



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química

Estudios de la diversidad y dinámica de las poblaciones
bacterianas causantes del deterioro en carne de cerdo

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestra en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

L.Q.A. Flor Evelia Galindo Téllez

Dirigido por:

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales

Querétaro, Qro., enero de 2024



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



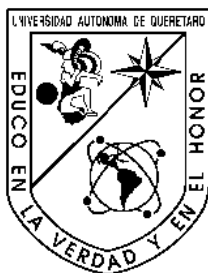
Estudios de la diversidad y dinámica de las
poblaciones bacterianas causantes del deterioro en
carne de cerdo

por

Flor Evelia Galindo Tellez

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: FQMAC-309134



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Estudios de la diversidad y dinámica de las poblaciones bacterianas causantes del deterioro en carne de cerdo

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Maestra en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

L.Q.A. Flor Evelia Galindo Téllez

Dirigido por:

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales

Presidente

Dra. Christine Alvarado

Secretario

Dr. Edmundo Mateo Mercado Silva

Vocal

Dra. Karla Isabel Lira De León

Suplente

Dra. Ma. Estela Vázquez Barrios

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro

Enero 2024

México

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado para la realización del presente proyecto de investigación.

Al Dr. Gerardo Manuel Nava Morales, mi agradecimiento por la confianza brindada, sus invaluable enseñanzas y dirección experta en este proyecto. Reconozco y aprecio el tiempo y la orientación dedicados.

A los miembros de mi comité, por formar parte del proyecto, por sus comentarios y asesorías para llevar a cabo este trabajo, así como su tiempo dedicado a la revisión de este.

A Carmelita y Arlette, mi reconocimiento por su grato apoyo, compromiso, amabilidad, respaldo y colaboración en las tareas administrativa.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, mi agradecimiento por brindarme la oportunidad de formar parte de su comunidad universitaria. Agradezco la confianza depositada en mí y el respaldo brindado a lo largo de mi trayectoria académica.

Dedicatorias

A mí misma, protagonista incansable de este viaje académico, dedico con orgullo este logro. A la perseverancia que me llevó a superar desafíos, a la paciencia que me permitió sortear obstáculos y al esfuerzo constante que me condujo hasta este punto. Agradezco a mi determinación y valentía por nunca rendirse, a mi curiosidad por explorar nuevos horizontes y a mi dedicación por alcanzar metas que parecían inalcanzables. Este logro es un testimonio de mi fuerza interior y mi compromiso con el crecimiento personal y profesional. ¡Brindo por el esfuerzo y la dedicación que han dado fruto en esta etapa de mi vida!

Dedico este trabajo a mis padres, mi hermana y mis sobrinos, fuente inagotable de inspiración y apoyo incondicional.

A mis amigos, Pao, Alan, Liz, Jess, MLO, Pollito y Richi, cuyas palabras de ánimo y motivación han sido un motor fundamental en este viaje profesional y personal académico.

A mis profesores, por su sabiduría compartida y enseñanzas que han moldeado mi pensamiento.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Microbiología Molecular, Caro, Wong, Fran, Ivanni, Pucxi, Lupita, Amanda, Rammi y todos aquellos que, de una u otra manera, han dejado su huella en este camino de aprendizaje y crecimiento. Este logro es también de ustedes. Gracias por ser parte de esta travesía.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ABREVIATURAS	vii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1. Desperdicio de alimentos.....	5
2.2. Producción y desperdicio de carne de cerdo	6
2.3. Microbiología de la carne.....	9
2.4. Mecanismo del deterioro de la carne	10
2.5. Metabolismo de las bacterias asociadas al deterioro de la carne	13
2.6. Indicadores de deterioro de la carne	14
2.6.1. Efecto del pH en el deterioro de la carne	14
2.6.2. Nitrógeno volátil total (TVB-N).....	15
2.7. Estudios microbiológicos del deterioro de la carne de cerdo mediante ensayos genotípicos y fenotípicos	16
3. JUSTIFICACIÓN.....	18
4. OBJETIVOS.....	19
4.1. Objetivo General.....	19
4.2. Objetivos específicos.....	19

5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
5.1.	Materiales y equipos.....	20
5.2.	Metodología para el Objetivo 1	23
5.2.1.	Aislamiento e Identificación de bacterias específicas del deterioro de carne de cerdo	23
5.3.	Metodología para el Objetivo 2	25
5.3.1.	Modelo de deterioro <i>in vitro</i>	25
5.3.2.	Modelo <i>in vitro</i> de bacterias deterioradoras en carne de cerdo.....	26
5.3.3.	Determinación de pH.....	27
5.4.	Metodología para el Objetivo 3	27
5.4.1.	Preparación de muestras	27
5.4.2.	Extracción y secuenciación de ADN.....	28
5.4.3.	Secuenciación masiva del gen <i>16S rRNA</i> y preparación de librerías	28
5.4.4.	Análisis bioinformático.....	29
5.4.5.	Análisis de la diversidad y abundancia bacteriana	29
5.5.	Análisis estadístico	30
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
6.1.	Aislamiento e identificación de Bacterias Asociadas al Deterioro de la Carne de Cerdo	31
6.2.	Modelo <i>in vitro</i> propuesto para identificar bacterias deterioradoras en carne de cerdo.....	32
6.3.	Cambios del pH en la carne de cerdo durante el almacenamiento.....	35
6.4.	Evaluación de la capacidad deterioradora de bacterias aisladas en carne de cerdo.....	37
6.5.	Determinación de pH a las BCD	43

6.6.	Correlaciones entre el pH y la concentración de TVB-N en la carne de cerdo	45
6.7.	Análisis de la biodiversidad bacteriana y su abundancia relativa en carne de cerdo durante el almacenamiento.....	46
7.	CONCLUSIONES	57
8.	REFERENCIAS	58

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. <i>Composición de los medios de cultivo oligotróficos a utilizar.</i>	23
---	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales países productores de carne de cerdo (a) expresado en miles toneladas (b) expresado en porcentaje Fuente: USDA, 2020.....	7
Figura 2. Principales estados productores de carne de cerdo en México, 2017-2020. Fuente: SIAP, 2022.....	8
Figura 3. Consumo per cápita de carne en México, 2006-2020. Fuente: SIAP, 2022.	8
Figura 4. Representación gráfica de los procesos moleculares involucrados en el deterioro microbiano de la carne. Fuente: Shao et al., 2021.	13
Figura 5. Diversas morfologías en los aislamientos obtenidos.....	31
Figura 6. Porcentaje de aislamientos recuperados en los diferentes medios oligotróficos.....	32
Figura 7. Determinación de TVB-N en carne de cerdo almacenada durante 8 días, ambos experimentos se realizaron con “carne convencional” vs “carne estéril” (a). Experimento 1 (b) Experimento 2. Los resultados están expresados como mg/100 g de peso. El gráfico presenta los valores promedio \pm error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas según la prueba T de Student ($P < 0.05$)	33
Figura 8. Determinación de pH en carne de cerdo durante 8 días, ambos experimentos se realizaron con “carne convencional” vs “carne estéril” (a). Experimento 1 (b). Experimento 2. El gráfico presenta los valores promedio \pm error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas: prueba T de Student ($P < 0.05$).....	36
Figura 9. Evaluación de la capacidad deterioradora de los 75 aislamientos mediante la determinación de TVB-N. Se utilizó como umbral de referencia una concentración >20 mg TVB-N/100 g, marcada por una línea roja punteada.....	37
Figura 10. Diversidad de aislamientos causantes de deterioro (BCD) a nivel Familia, obtenidos a partir de carne de cerdo almacenada durante 8 días.....	38
Figura 11. Capacidad deterioradora de los géneros bacterianos presentes en carne de cerdo después de 8 días de almacenamiento. El gráfico presenta los valores	

