (Braun *et al.*, 2001).

6.3.3 Actividad Biosurfactante en las Bacterias asociadas al deterioro

En cuanto a la actividad biosurfactante, únicamente el 24% de los aislamientos presentaron la actividad. Para nuestra colección de aislamientos no se encontraron diferencias significativas entre las muestras positivas de las BCD (11 muestras) y las BAD (10 muestras) (**Figura 7C**). A pesar de que en estudios previos se ha asociado que el género *Pseudomonas* tiene la capacidad de producir biosurfactantes como una ventaja durante el deterioro (Rahman *et al.*, 2002), podemos concluir que esta actividad no se encuentra fuertemente asociada a las Bacterias que Causan Deterioro (BCD). Estos resultados son diferentes a lo reportado por Mellor *et al.*, (2011), donde se encontró que el 72% de las *Pseudomonas* aisladas de carne de pollo cuentan con la actividad biosurfactante. Se ha estudiado que el potencial biosurfactante (tensión superficial) en cepas de *Pseudomonas* varía sustancialmente de acuerdo al día en se aíslan las bacterias, por ejemplo, las bacterias aisladas en los últimos estadios del deterioro tienen una actividad más alta ($\sim 72 \text{ mN m}^{-1}$ de tensión superficial) en comparación con los aislados durante los primeros días ($\sim 34 \text{ mN m}^{-1}$ de tensión superficial) (Mellor *et al.*, 2011) . Si embargo en nuestra colección de aislamientos no se encontró una tendencia de la actividad biosurfactante por el día de aislamiento, y tampoco se encontró una relación entre la actividad biosurfactante y la capacidad para deteriorar.

En conjunto, los análisis sobre la actividad proteolítica, lipolítica y biosurfactante, sugieren que la capacidad metabólica varía entre organismos de la misma especie y en particular para nuestra colección de aislamientos la actividad lipolítica y proteolítica no guarda una relación con la capacidad de deteriorar.

6.4 Correlaciones entre la actividad enzimática y la concentración de TVB-N

Se realizaron análisis de correlación de Pearson para identificar asociaciones entre los aislamientos de *Pseudomonas* con capacidad deterioradora (TVB-N > 35 mg),

la actividad proteolítica (mm) y lipolítica (mm en los aislamientos asociados al deterioro. El análisis nos permitió establecer asociaciones entre parámetros analizados, por ejemplo, muy fuertes ($r = 0.9 - 1.0$), fuertes ($r = 0.7 - 0.89$), moderadas ($r = 0.4 - 0.69$), débiles ($r = 0.10 - 0.39$) y no existentes ($r = 0 - 0.10$) (Schober *et al.*, 2018).

La relación entre los valores de TVB-N y los valores de la actividad proteolítica revelaron una correlación positiva ($r = 0.5647$, $P < 0.0001$) (**Figura 8**). Estos resultados indican una correlación moderada entre los parámetros evaluados. La asociación positiva entre el TVB-N y la actividad proteolítica se puede deber a que la secreción de enzimas proteolíticas provoca una degradación celular por la hidrólisis de las proteínas en carne, dejando libres compuestos como péptidos que pueden ser utilizados por la bacterias para formar compuestos como la dimetilamina, trimetilamina y amonio (Wang *et al.*, 2017). Esta asociación también ha sido reportada en otras matrices alimentarias (Wang y Xie, 2020). Se observó que el 23% de los aislamientos no presentó correlación entre la actividad proteolítica y la concentración de TVB-N, es importante señalar que estos aislamientos tuvieron una baja concentración de TVB-N (<35 mg/ 100 g) por lo que podemos concluir que en nuestra colección de aislamientos sólo se tuvo correlación positiva en las muestras con capacidad deterioradora. Esta baja actividad proteolítica se podría deber a que las BCD inhiben la hidrólisis de las proteínas (Wang y Xie, 2020)