<i>promedio ± error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas: ANOVA de Fisher (P < 0.05).</i>	40
Figura 12. <i>Determinación de pH en los géneros bacterianos presentes en carne de cerdo después de 8 días de almacenamiento. El gráfico presenta los valores promedio ± error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas: ANOVA de Fisher (P < 0.05).</i>	43
Figura 13. <i>Correlación de Pearson entre valores de TVB-N y pH en aislamientos deterioradores de carne de cerdo deteriorada.</i>	45
Figura 14. <i>Mapa de calor que muestra los cambios en la composición de la comunidad bacteriana de la carne de cerdo almacenada por 8 días. Se muestran las abundancias relativas de las especies bacterianas a nivel de familia. Aquellas familias con una abundancia relativa <1% se agrupan bajo la categoría "Otros".</i> .	47
Figura 15. <i>Mapa de calor que muestra los cambios en la composición de la comunidad bacteriana de la carne de cerdo almacenada por 8 días. Se muestran las abundancias relativas de las especies bacterianas a nivel de género. Aquellos géneros con una abundancia relativa <1% se agrupan bajo la categoría "Otros".</i>	48
Figura 16. <i>Abundancia relativa de las familias (a) y géneros (b) encontrados durante los 8 días de almacenamiento. El gráfico presenta los valores promedio ± error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas: ANOVA de Fisher (P < 0.05).</i>	52
Figura 17. <i>Diversidad bacteriana en la carne de cerdo durante el almacenamiento de 8 días. (a). Riqueza, (b). índice de Simpson, (c). índice de Shannon y (d). equidad (evenness). Los datos se presentan como medias ± error estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas: prueba de Fisher (P < 0.05).</i>	55

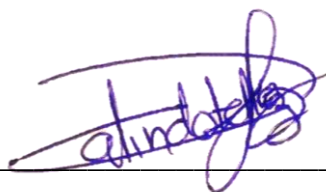
ABREVIATURAS

BAD	Bacterias Asociadas al Deterioro
BCD	Bacterias Causantes del deterioro
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
TVB-N	Nitrógeno Base Volátil Total
CST	Caldo Soya Trypticaseína
AST	Agar Soya Trypticaseína
M4	Agar R2A
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
ASL	Aislamiento

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.

A handwritten signature in purple ink, appearing to read 'Flor Evelia Galindo Téllez', is written over a horizontal line.

L.Q.A Flor Evelia Galindo Téllez

RESUMEN

Los productos cárnicos son muy susceptibles al deterioro, principalmente por las características intrínsecas del producto y la microbiota asociada al mismo. Se ha estimado que hasta el 35 % de la carne de cerdo se deteriora durante su comercialización y almacenaje. El deterioro de la carne es provocado, en gran medida, por las poblaciones bacterianas asociadas al deterioro (BAD), las cuales representan la microbiota del producto. Sin embargo, hasta este momento, se desconocen los grupos bacterianos causantes del deterioro (BCD) de la carne de cerdo. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue identificar y caracterizar las poblaciones BCD en carne de cerdo. Para este fin, se implementó una estrategia microbiológica con ensayos cultivo-dependiente e -independiente. Al aplicar esta metodología, se recuperaron 75 aislamientos bacterianos, provenientes de carne de cerdo cruda en proceso de deterioro. Estos aislamientos se sometieron a ensayos de deterioro *in vitro*. El 65 % de los aislamientos mostraron capacidad deterioradora y se clasificaron como BCD, con una producción de nitrógeno volátil total (TVB-N, por sus siglas en inglés) ≥ 20 mg /100g. Estos aislamientos de BCD pertenecieron a las familias *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Hafniaceae*, *Planococcaceae* y *Pseudomonadaceae*. En estos ensayos, los valores de pH de la carne fluctuaron entre 5.2 y 6.2, revelando una correlación positiva entre los valores de TVB-N y el pH. Además, los ensayos cultivo-independiente mediante análisis de secuenciación masiva del gen *16S rRNA* revelaron la presencia de 18 familias y 55 géneros diferentes como miembros de la microbiota de carne de cerdo cruda. También se corroboró la dinámica y abundancia relativa de poblaciones BCD; por ejemplo, miembros de la familia *Pseudomonadaceae* (52 %), *Enterobacteriaceae* (21 %), *Bacillaceae* (16 %), y *Planococcaceae* (11 %). Estos resultados son un marco de referencia en la identificación de bacterias causantes del deterioro de carne de cerdo.

Palabras clave: carne, deterioro microbiano, desperdicio, TVB-N, BCD

ABSTRACT

Meat products are very susceptible to spoilage, due to its intrinsic characteristics and the presence of a diverse microbiota. It has been estimated that up to 35 % of pork meat deteriorates during processing and storage. Meat spoilage is caused, to great extent, by bacterial populations, also known as Spoilage Associated Bacteria (SAB), which represents the microbiota associated with the product; however, the diversity of spoilage causing bacteria (SCB) remains unknown. Therefore, the objective of the present study was to identify and characterize SCB in pork meat. For this purpose, a culture-dependent and independent microbiological assays were implemented. A total of 75 bacterial isolates were recovered from retail pork meat. The spoilage capacity of these isolates was evaluated using an in vitro model. Sixty-five percent of the isolates were classified as SCB, producing ≥ 20 mg of total volatile basic nitrogen (TVB-N)/100g. These isolates belong to families *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Hafniaceae*, *Planococcaceae* and *Pseudomonadaceae*. This assays, also revealed a positive correlation between TVB-N and pH levels. Furthermore, independent-culture assays by means of 16S rRNA gene sequencing revealed the presence of total 18 families and 55 different genera during pork meat spoilage. Importantly, it was corroborated the diversity, dynamic, and abundance of SCB; specifically member of *Pseudomonadaceae* (52 %), *Enterobacteriaceae* (21 %), *Bacillaceae* (16 %), and *Planococcaceae* (11 %) families. Together, these results provide a reference framework to advance in the identification of bacteria causing pork meat spoilage.

Key words: meat, microbial spoilage, wastage, TVB-N, SCB

1. INTRODUCCIÓN

La problemática asociada al desperdicio de alimentos, definido como la reducción tanto en proporción como en calidad debido a las decisiones tomadas por proveedores y consumidores, representa un tema de gran importancia en el ámbito global. Este fenómeno conlleva consecuencias significativas en términos de seguridad alimentaria, sostenibilidad ambiental y recursos económicos (FAO, 2022). A nivel global, cada año se malgastan cerca de 1,300 millones de toneladas de alimentos, con un valor estimado que ronda los 400 mil millones de dólares (FAO, 2020b; Gustavsson *et al.*, 2021).

En México, de acuerdo con la FAO (2019), el 35 % de todos los alimentos elaborados y producidos se pierde o desperdicia, lo que representa aproximadamente 20 millones de toneladas de carne cada año (FAO, 2019). Esta alta incidencia de desperdicio de productos cárnicos se atribuye principalmente al fenómeno de deterioro temprano, que se caracteriza por la reducción o pérdida de las características sensoriales del producto. Las causas fundamentales del deterioro de productos cárnicos pueden derivar de factores fisicoquímicos y/o microbiológicos (Hebbel, 2019; Luong *et al.*, 2020).

El deterioro microbiano, causado por ciertos grupos bacterianos con la capacidad metabólica para proliferar y replicarse en sustratos como la carne, es un fenómeno común, especialmente en condiciones de refrigeración. Se sugiere que esta población microbiana diversa podría estar conformada por bacterias conocidas como "bacterias asociadas del deterioro", las cuales están asociadas al proceso de deterioro (Bozaris y Parlapani, 2017; Comi, 2017). A medida que las bacterias crecen, producen subproductos metabólicos cuya acumulación conlleva al desarrollo de características organolépticas indeseadas. Este fenómeno tiene un impacto considerable en la durabilidad de los productos cárnicos, resultando en una disminución significativa de su vida útil. (Hebbel, 2019; Luong *et al.*, 2020).

En general, se establece que el deterioro bacteriano de la carne se produce cuando se alcanzan los recuentos de 10^7 UFC/g (Bassey *et al.*, 2021). Este proceso puede

presentarse en las diferentes etapas de comercialización, desde la obtención de la carne del animal hasta su llegada con el consumidor final (Ruiz *et al.*, 2021).

Con el propósito de disminuir el desperdicio de productos cárnicos, este estudio se enfoca en analizar la diversidad bacteriana y las interacciones presentes en la carne de cerdo, especialmente aquellas poblaciones relacionadas con su deterioro. Utilizando técnicas avanzadas de secuenciación masiva y análisis metagenómicos del gen *16S rRNA*, la investigación busca identificar y comprender la composición y evolución de estas poblaciones bacterianas en distintas etapas de deterioro de la chuleta de cerdo. La obtención de estos datos resultará crucial para desarrollar estrategias destinadas a reducir las poblaciones bacterianas responsables del deterioro, con el objetivo de mitigar la pérdida de estos alimentos a lo largo del proceso de producción.

2. ANTECEDENTES

2.1. Desperdicio de alimentos

Las pérdidas y el desperdicio de alimentos constituyen un problema grave a nivel global (Karwowska *et al.*, 2021). Anualmente, se estima que se pierden 1,300 millones de t de alimentos, generando pérdidas económicas globales de alrededor de 400 mil millones de dólares (FAO, 2020b; Gustavsson *et al.*, 2021).

La pérdida de alimentos se define como la reducción tanto en cantidad como en calidad, resultado de acciones y decisiones tomadas por los proveedores de servicios y los consumidores (FAO, 2022). Entre las causas que contribuyen al desperdicio alimentario se encuentran el manejo deficiente, el traslado inadecuado, el almacenamiento inapropiado, cambios en la cadena de frío y problemas relacionados con el empaquetado (FAO, 2019). Diversos factores contribuyen al desperdicio alimentario, entre ellos se encuentran la manipulación deficiente, el transporte inadecuado, el almacenamiento inapropiado, alteraciones en la cadena de frío y problemas asociados con el empaquetado (FAO, 2019).

El derroche alimentario también tiene consecuencias adversas en el entorno global, el clima y los recursos hídricos y terrestres (Buzdy, 2022), debido a que no se aprovechan adecuadamente los recursos naturales para producir, procesar, transportar, preparar y almacenar alimentos (Buzdy, 2022; FAO, 2019). La importancia ecológica de las pérdidas de alimentos depende no solo de la cantidad, sino también del tipo de alimento, el lugar de la cadena alimentaria donde se pierde y la forma en que se recicla o se desecha (Karwowska *et al.*, 2021).

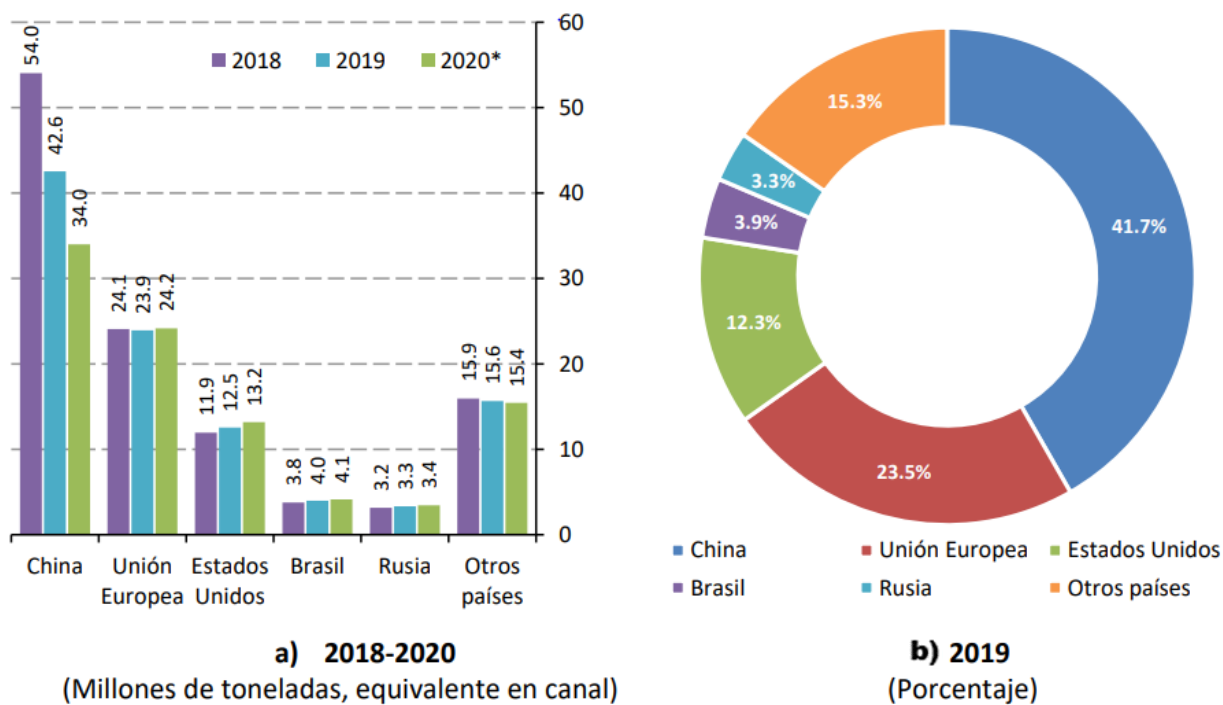
Por lo tanto, cuando los alimentos se desechan, también lo hacen las oportunidades para mejorar la disponibilidad y accesibilidad de alimentos, impulsar el desarrollo económico y la expansión y estimular el bienestar y la salud del entorno natural (USDA, 2019).

2.2. Producción y desperdicio de carne de cerdo

La carne se considera una fuente primordial de proteínas para la dieta humana (Hoffman y Falvo, 2014). Debido al crecimiento demográfico a escala mundial, en las últimas cinco décadas, la generación de carne se ha multiplicado por tres, estimándose que actualmente se producen 340 toneladas en cifras millonarias de carne al anualmente. (Karwowska *et al.*, 2021).

Datos recientes señalan un aumento en el consumo de carne de cerdo y aves, mientras que el consumo total de carne de res y cordero está disminuyendo (Böll, 2021). A pesar de restricciones religiosas y culturales en algunos países, estudios indican que la carne de cerdo ostenta el título de la variedad más popular entre los consumidores a nivel global, con una producción anual estimada del 2.5 % (USDA, 2020). Sin embargo, algunos pronósticos sugieren que la ingesta de carne de pollo superará a la carne de cerdo en los próximos años (Karwowska *et al.*, 2021). De acuerdo con la FAO (2020), en el año 2019, la cantidad promedio de carne de cerdo consumida por cada individuo a nivel global ascendió a 12.3 kilogramos anuales, superando a la carne de res con 6.5 kg y siendo inferior al consumo de pollo, que fue de 14.2 kg (FAO, 2020a; USDA, 2020).

El 75 % de la producción mundial de carne de cerdo se origina en China, la Unión Europea y los Estados Unidos, como se muestra en la Figura 1. En la última década, la producción global ha experimentado un aumento anual promedio del 1.4 % (FAO, 2020a). De acuerdo con la información proporcionada por la USDA en 2020, la producción global de carne de cerdo en el año 2021 ascendió aproximadamente a 105 millones de toneladas, evidenciando un incremento del 8.5 % en comparación con el año anterior, siendo China el principal contribuyente a dicho aumento. La Unión Europea se sitúa como el segundo productor más significativo a nivel mundial, con una cifra de 24.8 millones de toneladas, representando un aumento del 2 % respecto a 2020, seguida por los Estados Unidos, que registraron una producción de 12.7 millones de toneladas, reflejando una disminución del 0.5 %, tal como se visualiza en la Figura 1a (FAO, 2020a; USDA, 2020).



*Proyectado en abril de 2020.

Figura 1. Principales países productores de carne de cerdo (a) expresado en miles toneladas (b) expresado en porcentaje Fuente: USDA, 2020.

México se sitúa como un productor de carne de cerdo de tamaño mediano, contribuyendo con el 1.1 % de la producción mundial. Además, ocupa el segundo lugar como importador más significativo, constituyendo el 9 % del volumen total del intercambio comercial internacional de este producto (SIAP, 2022). En cuanto a la producción de carne de cerdo, según la información proporcionada en el boletín mensual de la Producción de Carne en Canal (sin vísceras) de Porcino del SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, Jalisco es el estado que lidera como el principal productor con 342,736 toneladas, seguido por Sonora con 308,766 toneladas y Puebla con 121,000 toneladas (Figura 2) (SIAP, 2022).