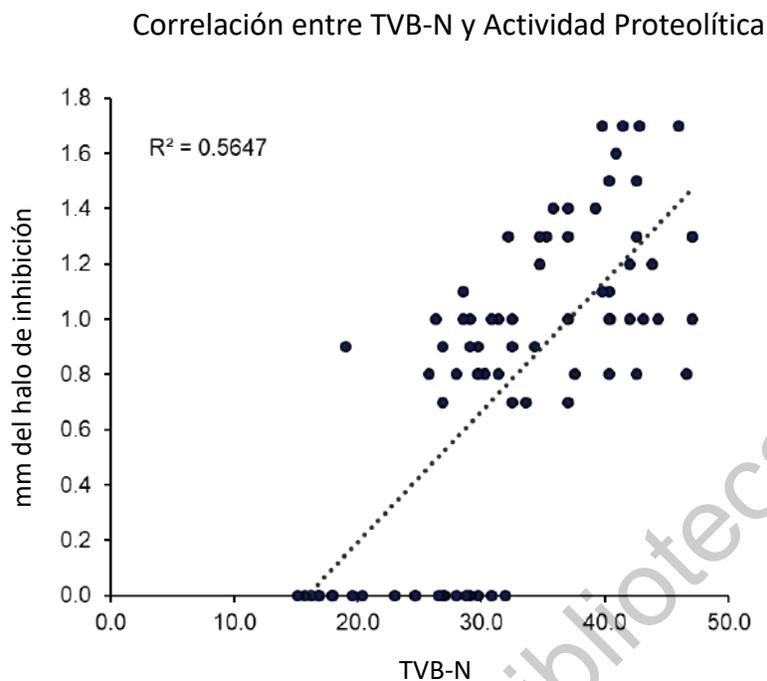


Figura 8. Correlación de Pearson entre valores de TVB-N y la actividad proteolítica en aislamientos obtenidos de carne de pollo deteriorada.

También se analizó la correlación entre los valores de TVB-N y la actividad lipolítica entre los aislamientos. Para nuestra colección de aislamientos no se observó correlación ($r = 0.0882$, $p = 0.007$), estos datos indican que no existe una asociación fuerte entre las bacterias que causan deterioro ($\text{TVB-N} > 35 \text{ mg}/100 \text{ g}$) y la actividad lipolítica (**Figura 9**). Otros estudios, bajo distintas condiciones experimentales, reportaron que la actividad lipolítica puede estar relacionada con la degradación de la piel de pollo, por lo que, tiene una relación con el deterioro. En resumen, el deterioro de la carne es el resultado de cambios fisicoquímicos, degradación y descarboxilación de péptidos, que se puede relacionar principalmente con la proteólisis. Se observó que el 18% de los aislamientos no presentó correlación entre la actividad lipolítica y la concentración de TVB-N, es importante señalar que estos aislamientos tuvieron una baja concentración de TVB-N ($< 35 \text{ mg}/100 \text{ g}$) por lo que podemos concluir que nuestra colección de aislamientos sólo se tuvo correlación positiva en las muestras con capacidad deterioradora.

Correlación entre TVB-N y Actividad Lipolítica

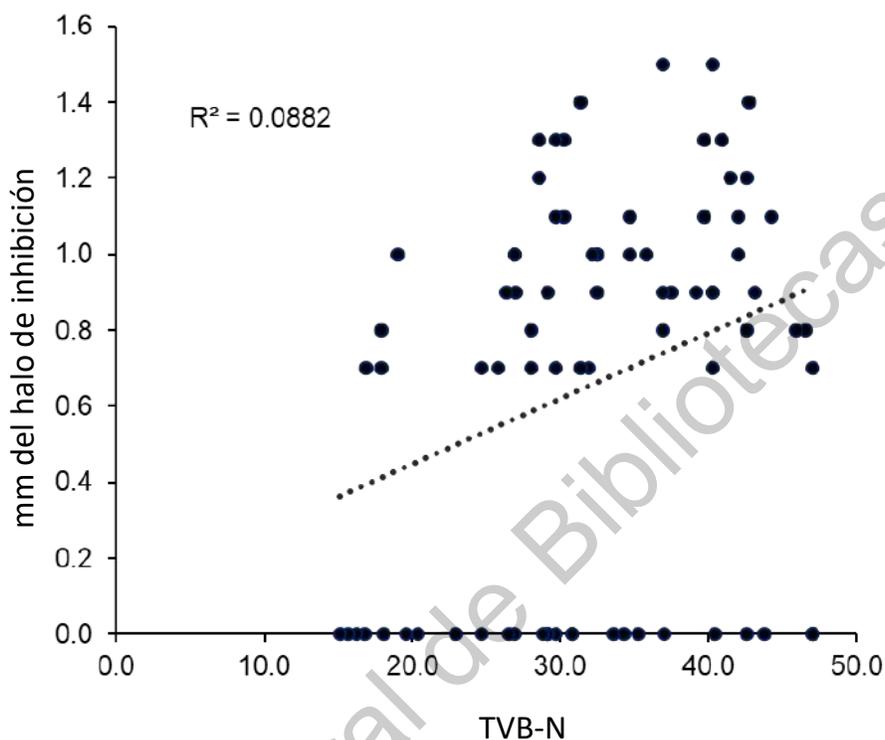


Figura 9. Correlación de Pearson entre valores de TVB-N y la actividad lipolítica en aislamientos obtenidos de carne de pollo deteriorada.

6.4 Validación de iniciadores de la PCR para la identificación de genes asociados al deterioro en aislamientos obtenidos en carne de pollo.

Con la finalidad de identificar marcadores moleculares del deterioro, se identificaron los iniciadores para cada uno de los genes propuestos y se evaluó la especificidad de los 5 pares de iniciadores (*AprX*, *kb-lip*, *estA*, *rhIB* y *rhIA*), se realizó mediante pruebas de gradientes de temperatura y usando el material genético de dos mezclas (A y B) con 6 cepas cada una, previamente identificadas como *Pseudomonas*. Para los genes *kb-lip* y *rhIA* se observaron amplicones inespecíficos (para los genes *rhIB* y *EstA* no se observó amplificación) (**Figura 10**). A pesar de implementar diferentes

protocolos de PCR y diferentes enzimas de *Taq*- DNA polimerasa, se siguieron observando amplicones inespecíficos. En conjunto, estos datos sugieren que los iniciadores utilizados no fueron los adecuados y se necesitan estudios adicionales para seleccionar y estandarizar la PCR para nuevos oligonucleótidos.