Principales estados productores de carne de cerdo, 2017-2020
(Miles de toneladas, carne en canal)

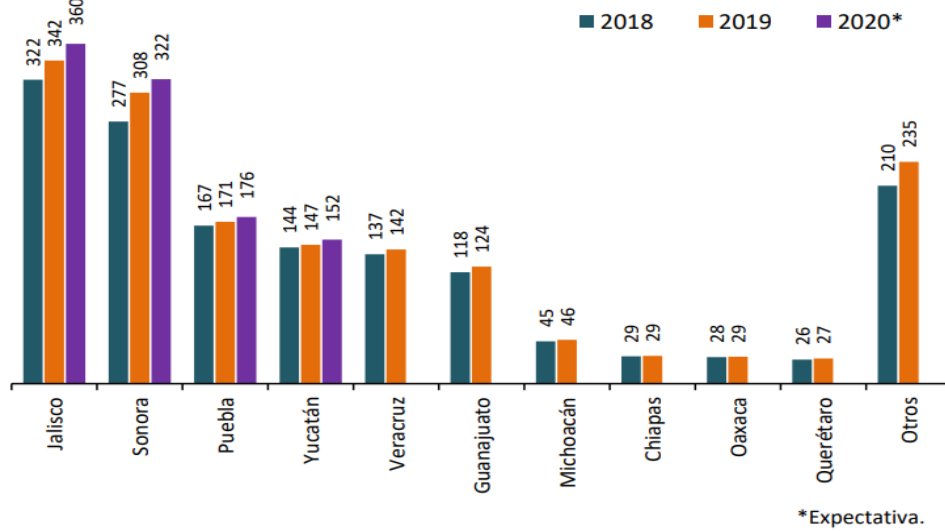


Figura 2. Principales estados productores de carne de cerdo en México, 2017-2020. Fuente: SIAP, 2022.

En México, la ingesta individual de carne de cerdo se sitúa en 19 Kg (Figura 3). De manera específica, el 51.3 % del consumo de carne de cerdo se concentra en los estados de Veracruz, México, Puebla, Ciudad de México, Jalisco y Yucatán. Entre estos, Yucatán destaca como uno de los estados con el mayor consumo per cápita a nivel nacional (SIAP, 2020).

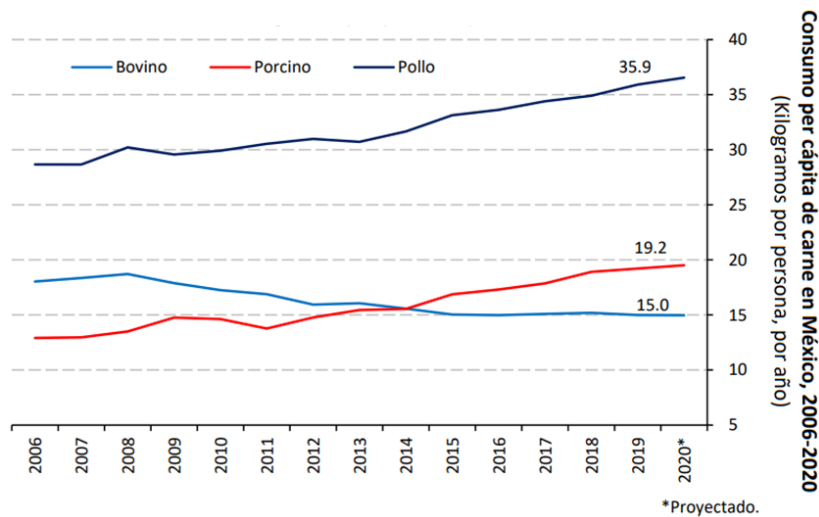


Figura 3. Consumo per cápita de carne en México, 2006-2020. Fuente: SIAP, 2022.

Por otra parte, un estudio reciente indica que cada año, ~20 % de los productos cárnicos producidos a nivel mundial, se desperdician; esto equivale a 304 millones de toneladas (USDA, 2019). En México, aproximadamente el 40% de la carne de cerdo se desperdicia, principalmente debido a su deterioro, que se distingue por una disminución en la calidad perceptible de los productos cárnicos (USDA, 2019). Este deterioro en los productos cárnicos se atribuye principalmente a procesos fisicoquímicos y microbiológicos. En particular, la degradación microbiológica, originada por grupos específicos de bacterias, puede reducir el periodo de conservación de los productos cárnicos y generar desaprobación entre los consumidores, al no cumplir con los estándares esperados de calidad (Hebbel, 2019; Luong *et al.*, 2020).

2.3. Microbiología de la carne

La carne, por su composición química (agua, proteínas, grasa, ácido láctico) es un alimento altamente perecedero, convirtiéndose así, en un sustrato adecuado para los microorganismos, tanto patógenos como deterioradores. En general, se establece que el deterioro microbiano de la carne se produce cuando los recuentos bacterianos alcanzan niveles de 10^7 UFC/g (Bassey *et al.*, 2021). Este recuento está vinculado al deterioro sensorial, generando sabores desagradables y extraños, así como modificaciones en el color, emisión de gases, alteraciones en el pH, formación de sedimentos, descomposición de elementos estructurales y modificaciones en la presentación del producto (Luzardo-Buiatria, 2017). Este deterioro microbiano puede presentarse en las diferentes etapas de comercialización de la carne, desde el momento que se desangra el animal, hasta el momento que la carne llega a los consumidores, está expuesta a la contaminación microbiana (Ruiz *et al.*, 2021)

El deterioro de la carne de cerdo está relacionado con el desarrollo de diferentes grupos bacterianos y sus interacciones. Según la investigación realizada por Sáenz-García *et al* (2020), el deterioro de la carne es causado por dos grupos bacterianos. El primer grupo, está conformado por las bacterias causantes del deterioro (BCD),

los cuales son los encargados de iniciar el proceso de deterioro; y el segundo grupo son las bacterias asociadas al deterioro (BAD), los cuales representan todos los grupos bacterianos presentes en la carne, antes, durante y después del proceso de deterioro. Además, otros estudios indican que las BCD pueden proliferar en ambientes hostiles, complejos, fríos y que deben tener un genoma de tamaño extenso, lo cual les ayuda a sobrevivir (Ercolini *et al.*, 2020).

Los microorganismos asociados al deterioro de la carne, en condiciones de refrigeración, son bacterias psicrótrofas, que tienen la capacidad de replicarse a temperaturas de 0 a 25 °C (Puga, 2020). Los géneros bacterianos predominantes psicrótrofos, vinculados al deterioro de la carne de cerdo, incluyen a *Moraxella*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Brochothrix thermosphacta*, y miembros de las familias *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae* y *Pseudomonadaceae* (Bassey *et al.*, 2021; Puga, 2020).

Varios estudios señalan que los miembros del género *Pseudomonas* exhiben tasas de replicación reducidas y generan un pigmento fluorescente observable bajo luz ultravioleta. Asimismo, emiten olores desagradables, como ésteres, aminas, compuestos azufrados y ácidos, derivados de la descomposición de proteínas y aminoácidos (Puga, 2020). Por otra parte, estudios recientes indican que algunas especies del género *Flavobacterium* pueden producir coloraciones anormales y que miembros del género *Escherichia*, tiene la capacidad de fermentar los carbohidratos presentes en la carne (Bassey *et al.*, 2021). En este contexto, la presencia de microorganismos en la carne tiene un impacto directo en la seguridad alimentaria, el tiempo de conservación y la aceptación por parte de los consumidores (Puga, 2020).

2.4. Mecanismo del deterioro de la carne

Las bacterias mantienen interacciones entre ellas y con el entorno, lo que tiene un impacto directo en la velocidad de su crecimiento. Esta velocidad no solo se ve afectada por las propiedades del medio, sino también por las interrelaciones con

otras bacterias presentes en la parte externa de la carne. Estos procesos inician con la adaptación de las bacterias al sustrato, seguida de una fase de crecimiento exponencial. Durante esta etapa, los microorganismos presentes metabolizan la glucosa disponible utilizando constituyentes solubles como ácido láctico y aminoácidos (Blázquez y Julio, 2019; Casaburi *et al.*, 2015; Hebbel, 2019; Martín, 2020). Sin embargo, cuando la concentración de glucosa se agota, otros sustratos como lactato, gluconato, glucosa-6-fosfato, piruvato, propionato, formiato, etanol, acetato, aminoácidos, nucleótidos, urea y proteínas hidrosolubles son metabolizados por la mayoría de las bacterias que forman parte de la microbiota de la carne. Este proceso libera amonio, generando olores desagradables (Blázquez y Julio, 2019; Casaburi *et al.*, 2015; Hebbel, 2019; Martín, 2020).