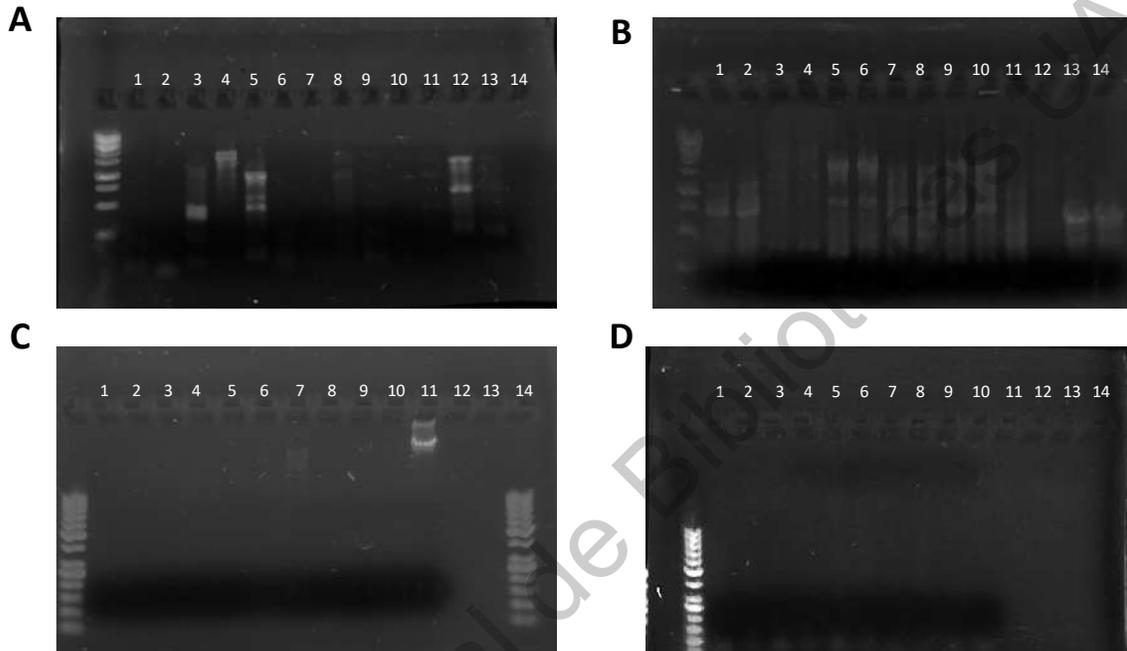


Figura 10. PCR para los genes asociados al deterioro. (A) gen *Kb-lip*, peso esperado 1112 pb, (B) gen *rhIA*, peso estimado 523 pb, (C) gen *estA*, peso estimado 820 pb y (D) gen *rhIB*, peso estimado 416 pb.

La especificidad de los iniciadores del gen *AprX*, *SM2R* y *SM3F* (Caldera *et al.*, 2016) se analizaron con pruebas de gradientes de temperatura, se observó que a la temperatura de alineación de 59.3°C la amplificación de gen *Aprx* fue específica (Figura 11), por lo tanto, esta fue la temperatura utilizada para el protocolo.

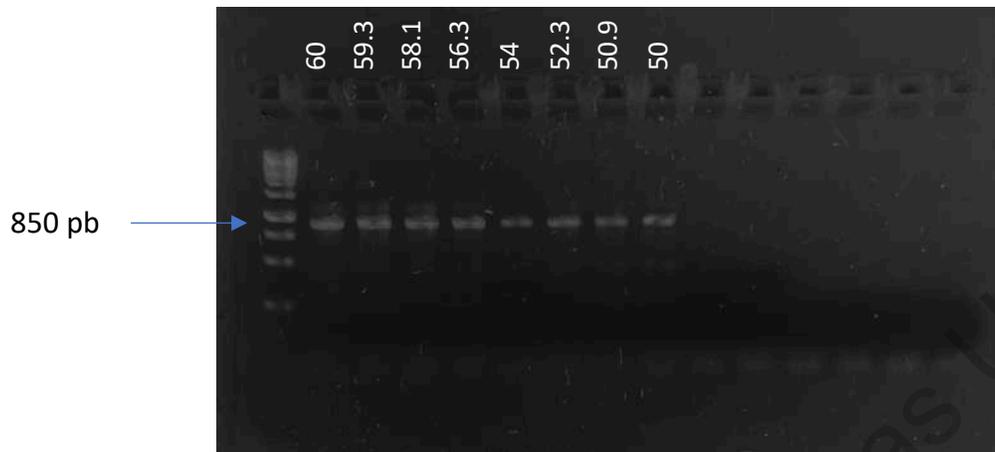


Figura 11. Gradiente de temperatura para la PCR del gen *AprX* (850pb). Se utilizó la mezcla A de 6 aislamientos de *Pseudomonas*. Los productos se corrieron en un gel de agarosa a una concentración de 1.5%.

6.5 Identificación del gen *AprX* en aislamientos de carne de pollo deteriorada.

Para la identificación del gen *AprX* en los aislamientos de carne de pollo, se utilizó el ADN previamente obtenido de cada una de las cepas y se realizó el protocolo seleccionado para el gen *AprX*. Se obtuvo una prevalencia del gen *Aprx* del 56 % de los aislamientos con un amplicón específico de 850 pb (**Figura 12**). Los productos obtenidos fueron confirmados para el gen *AprX* a través de secuenciación. Estos resultados sugieren que la variabilidad en la presencia del gen *AprX* en el género *Pseudomonas* podría explicar las diferencias en la actividad proteolítica entre PCD y PAD (Andreani *et al.*, 2016; Caldera *et al.*, 2016). Por otro lado, en estudios previos se ha reportado que la presencia del gen *AprX* en aislamientos de *Pseudomonas*, pudiera estar condicionada por la matriz alimentaria de donde provienen, por ejemplo, Caldera, *et al.*, (2016) reportaron que, en *Pseudomonas* obtenidas de carne de pollo, el gen *AprX* se encuentra únicamente en el 30% de los asilamientos, mientras que, en aislamientos provenientes de productos lácteos, leche y vegetales la presencia del gen es de 52, 33 y 58 % respectivamente. Estos resultados son similares a los reportados por (Ercolini *et al.*, 2010) donde sólo el 14% de los aislamientos de *Pseudomonas* mostraron la presencia del gen *AprX*. En conjunto estos resultados sugieren que el gen *AprX* es

un marcador del deterioro ya que se encuentra relacionado con la capacidad deterioradora, sin embargo, se sugiere que las bacterias que causan deterioro deben contener más genes asociados al deterioro.



Figura 12. PCR para el gen *AprX* en aislamientos obtenidos de carne de pollo deteriorado

9. Conclusiones

En el presente estudio se identificaron dos grupos bacterianos en la carne de pollo deteriorado, Bacterias Asociadas al deterioro y Bacterias Específicas (causantes) del Deterioro. Los experimentos realizados demostraron que el género *Pseudomonas* es el principal microorganismo en el deterioro de la carne de pollo, se identificaron dos grupos a través de la medición de la concentración de TVB-N, *Pseudomonas* que causan deterioro (PCD) y *Pseudomonas* Asociadas al deterioro (PAD), 31% y 69% respectivamente.

Basado en los análisis fenotípicos de nuestra colección de aislamientos, hay evidencia que la actividad proteolítica se encuentra fuertemente asociada al deterioro, en comparación con la actividad lipolítica y biosurfactante. También se identificó una correlación positiva entre la presencia del gen *AprX* y las PCD, sin embargo, se sugieren que la actividad proteolítica asociada al deterioro no solo depende del gen *AprX*, debido a que se identificaron PCD con actividad proteolítica y sin la presencia del gen *AprX*. Así mismo en la caracterización genética de los aislamientos no se puede establecer una relación con el deterioro y los genes asociados a la actividad lipolítica (*Kb-lip*) y la actividad biosurfactante (*rhIA*, *estA*, *rhIB*).

Este estudio enfatiza la importancia del género *Pseudomonas* por su gran versatilidad para desarrollarse en ambientes adversos y establece las bases para el estudio del potencial metabólico de las PCD en carne de pollo. Estos datos permitirán establecer medidas para su identificación a través del potencial proteolítico, con la identificación del gen *AprX* y sientan las bases para seguir buscando genes asociados al deterioro que nos permitan dilucidar el metabolismo de *Pseudomonas* con capacidad para deteriorar.

10. Referencias

- Abdel-Mawgoud, A.M., Lépine, F., Déziel, E., 2010. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl Microbiol Biotechnol* 86, 1323–1336. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2498-2>
- Ammor, M.S., Michaelidis, C., Nychas, G.-J.E., 2008. Insights into the role of quorum sensing in food spoilage. *J. Food Prot.* 71, 1510–1525. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-71.7.1510>
- Andreani, N.A., Carraro, L., Fasolato, L., Balzan, S., Lucchini, R., Novelli, E., Cardazzo, B., 2016. Characterisation of the Thermostable Protease AprX in Strains of *Pseudomonas Fluorescens* and Impact on the Shelf-life of Dairy Products: Preliminary Results. *Ital J Food Saf* 5, 6175. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2016.6175>
- Bekhit, A.E.-D.A., Holman, B.W.B., Giteru, S.G., Hopkins, D.L., 2021. Total volatile basic nitrogen (TVB-N) and its role in meat spoilage: A review. *Trends in Food Science & Technology* 109, 280–302. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.006>
- Boles, B.R., Thoendel, M., Singh, P.K., 2005. Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Mol Microbiol* 57, 1210–1223. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04743.x>
- Boziaris, I.S., Parlapani, F.F., 2017. Specific Spoilage Organisms (SSOs) in Fish, in: *The Microbiological Quality of Food*. Elsevier, pp. 61–98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100502-6.00006-6>
- Braun, P., Balzer, G., Fehlhaber, K., 2001. Activity of bacterial lipases at chilling temperatures. *Food Microbiology* 18, 211–215. <https://doi.org/10.1006/fmic.2000.0393>
- Broekaert, K., Heyndrickx, M., Herman, L., Devlieghere, F., Vlaemynck, G., 2011. Seafood quality analysis: Molecular identification of dominant microbiota after ice storage on several general growth media. *Food Microbiol.* 28, 1162–1169. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.03.009>