Los factores enzimáticos, tanto endógenos del alimento como aquellos generados por las bacterias, también contribuyen al deterioro, desencadenando procesos de autólisis. En la fase estacionaria, las bacterias permanecen en un estado viable con una replicación mínima, y cuando los nutrientes se agotan, inicia el proceso de muerte bacteriana (Blázquez y Julio, 2019; Hebbel, 2019; Martín, 2020). Las enzimas extracelulares, liberadas por las bacterias proteolíticas cuando alcanzan su densidad máxima, les facilitan la penetración en la carne (Blázquez y Julio, 2019; Hebbel, 2019; Martín, 2020).

Debido a sus características microbiológicas, la carne es altamente susceptible a la descomposición, proporcionando un ambiente favorable para la proliferación de diversos microorganismos. Factores como la actividad de agua, el potencial de óxido-reducción, el pH y la presencia de nutrientes contribuyen a esta susceptibilidad (Dave y Ghaly, 2021). Por la naturaleza y concentración de los sustratos, la carne se considera como un medio de cultivo óptimo tanto para microorganismos aerobios como anaerobios. Dentro de estos grupos bacterianos, algunos tienen la capacidad de alterar el olor, color, apariencia, textura y sabor de la carne. Estas transformaciones son resultado de la oxidación de grasas, la alteración de pigmentos o la destrucción de vitaminas. En condiciones de

refrigeración, los microorganismos psicrótrofos son los principales responsables de dichas alteraciones (Dave y Ghaly, 2021).

Una vez que inicia el proceso de deterioro, la presencia de bacterias, especialmente las bacterias lácticas, desencadena la formación de limo (mucosidad superficial) en la superficie de la carne (Dave y Ghaly, 2021; Ercolini *et al.*, 2020). La detección del limo ocurre cuando la población microbiana alcanza un valor de 10^7 UFC/cm², y su concentración está directamente relacionada con el número inicial de bacterias presentes en la carne (Dave y Ghaly, 2021; Ercolini *et al.*, 2020). Por otro lado, el fermentado ocurre internamente, resultado de procesos fermentativos bacterianos que provocan la producción de ácidos láctico y grasos, así como procesos de proteólisis (Dave y Ghaly, 2021; Ercolini *et al.*, 2020).

La alteración en el color de la carne puede ser causada por ciertas bacterias que degradan o modifican los pigmentos, ya sea a través de reacciones con peróxidos o al interactuar con el sulfuro de hidrógeno y la hemoglobina. Por otro lado, los olores desagradables suelen originarse debido a la acción de bacterias anaerobias que descomponen proteínas y aminoácidos (Ercolini *et al.*, 2020).

Se ha documentado que, al iniciar el proceso de deterioro, miembros del género *Pseudomonas*, metabolizan compuestos como la glucosa, aminoácidos y, finalmente, ácido láctico. En contraste, las especies de *Acinetobacter* inician su metabolismo con aminoácidos y ácido láctico. Además, miembros del género *Enterobacter* tienen la capacidad de metabolizar glucosa, glucosa-6-fosfato y aminoácidos, mientras que *Brochothrix thermosphacta* metaboliza glucosa y glutamato (Luzardo-Buiatrua, 2017).

La preservación de alimentos, en sus diversas modalidades actuales, evita el deterioro al disminuir la actividad bacteriana, así como los procesos enzimáticos y oxidativos que suelen ocurrir (Dave y Ghaly, 2021).

2.5. Metabolismo de las bacterias asociadas al deterioro de la carne

El deterioro de la carne es propiciado por el metabolismo bacteriano intracelular, el cual es expresado por genes y proteínas funcionales. También se da por la acumulación de sustancias extracelulares, por ejemplo: las proteasas, lipasas y oxidasas (Figura 4), por consiguiente los fenotipos de deterioro microbiano serán específicos de especie y cepas, ya que los mecanismos de deterioro poseen cierta similitud (Shao *et al.*, 2021).

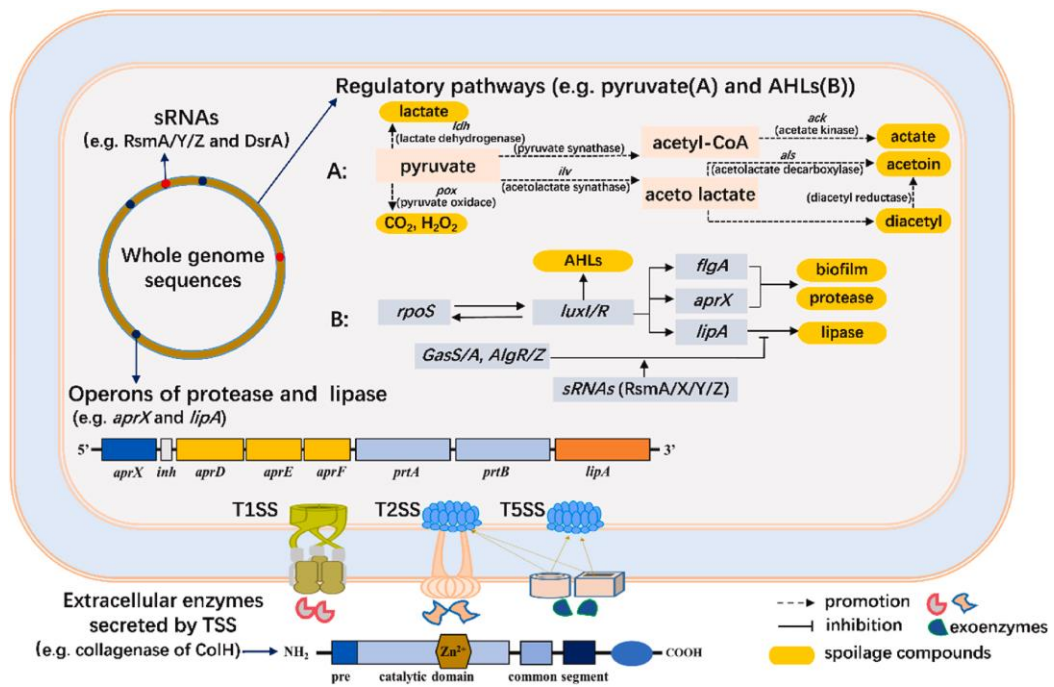


Figura 4. Representación gráfica de los procesos moleculares involucrados en el deterioro microbiano de la carne. Fuente: Shao *et al.*, 2021.

El análisis del metabolismo microbiano ha permitido identificar metabolitos vinculados al deterioro microbiano de la carne (Goldberg, 2013). En este contexto, los genes que se expresan durante el metabolismo de lípidos relacionado al deterioro de la carne son *plsY*, *lipB*, y *fadR*, respectivamente, principalmente en *Shewanella putrefaciens* (Gao *et al.*, 2021).

La regulación de la producción total de nitrógeno básico volátil (TVB-N) está influenciada por la expresión del gen *aprD*. Este proceso también puede ser

modulado por el gen *rpoS*, presente en diversos géneros bacterianos, como *Pseudomonas*, así como por la actividad de la proteasa extracelular (Liu *et al.*, 2018). Además, se han identificado otros genes, como *aprX*, *KB-Lip*, *rhIA* y *rhIB*, asociados con el deterioro de carne, perteneciente al género de *Pseudomonas* (Sáenz-García *et al.*, 2020).

Los genes bacterianos asociados al deterioro de la carne podrían ser utilizados como indicadores de este proceso, ofreciendo la posibilidad de disminuir o evitar dicho deterioro microbiano (Shao *et al.*, 2021).

2.6. Indicadores de deterioro de la carne

La evaluación del deterioro de la carne puede realizarse mediante diversos indicadores, entre los cuales se incluyen la retención de agua (conocida como WHC por sus siglas en inglés), la pérdida por goteo (Cauchie *et al.*, 2020; Rodríguez *et al.*, 2022; Rodríguez *et al.*, 2019), el pH, el color, la producción de nitrógeno volátil total (TVB-N) (Casaburi *et al.*, 2015; Gonzalez-Rivas *et al.*, 2020).

2.6.1. Efecto del pH en el deterioro de la carne

El pH final de la carne estará influenciado desde las prácticas previas al sacrificio del animal, ya que esto afectará directamente a las poblaciones bacterianas y enzimas de la carne, al igual que, la cantidad de carbohidratos disponibles para las bacterias antes de dar inicio al metabolismo de las proteínas, generalmente, en las primeras etapas de la alteración este parámetro incrementa (Zardez, 2021). La carne de cerdo tiene un pH entre 5.1 y 5.6, el cual se determina por la cantidad de ácido láctico que se produce, este pH es el adecuado para llevar a cabo el desarrollo bacteriano, por lo tanto, cambios en este rango de pH representan el inicio de deterioro microbiano debido a la degradación del tejido muscular (Pellissery *et al.*, 2020). El incremento del pH en las etapas finales se da porque comienza el

crecimiento de los microorganismos proteolíticos, generando una degradación de las proteínas, liberando compuestos nitrogenados como las aminas (Zardez, 2021).

Se ha evidenciado que el gen *Rendment Napole (RN)* está asociado a la calidad de la carne en cerdos. El gen *RN* identificado en la raza *Hampshire* tiene dos alelos, un alelo mutante dominante RN y un alelo RN + normal recesivo. La mutación en el gen *RN* se asocia con un bajo rendimiento y da como resultado una carne de mala calidad, con un pH más bajo debido a la degradación post-mortem del glucógeno, descrita como "carne ácida". Valores de pH altos está asociado a una mala capacidad de retención de agua y bajos valores de luminosidad (color) (Davoli y Braglia, 2008).

2.6.2. Nitrógeno volátil total (TVB-N)

El nitrógeno base volátil total (TVB-N, por sus siglas en inglés) representa la cantidad total de nitrógeno extraído del extracto acuoso de la carne mediante condiciones de alcalosis. La determinación de TVB-N expresa cuantitativamente el contenido de bases volátiles de bajo peso molecular y es utilizado como un marcador bioquímico del deterioro de la carne. Este compuesto se asocia a la proliferación bacteriana, específicamente a la actividad de las enzimas proteolíticas; en conjunto, bacterias y metabolitos son un importante mecanismo de deterioro, generando amoníaco, aminas biogénicas y otros productos de desaminación (Bekhit *et al.*, 2021; Holman *et al.*, 2020, 2021).

El TVB-N se genera gracias a la descarboxilación y desaminación que se lleva a cabo por el deterioro microbiano en la carne y va a incluir a todas las bases nitrogenadas volátiles como la trimetilamina, (TMA), que será producida por el deterioro bacteriano, la dimetilamina (DMA) que se forma durante el almacenamiento en refrigeración y congelación por enzimas autolíticas presentes en la carne; amoníaco, producido por desaminación de aminoácidos y catabolitos de nucleótidos, además, de otros compuestos nitrogenados básicos volátiles asociados con el deterioro de la carne (Lee *et al.*, 2018; Wei *et al.*, 2021).

Holman *et al.* (2019), establecieron que los valores de TVB-N debe ser bajos para hacer referencia a una carne fresca y en buen estado; sin embargo, valores altos de TVB-N, indican una carne con deterioro microbiano y por lo tanto en mal estado, en consecuencia, se ha estipulado que la carne refrigerada debe tener un valor de TVB-N que se encuentre en el rango de 15-20 mg/100 g según el Estándar Nacional de Seguridad Alimentaria (Bekhit *et al.*, 2021; Wei *et al.*, 2021).

2.7. Estudios microbiológicos del deterioro de la carne de cerdo mediante ensayos genotípicos y fenotípicos

La identificación de microorganismos presentes en la carne de cerdo durante todo su procesamiento es de gran relevancia para preservar la inocuidad y alargar la vida útil de la carne. Así, es importante identificar los grupos bacterianos que ocasionan el deterioro de la carne durante todas las etapas del procesamiento. Para este fin, se han establecido ensayos de microbiología convencional (cultivo-dependientes) en los cuales se emplean diferentes medios de cultivo dirigidos al aislamiento de estas poblaciones bacterianas. Sin embargo, es necesario desarrollar y validar ensayos de microbiología molecular para identificar y caracterizar las bacterias asociadas al deterioro, mediante técnicas fenotípicas y genotípicas (Cauchie *et al.*, 2020).

Los métodos fenotípicos se basan en la determinación de características bioquímicas y/o fisiológicas, e incluyen la determinación de actividad enzimática y la capacidad metabólica. Ejemplo de los fenotipos de deterioro en la carne de cerdo son la producción de compuestos volátiles que dan lugar a malos olores, la decoloración y la formación de limo (Shao *et al.*, 2021). Los métodos genotípicos se centran en la búsqueda de genes asociados a las vías metabólicas bacterianas que ocasionan el deterioro (Hernández, 2020).

Por lo tanto, el enfoque de la biología molecular funcional brinda la oportunidad de investigar cambios globales en la expresión de genes conocidos o desconocidos en la carne y asociarlos con características fenotípicas, y estos nuevos enfoques

generarán nuevos genes candidatos que se analizarán para la selección asistida por marcadores para mejorar la calidad en general de la carne de cerdo (Rodríguez *et al.*, 2019).

En este contexto, en un estudio reciente se aislaron especies de *Pseudomonas*, *Brochothrix* y *Carnobacterium* a partir de muestras de carne molida, y se evidenció su capacidad de replicarse a temperaturas de 7 °C y 30 °C, en diferentes medios de cultivo (Peruzy *et al.*, 2019).

Además, Cauchie *et al.* (2020), realizó una evaluación de las poblaciones bacterianas que causan el deterioro en la carne de cerdo picada envasada en atmosferas modificadas mediante el análisis del gen *16S rRNA*. Los resultados indican que los géneros dominantes fueron *Photobacterium*, *Pseudomonas* y *Brochothrix*. Los resultados indicaron que la diversidad bacteriana se debe principalmente a las condiciones de almacenamiento de alimentos y técnica de envasado (Peruzy *et al.*, 2019; Stoops *et al.*, 2015). Por otro lado, Bahlinger *et al.* (2021), desarrollaron un ensayo metagenómico para identificar los grupos bacterianos asociados al deterioro de carne de cerdo para la elaboración de salchichas, encontrando que el género *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Brochothrix thermosphacta* y *Staphylococcus* y miembros de la familia *Enterobacteriaceae* siempre se involucran con mayor frecuencia en el deterioro de la carne. Alcanzando concentraciones de hasta $10 \log^{10}$ UFC/g, superior a los demás géneros (Bahlinger *et al.*, 2021).

Estudiar la diversidad y dinámica de las poblaciones bacterianas en la carne de cerdo es esencial para garantizar la seguridad, calidad y durabilidad de los productos cárnicos, así como para cumplir con las regulaciones y estándares de la industria alimentaria.

3. JUSTIFICACIÓN

El desperdicio de alimentos es un desafío global de gran magnitud; cada año, se pierden 1,300 millones de toneladas de alimentos, generando pérdidas económicas que ascienden a 400 mil millones de dólares a nivel mundial (FAO, 2020b; Gustavsson *et al.*, 2021). Esta problemática no solo tiene un impacto económico, sino que también conlleva graves consecuencias ambientales al desperdiciar recursos naturales utilizados en la producción, almacenamiento y distribución de alimentos. Dentro de este contexto, los productos cárnicos son particularmente propensos al desperdicio, con hasta 74 millones de toneladas de carne desechadas anualmente en todo el mundo (FAO, 2020a; USDA, 2020).

Uno de los principales impulsores de estas pérdidas en productos cárnicos es el deterioro microbiano, un proceso que afecta la calidad sensorial y reduce la vida útil de estos productos. Investigaciones recientes indican que este deterioro de la carne es impulsado por grupos bacterianos específicos, capaces de proliferar en condiciones adversas, como bajas temperaturas de almacenamiento y limitadas concentraciones de nutrientes (por ejemplo, a 4 °C) (Dave y Ghaly, 2021; Ercolini *et al.*, 2020). El deterioro microbiano puede manifestarse en diversas etapas de la cadena de comercialización, desde la obtención de la carne del animal hasta su llegada a los consumidores (Karwowska *et al.*, 2021).

Basado en estas premisas, el objetivo del presente trabajo fue identificar los grupos bacterianos causantes del deterioro en carne de cerdo, a través de ensayos fenotípicos y genotípicos, así como en un modelo de deterioro *in vitro*. La información obtenida será esencial para desarrollar estrategias destinadas a reducir las poblaciones microbianas específicas que provocan el deterioro de la carne de cerdo, contribuyendo de esta manera a la mitigación del desperdicio de alimentos y sus impactos asociados.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Identificar mediante ensayos genotípicos, los grupos bacterianos causantes del deterioro en carne de cerdo y su dinámica de proliferación durante el procesamiento y almacenamiento.