- Buzby, J.C., Hyman, J., 2012. Total and per capita value of food loss in the United States. *Food Policy* 37, 561–570. <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2012.06.002>
- Caldera, L., Franzetti, L., Van Coillie, E., De Vos, P., Stragier, P., De Block, J., Heyndrickx, M., 2016. Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods. *Food Microbiology* 54, 142–153. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.004>
- Chaillou, S., Chaulot-Talmon, A., Caekebeke, H., Cardinal, M., Christieans, S., Denis, C., Hélène Desmots, M., Dousset, X., Feurer, C., Hamon, E., Joffraud, J.-J., La Carbona, S., Leroi, F., Leroy, S., Lorre, S., Mac e, S., Pilet, M.-F., Prévost, H., Rivollier, M., Roux, D., Talon, R., Zagorec, M., Champomier-Verg es, M.-C., 2015. Origin and ecological selection of core and food-specific bacterial communities associated with meat and seafood spoilage. *ISME J* 9, 1105–1118. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.202>
- Chong, H., Li, Q., 2017. Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies. *Microb Cell Fact* 16, 137. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0753-2>
- Cole, J.R., Wang, Q., Fish, J.A., Chai, B., McGarrell, D.M., Sun, Y., Brown, C.T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C.R., Tiedje, J.M., 2014. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 42, D633–D642. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1244>
- Delepelaire, P., 2004. Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1694, 149–161. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.05.001>
- Déziel, E., Lépine, F., Milot, S., Villemur, R., 2003. rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* 149, 2005–2013. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26154-0>

- Doulgeraki, A.I., Ercolini, D., Villani, F., Nychas, G.-J.E., 2012. Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 157, 130–141. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.020>
- Ercolini, D., Casaburi, A., Nasi, A., Ferrocino, I., Di Monaco, R., Ferranti, P., Mauriello, G., Villani, F., 2010. Different molecular types of *Pseudomonas fragi* have the same overall behaviour as meat spoilers. *Int. J. Food Microbiol.* 142, 120–131. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.012>
- Ercolini, D., Russo, F., Nasi, A., Ferranti, P., Villani, F., 2009. Mesophilic and Psychrotrophic Bacteria from Meat and Their Spoilage Potential In Vitro and in Beef. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1990–2001. <https://doi.org/10.1128/AEM.02762-08>
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2019, Meat Market Review, Overview of global meat market developments in 2018; disponible en: <https://www.fao.org/3/ca3880en/ca3880en.pdf>
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2015, Global Food Losses and food waste.
- FAO, 2016, What is food loss and food waste?; The 49th Session of the Committee on World Food Security; FAO.
- Flanagan, K., Robertson, K., Hanson, C., 2019. Reducing Food Loss and Waste: Setting a Global Action Agenda. WRIPUB. <https://doi.org/10.46830/wriipt.18.00130>
- Frank, J.A., Reich, C.I., Sharma, S., Weisbaum, J.S., Wilson, B.A., Olsen, G.J., 2008. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2461–2470. <https://doi.org/10.1128/AEM.02272-07>
- Garrity, G.M., Bell, J.A., Lilburn, T., 2015. Caulobacteraceae, in: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. American Cancer Society, pp. 1–1. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00162>
- Ghollasi-Mood, F., Mohsenzadeh, M., Housaindokht, M.R., Varidi, M., 2017. Microbial and chemical spoilage of chicken meat during storage at isothermal and fluctuation temperature under aerobic conditions. *Iranian Journal of*