4.2. Objetivos específicos

1. Implementar una estrategia microbiológica para aislar e identificar bacterias asociadas al deterioro de carne de cerdo.
2. Identificar en un modelo de deterioro, *in vitro*, los géneros bacterianos con capacidad deterioradora de carne de cerdo.
3. Cuantificar e identificar a través de un análisis metagenómico la diversidad bacteriana causante del deterioro, durante el procesamiento y almacenamiento de la carne de cerdo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales y equipos

- Cajas Petri de plástico estériles de 90x90 mm
- Micropipetas de 100-1000, 20-200 y 1-10 μ L (Lab systems)
- Puntas universales para micropipeta, diferentes medidas
- Botella para medio de cultivo redonda, con tapa de rosca de 250, 500 y 1000 mL (Pyrex)
- Espátulas, pinza y tijeras de acero inoxidable
- Incubadora de temperaturas ajustables 20-80 °C (IF750, Memmert)
- Incubadora de 7-25 °C (HVTM12DABB, Haier)
- Autoclave tipo olla, 121°C (Market-Forge, Sterilimatic)
- Balanza analítica digital, 64/0,0001g (Talent, Sartorius)
- Vasos de precipitado de vidrio y plástico 10, 50, 100, 250, 500 y 1000 mL (Pyrex/ Kimax)
- Licuadora clásica negra con papillero (BLSTBPST013, Oster)
- Potenciómetro pH/ORP Meter (Hanna Instruments Inc HI2213)
- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries Inc.)
- Centrifuga velocity 14 (Metrix by Dinamic)
- Mini Centrífuga (C1008-P, BENCHMARK MY FUGE™ MINI)
- Centrífuga de mini placas (P-25, Allsheng Instruments)
- PowerLyzer 24 Bench Top Bead-Based Homogenizer (MO BIO Laboratories, Inc.)
- Espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA)
- Campana de flujo laminar vertical, Clase II, Tipo A2 (LIMUSTELL)
- Termociclador (T100, Bio-rad)
- Termociclador tiempo real de alta capacidad (CFX96touch, Bio-rad)
- UV Transiluminador (TM-26, LABNET)
- Mini-Sub Cell GT (329BR026312, BIO RAD)

- Cámara de electroforesis (POWER PAC™ BASIC, BIO RAD)
- Multiskan™ GO (Thermo Scientific)
- Cámaras de Conway de Polipropileno con tapa (Bel-Art)
- Papel filtro cualitativo estándar grado 1 (Whatman)
- Bolsa de cierre hermético con zipper transparente (Ziploc)
- Toppers con tapa hermética
- Microplaca de ELISA (Thermo Scientific)
- Placa de PCR 96 pozos (HSP9601, BIO RAD)
- Sellos adhesivos (MSB100, BIO RAD)
- Tiras ópticas planas de 8 tapas para tiras/placas de tubos de 0,2 MI (TCS0803, BIO RAD)
- Tubos de PCR de bajo perfil, tira de 8 tubos (TLS 0851, BIO RAD)
- Microtubos de 1.5 mL (MCT-150-C, Axygen)

5.1.1. Reactivos

- Cloruro de sodio *NaCl* (Fermont)
- Glicerol (Golden Bell)
- Kits de extracción de ADN: Quick-DNA™ Miniprep Kit (Zymo Research) y ZymoBIOMICS DNA Miniprep (Zymo Research)
- Iniciadores específicos (*Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, universales para gen *16S rRNA*) (IDT)
- Enzima DreamTaq™ (Thermo Scientific)
- Enzima Taq polimerasa Phire Hot Start II ((Thermo Scientific))
- Enzima Taq Polimerasa PowerUp™ SYBR™ Green (Thermo Scientific)
- dNTP: Soluciones acuosas de 100 mM de dATP, dCTP, dGTP y dTT (Thermo Fisher Scientific)
- Taq Buffer (10X) ((Thermo Scientific))
- Albúmina de suero bovino (BSA) (Bio Labs)
- Tampón TBE 10X (Tris-borate-EDTA) (Thermo Scientific)
- Agarosa al 1.5 % (Invitrogen)

- Agua libre de nucleasas (IDT)
- Verde de bromocresol (Golden Bell)
- Rojo de metilo (Golden Bell)
- Carbonato de Potasio K_2CO_3 (Golden Bell)
- Ácido Bórico H_3BO_3 (Golden Bell)
- Ácido Sulfúrico H_2SO_4 (Golden Bell)
- Etanol al 96% (DRX^R)
- Vaselina (Vaseline)

5.1.2. Medios de Cultivo

- Caldo soya tripticaseína (CST) (BD Bioxon)
- Agar soya tripticaseína (AST) (BD Bioxon)
- Agar R2A (BD Bioxon)
- Agar agar (BD Bioxon)

5.1.3. Otros

- Chuleta de cerdo
- Cepas de *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Pseudomonas*, *Hafnia*

5.2. Metodología para el Objetivo 1

5.2.1. Aislamiento e Identificación de bacterias asociadas al deterioro de carne de cerdo

La identificación de bacterias asociadas al deterioro (BAD) en carne de cerdo se realizó mediante cultivos microbiológicos, a partir de aislamientos bacterianos obtenidos en diferentes tiempos durante el periodo de almacenamiento de la carne.

Para este fin, se obtuvo carne de cerdo (chuleta) de un supermercado de la ciudad de Querétaro, la muestra fue trasladada al laboratorio para ser procesada inmediatamente. La carne fue cortada en trozos pequeños (~25-30 g) y almacenada en bolsas de polietileno por 8 días a temperatura de refrigeración (4 °C). La recuperación de bacterias se llevó a cabo en los días 0, 2, 4 y 8, a través de lavado de las muestras, dentro de una bolsa estéril con 50 mL de solución salina al 0.85 % frotando por 3 minutos por el exterior de la bolsa para coleccionar las células bacterianas presentes en la carne. A partir de esta solución, se hicieron diluciones décuples seriadas y se inocularon 100 µl en cajas Petri con los diferentes medios de cultivo oligotróficos (Cuadro 1) (Ahn *et al.*, 2019).

Cuadro 1. Composición de los medios de cultivo oligotróficos a utilizar.

Medios de cultivo	Glucosa (g)	Triptéina (g)	Peptona (g)	Sales (g)	Agar Bacteriológico (g)
M1	-	1.5	0.5	0.5	15
M2	-	0.15	0.05	0.05	15
M3	-	0.015	0.005	0.005	15
M4	0.5	-	1	0.65	15

Sales: 0.5 g

Los medios inoculados se incubaron a 22 °C por 48-72 h. Posteriormente, se seleccionaron colonias representativas de diferentes morfologías, para obtener cultivos bacterianos puros utilizando Agar Soya Tripticaseína (AST). Las bacterias

aisladas se cultivaron en Caldo Soya Trypticaseína (CST) y se conservaron en glicerol estéril al 50 % (v/v) a -20 °C, con el fin de emplearlas en análisis ulteriores (Xia *et al.*, 2023).

La identificación de los aislamientos obtenidos se basó en un ensayo de amplificación y secuenciación del gen *16S rRNA*. Los cultivos puros de incubaron en Caldo Soya Trypticaseína (CST) a 22 °C por 48 h. Posteriormente, se utilizó el kit comercial Quick-DNA™ Miniprep (Zymo Research) para la extracción de ADN. El procedimiento consistió en centrifugar 1 mL de la suspensión bacteriana a 13,000 rpm por 3 minutos, al finalizar, al pellet obtenido se le realizó el proceso de extracción siguiendo el protocolo establecido por el laboratorio Microbiología Molecular. La concentración y calidad del ADN se midieron utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA). Posteriormente, se ajustó la concentración a 5 ng/μl para su empleo en la reacción de PCR dirigida al gen *16S rRNA*. Los iniciadores de PCR utilizados fueron el 8F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y 1510R (CGGTTACCTTGTTACGACTT), el protocolo de PCR consistió en:

- Desnaturalización inicial a 94 °C por 3 minutos
- Desnaturalización: 35 ciclos de 94 °C por 45 segundos
- Alineación de 55 °C por 30 segundos
- Extensión de 72 °C por 30 segundos
- Extensión final de 72 °C por 5 minutos

(Frank *et al.*, 2008)

Los productos de PCR se secuenciaron por el método de Sanger (*GENEWIZ, EE.UU.*, 2023), las secuencias obtenidas se analizaron mediante las bases de datos SILVA *rRNA* database Project y el Ribosomal Database Project 11 (Cole *et al.*, 2014; Hernández *et al.*, 2020).