- Gill, C.O., 1976. Substrate limitation of bacterial growth at meat surfaces. *J. Appl. Bacteriol.* 41, 401–410. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1976.tb00652.x>
- Gill, C.O., Badoni, M., 2005. Recovery of bacteria from poultry carcasses by rinsing, swabbing or excision of skin. *Food Microbiology* 22, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.04.005>
- Gorsuch, V., Alvarado, C.Z., 2010. Postrigor tumble marination strategies for improving color and water-holding capacity in normal and pale broiler breast fillets. *Poult Sci* 89, 1002–1008. <https://doi.org/10.3382/ps.2009-00023>
- Gram, L., Dalgaard, P., 2002. Fish spoilage bacteria – problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 262–266. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00309-9](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00309-9)
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J.B., Christensen, A.B., Givskov, M., 2002. Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. *International journal of food microbiology* 78, 79–97.
- Hwang, K.-E., Choi, Y.-S., Kim, H.-W., Choi, M.-S., Song, D.-H., Kim, Y.-J., Ham, Y.-K., Kim, C.-J., 2015. Combined Effects of Mugwort Herb and Vitamin C on Shelf-Life of Vacuum-Packed Seasoned Pork. *Korean J Food Sci Anim Resour* 35, 421–430. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.4.421>
- Irorere, V.U., Tripathi, L., Marchant, R., McClean, S., Banat, I.M., 2017. Microbial rhamnolipid production: a critical re-evaluation of published data and suggested future publication criteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 101, 3941–3951. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8262-0>
- Joshi, K.K., Chien, P., 2016. Regulated Proteolysis in Bacteria: Caulobacter. *Annu Rev Genet* 50, 423–445. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035235>
- Katiyo, W., Kock, H.L., Coorey, R., Buys, E., 2020. Sensory implications of chicken meat spoilage in relation to microbial and physicochemical characteristics during refrigerated storage. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109468>

- Khulal, U., Zhao, J., Hu, W., Chen, Q., 2016. Nondestructive quantifying total volatile basic nitrogen (TVB-N) content in chicken using hyperspectral imaging (HSI) technique combined with different data dimension reduction algorithms. *Food Chemistry* 197, 1191–1199. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.084>
- Konstantinidis, K.T., Tiedje, J.M., 2004. Trends between gene content and genome size in prokaryotic species with larger genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 3160–3165. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308653100>
- Kummu, M., de Moel, H., Porkka, M., Siebert, S., Varis, O., Ward, P.J., 2012. Lost food, wasted resources: Global food supply chain losses and their impacts on freshwater, cropland, and fertiliser use. *Science of The Total Environment* 438, 477–489. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.08.092>
- Luong, N.-D.M., Coroller, L., Zagorec, M., Membré, J.-M., Guillou, S., 2020. Spoilage of Chilled Fresh Meat Products during Storage: A Quantitative Analysis of Literature Data. *Microorganisms* 8, 1198. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081198>
- Machado, S.G., Heyndrickx, M., De Block, J., Devreese, B., Vandenberghe, I., Vanetti, M.C.D., Van Coillie, E., 2016. Identification and characterization of a heat-resistant protease from *Serratia liquefaciens* isolated from Brazilian cold raw milk. *Int. J. Food Microbiol.* 222, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.014>
- Małgorzata Karwowska, Łaba, S., Szczepański, K., 2021. Food Loss and Waste in Meat Sector—Why the Consumption Stage Generates the Most Losses? *Sustainability* 13, 6227. <https://doi.org/10.3390/su13116227>
- Marchand, S., Vandriesche, G., Coorevits, A., Coudijzer, K., De Jonghe, V., Dewettinck, K., De Vos, P., Devreese, B., Heyndrickx, M., De Block, J., 2009. Heterogeneity of heat-resistant proteases from milk *Pseudomonas* species. *Int J Food Microbiol* 133, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.027>
- Martinez, S., Humery, A., Groleau, M.-C., Déziel, E., 2020. Quorum Sensing Controls Both Rhamnolipid and Polyhydroxyalkanoate Production in

- Burkholderia thailandensis Through ScmR Regulation. *Front Bioeng Biotechnol* 8, 1033. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.01033>
- Martins, M.L., Pinto, U.M., Riedel, K., Vanetti, M.C.D., 2015. Milk-deteriorating exoenzymes from *Pseudomonas fluorescens* 041 isolated from refrigerated raw milk. *Braz J Microbiol* 46, 207–217. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246120130859>
- McCarthy, C.N., Woods, R.G., Beacham, I.R., 2004. Regulation of the aprX–lipA operon of *Pseudomonas fluorescens* B52: differential regulation of the proximal and distal genes, encoding protease and lipase, by ompR–envZ. *FEMS Microbiology Letters* 241, 243–248. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.10.027>
- Mellor, G.E., Bentley, J.A., Dykes, G.A., 2011. Evidence for a role of biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* in the spoilage of fresh aerobically stored chicken meat. *Food Microbiology* 28, 1101–1104. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.003>
- Meng, L., Zhang, Y., Liu, H., Zhao, S., Wang, J., Zheng, N., 2017. Characterization of *Pseudomonas* spp. and Associated Proteolytic Properties in Raw Milk Stored at Low Temperatures. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02158>
- Morales, P.A., Aguirre, J.S., Troncoso, M.R., Figueroa, G.O., 2016. Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas* spp. present in spoiled poultry fillets sold in retail settings. *LWT* 73, 609–614. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.064>
- Palomino, R.A., Romero, G., González-Valdez, A., Soberón-Chávez, G., Gutiérrez, S.M., Merino, F.A., 2017. Presencia de genes rhlAB, rhlR y rhlC en *Pseudomonas aeruginosa* nativas sobreproductoras de ramnolípidos. *Revista Peruana de Biología* 24, 293. <https://doi.org/10.15381/rpb.v24i3.13902>
- Parfitt, J., Barthel, M., Macnaughton, S., 2010. Food Waste within Food Supply Chains: Quantification and Potential for Change to 2050. *Philosophical*

- transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences 365, 3065–81. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0126>
- Pennacchia, C., Ercolini, D., Villani, F., 2011. Spoilage-related microbiota associated with chilled beef stored in air or vacuum pack. *Food Microbiology* 28, 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.08.010>
- Pothakos, V., Devlieghere, F., Villani, F., Björkroth, J., Ercolini, D., 2015. Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage. *Meat Sci.* 109, 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.04.014>
- Qiao, M., Fletcher, D.L., Smith, D.P., Northcutt, J.K., 2001. The effect of broiler breast meat color on pH, moisture, water-holding capacity, and emulsification capacity. *Poult. Sci.* 80, 676–680. <https://doi.org/10.1093/ps/80.5.676>
- Rahman, K.S.M., Rahman, T.J., McClean, S., Marchant, R., Banat, I.M., 2002. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. *Biotechnol Prog* 18, 1277–1281. <https://doi.org/10.1021/bp020071x>
- Rashid, N., Shimada, Y., Ezaki, S., Atomi, H., Imanaka, T., 2001. Low-temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp. strain KB700A. *Appl Environ Microbiol* 67, 4064–4069. <https://doi.org/10.1128/aem.67.9.4064-4069.2001>
- Rawat Seema, 2015, Food Spoilage: Microorganisms and their prevention, *Asian Journal of Plant Science and Research*, 5 (4):47-56. <https://www.imedpub.com/articles/food-spoilage-microorganisms-and-their-prevention.pdf>
- Read, Q.D., Muth, M.K., 2021. Cost-effectiveness of four food waste interventions: Is food waste reduction a “win–win?” *Resources, Conservation and Recycling* 168, 105448. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2021.105448>
- Remenant, B., Jaffrès, E., Dousset, X., Pilet, M.-F., Zagorec, M., 2015. Bacterial spoilers of food: behavior, fitness and functional properties. *Food Microbiol.* 45, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.009>
- Rouger, A., Tresse, O., Zagorec, M., 2017. Bacterial Contaminants of Poultry Meat: Sources, Species, and Dynamics. *Microorganisms* 5. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030050>

- Rukchon, C., Nopwinyuwong, A., Trevanich, S., Jinkarn, T., Suppakul, P., 2014. Development of a food spoilage indicator for monitoring freshness of skinless chicken breast. *Talanta* 130, 547–554. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.048>
- Saenz-García, C.E., Castañeda-Serrano, P., Mercado Silva, E.M., Alvarado, C.Z., Nava, G.M., 2020. Insights into the Identification of the Specific Spoilage Organisms in Chicken Meat. *Foods* 9, 225. <https://doi.org/10.3390/foods9020225>
- Samad, M.Y.A., Razak, C.N.A., Salleh, A.B., Zin Wan Yunus, W.M., Ampon, K., Basri, M., 1989. A plate assay for primary screening of lipase activity. *Journal of Microbiological Methods* 9, 51–56. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(89\)90030-4](https://doi.org/10.1016/0167-7012(89)90030-4)
- Sams, A.R. (Ed.), 2001. Poultry meat processing. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Scatamburlo, T.M., Yamazi, A.K., Cavicchioli, V.Q., Pieri, F.A., Nero, L.A., 2015. Spoilage potential of *Pseudomonas* species isolated from goat milk. *Journal of Dairy Science* 98, 759–764. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8747>
- Schober, P., Boer, C., Schwarte, L.A., 2018. Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation. *Anesthesia & Analgesia* 126, 1763–1768. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000002864>
- Shahina, S.J., 2018. Molecular detection of rhlB gene from Biosurfactant producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from oil contaminated soil 3, 4.
- Shao, B., Liu, Z., Zhong, H., Zeng, G., Liu, G., Yu, M., Liu, Y., Yang, X., Li, Z., Fang, Z., Zhang, J., Zhao, C., 2017. Effects of rhamnolipids on microorganism characteristics and applications in composting: A review. *Microbiol Res* 200, 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.04.005>
- Shatila, F., Diallo, M.M., Şahar, U., Ozdemir, G., Yalçın, H.T., 2020. The effect of carbon, nitrogen and iron ions on mono-rhamnolipid production and rhamnolipid synthesis gene expression by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. *Arch Microbiol* 202, 1407–1417. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01857-4>

- Spiker, M.L., Hiza, H.A.B., Siddiqi, S.M., Neff, R.A., 2017. Wasted Food, Wasted Nutrients: Nutrient Loss from Wasted Food in the United States and Comparison to Gaps in Dietary Intake. *J Acad Nutr Diet* 117, 1031-1040.e22. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2017.03.015>
- Spyrelli, E.D., Ozcan, O., Mohareb, F., Panagou, E.Z., Nychas, G.-J.E., 2021. Spoilage assessment of chicken breast fillets by means of fourier transform infrared spectroscopy and multispectral image analysis. *Curr Res Food Sci* 4, 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.02.007>
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S.L., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., others, 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406, 959–964.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* 30, 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- UNA, Unión Nacional de Avicultores 2019. Panorama de Indicadores Económicos para México, <https://una.org.mx/indicadores-economicos-para-mexico/>
- UNA, Unión Nacional de Avicultores, 2020, Compendio de Indicadores Económicos del Sector Avícola 2020, disponible en: <https://una.org.mx/indicadores-economicos/>
- USDA, 2016 US Department of Agriculture, Insights of Chicken Meat Production.
- Urmila, K., Li, H., Chen, Q., Hui, Z., Zhao, J., 2015. Quantifying of total volatile basic nitrogen (TVB-N) content in chicken using a colorimetric sensor array and nonlinear regression tool. *Anal. Methods* 7, 5682–5688. <https://doi.org/10.1039/C5AY00596E>
- Wang, G.-Y., Wang, H.-H., Han, Y.-W., Xing, T., Ye, K.-P., Xu, X.-L., Zhou, G.-H., 2017. Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from chilled chicken in vitro and in situ. *Food Microbiol.* 63, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.015>
- Wang, X.-Y., Xie, J., 2020. Growth Kinetics and Spoilage Potential of Co-culturing *Acinetobacter johnsonii* and *Pseudomonas fluorescens* from Bigeye Tuna

- (*Thunnus obesus*) During Refrigerated Storage. *Curr Microbiol* 77, 1637–1646. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01978-5>
- Wickramasinghe, N.N., Ravensdale, J., Coorey, R., Chandry, S.P., Dykes, G.A., 2019. The Predominance of Psychrotrophic Pseudomonads on Aerobically Stored Chilled Red Meat. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 18, 1622–1635. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12483>
- Wilhelm, S., Gdynia, A., Tielen, P., Rosenau, F., Jaeger, K.-E., 2007. The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. *J Bacteriol* 189, 6695–6703. <https://doi.org/10.1128/JB.00023-07>
- Winsor, G.L., Van Rossum, T., Lo, R., Khaira, B., Whiteside, M.D., Hancock, R.E.W., Brinkman, F.S.L., 2009. *Pseudomonas* Genome Database: facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of microbial genomes. *Nucleic Acids Res* 37, D483-488. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn861>
- Wittgens, A., Santiago-Schuebel, B., Henkel, M., Tiso, T., Blank, L.M., Hausmann, R., Hofmann, D., Wilhelm, S., Jaeger, K.-E., Rosenau, F., 2018. Heterologous production of long-chain rhamnolipids from *Burkholderia glumae* in *Pseudomonas putida*-a step forward to tailor-made rhamnolipids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 1229–1239. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8702-x>
- Woods, R.G., Burger, M., Beven, C.-A., Beacham, I.R., 2001. The *aprX-lipA* operon of *Pseudomonas fluorescens* B52: a molecular analysis of metalloprotease and lipase production. *Microbiology (Reading)* 147, 345–354. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-2-345>
- Yamashiro, Y., Sakatoku, A., Tanaka, D., Nakamura, S., 2013. A cold-adapted and organic solvent-tolerant lipase from a psychrotrophic bacterium *Pseudomonas* sp. strain YY31: identification, cloning, and characterization. *Appl Biochem Biotechnol* 171, 989–1000. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0406-9>
- Yuan, L., Sadiq, F.A., Liu, T., Li, Y., Gu, J., Yang, H., He, G., 2018. Spoilage potential of psychrotrophic bacteria isolated from raw milk and the thermo-stability of

- their enzymes. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B* 19, 630–642.
<https://doi.org/10.1631/jzus.B1700352>
- Zhang, Q.Q., Han, Y.Q., Cao, J.X., Xu, X.L., Zhou, G.H., Zhang, W.Y., 2012. The spoilage of air-packaged broiler meat during storage at normal and fluctuating storage temperatures. *Poult. Sci.* 91, 208–214.
<https://doi.org/10.3382/ps.2011-01519>
- Zhang, T., Ding, H., Chen, L., Zhang, S., Wu, P., Xie, K., Pan, Z., Zhang, G., Dai, G., Wu, H., Wang, J., 2021. Characterization of chilled chicken spoilage using an integrated microbiome and metabolomics analysis. *Food Res Int* 144, 110328. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110328>
- Zulfiqar Ali Malik, M.A.Q., 2013. Yeast Extract as the Most Preferable Substrate for Optimized Biosurfactant Production by rhlB Gene Positive *Pseudomonas putida* SOL-10 Isolate. *Journal of Bioremediation & Biodegradation* 04.
<https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000204>