5.3. Metodología para el Objetivo 2

5.3.1. Modelo de deterioro *in vitro*

La evaluación del nitrógeno básico volátil total (TVB-N) generado en carne de cerdo almacenada durante 8 días a 4 °C se llevó a cabo mediante la aplicación del modelo *in vitro* propuesto. La chuleta de cerdo fue adquirida en un supermercado de la ciudad de Querétaro. Una porción de esta carne, denominada "carne convencional", fue almacenada durante 8 días a 4 °C en un recipiente estéril con tapa hermética.

Por otro lado, la otra porción de carne fue sometida a un proceso de "esterilización" con el objetivo de reducir la carga bacteriana. Para ello, la carne se cortó en trozos de 25 g y se sometió a un proceso de lavado en cinco etapas. Se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril, seguidos de dos enjuagues con una solución de cloro al 20 %. Posteriormente, los trozos de chuleta se sumergieron en alcohol etílico al 97 % durante un minuto y se expusieron brevemente a una llama hasta la completa combustión del etanol. La superficie quemada fue eliminada con tijeras estériles, y la carne "esterilizada" se trasladó a recipientes estériles para llevar a cabo experimentos *in vitro*.

Las muestras se almacenaron a 4 °C durante 8 días y posteriormente se sometieron al análisis de TVB-N en los días 0, 2, 4 y 8 de almacenamiento en la misma condición. La medición se realizó por el método microdifusión de Conway. Para ello, se homogenizaron 5 g de muestra con 30 mL de agua destilada en una licuadora por 1 min y se completó con agua destilada a un volumen de 50 mL. El homogeneizado se filtró utilizando papel filtro Whatman No.1, de donde se extrajo 1 mL del filtrado. Este se colocó en el espacio externo de la cámara de Conway, mientras que en el espacio interno se dispuso 1 mL de H₃BO₃ al 0.01N junto con 200 µl del reactivo de Conway. Después, se añadió 1 mL de K₂CO₃ saturado al espacio externo de la cámara, y se procedió a cerrarla y sellarla con vaselina.

La concentración de TVB-N se determinó mediante la siguiente expresión matemática:

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

Dónde:

- *S* es el tamaño de la muestra en gramos
- *a* representa el volumen en mL de H₂SO₄ añadidos a la muestra
- *b* representa el volumen en mL de H₂SO₄ añadidos al blanco
- *f* es el factor estándar del H₂SO₄

Los resultados se expresan en mg de TVB-N por 100 g de carne de cerdo.

Conway y Byrne, 1933; GB, 2016; Masterson, 2013

5.3.2. Modelo *in vitro* de bacterias deterioradoras en carne de cerdo

Con el propósito de identificar los géneros bacterianos capaces de deteriorar carne de cerdo, se utilizó el modelo *in vitro* propuesto. Para este fin, se utilizaron los aislamientos obtenidos en la sección 5.2.1. La carne de cerdo (chuleta) se adquirió en un supermercado de la ciudad de Querétaro. Para reducir la carga bacteriana, la carne se “esterilizo”. La carne se cortó en porciones de 25 g y se sometió a un proceso de lavado que consistió en cinco etapas: tres enjuagues con agua destilada estéril, seguidos de dos enjuagues con una solución de cloro al 20 %. Posteriormente, las porciones de chuleta se sumergieron en alcohol etílico al 97 % durante un minuto y se pasaron momentáneamente por una flama hasta que la combustión final del etanol. Después de retirar la superficie quemada con tijeras estériles se transfirió la carne “esterilizada” a bolsas estériles de cierre hermético para inocular cada bolsa con los aislamientos previamente obtenidos.

Se estandarizó la preparación de los inóculos obtenidos en la sección 5.2.1., con el fin de obtener una concentración de 0.5 McFarland. Para lograr esta concentración, se inocularon en 3 mL de Caldo Soya Trypticaseína con 1 a 3 colonias previamente crecidas en Agar Soya Trypticaseína y se homogenizaron durante 30 s en el vortex. A continuación, se dispusieron 200 µL del inóculo en el pocillo de la microplaca de

ELISA (por duplicado), utilizando Caldo Soya Trypticaseína como blanco. Las absorbancias se leyeron a 625 nm en un espectrofotómetro para microplacas Multiskan. Con base a los valores registrados, se llevó a cabo un periodo de incubación de 20-45 min hasta obtener absorbancias entre 0.1 y 0.08, que son equivalentes a 0.5 McFarland (Hwang *et al.*, 2015; Novoa-Palomares *et al.*, 2022).

Las muestras se almacenaron a 4 °C durante 8 días para poder medir la concentración de TVB-N en los días 0, 2, 4 y 8 de almacenamiento. La medición se realizó por el método microdifusión de Conway como se describió en la sección 5.3.1.

5.3.3. Determinación de pH

La medición de pH se realizó en carne almacenada durante 0, 2, 4 y 8 días a 4 °C, mediante la metodología descrita por Kang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2021, realizando ajustes menores. Las muestras de carne (5 g) se homogenizaron con 45 mL de agua destilada y luego se filtraron con papel filtro (Whatman No.1). Se determinaron los valores de pH de los filtrados mediante un medidor de pH/ORP Meter (Hanna Instruments Inc HI2213), previamente calibrado el electrodo de vidrio en soluciones tampón pH 4.0 y pH 7.0. Cada muestra se midió por triplicado.

5.4. Metodología para el Objetivo 3

5.4.1. Preparación de muestras

La evaluación de la diversidad bacteriana en la chuleta de cerdo se llevó a cabo mediante la toma de muestras, siguiendo una versión modificada del procedimiento descrito en la sección 4.4.1, que incluyó el pesaje de 5 g de la muestra. A continuación, se tomaron las porciones de carne de cerdo con pinzas estériles y se colocaron en bolsas también estériles. Las muestras se enjuagaron con 1.5 mL de solución salina estéril al 0.85 % por 1 min con el fin de obtener las poblaciones

microbianas asociadas. Finalmente, los lavados se transfirieron a tubos Eppendorf de 1.5 mL y se almacenaron a -20 °C para su uso posterior.

5.4.2. Extracción y secuenciación de ADN

Las muestras obtenidas se procesaron para extraer el ADN y posteriormente se amplificaron mediante PCR para el gen *16S rRNA*. La extracción de DN se realizó con el kit comercial ZymoBIOMICS® DNA Miniprep kit (Zymo Research) (Piraine *et al.*, 2021). La concentración y calidad del ADN se midieron utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA) y análisis de electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. Las muestras de ADN resultantes se diluyeron a una concentración de 5 ng/μL y fueron almacenados a -20 °C (Can-Herrera *et al.*, 2021).

5.4.3. Secuenciación masiva del gen *16S rRNA* y preparación de librerías

La secuenciación dirigida al gen *16S rRNA* se llevó a cabo con los iniciadores Quick-16S™ Primer Set V3-V4 (Zymo Research). Las librerías se generaron con el kit comercial Quick-16S™ NGS Library Prep Kit (Zymo Research). Con el fin de reducir la formación de quimeras y cuantificar los productos finales, las reacciones de amplificación de la región V3-V4 se realizaron en equipos de qPCR. Los productos finales de PCR se recogieron en función de la misma molaridad. Posteriormente, la biblioteca resultante se sometió a una purificación utilizando el kit Select-a-Size DNA Clean & Concentrator™ (Zymo Research, Irvine.), y después se cuantifico con las plataformas TapeStation® (Agilent Technologies) y Qubit (Life Technologies™). Durante todos los procesos se utilizaron controles negativos y positivos (ZymoBIOMICS Microbial Community DNA Standard).

La biblioteca final se secuenció utilizando un kit de reactivos V3 (600 ciclos) en un Illumina® MiSeq™, la secuenciación se realizó con un PhiX >10 %. Las muestras de ADN se procesaron a través de la secuenciación de ZymoBIOMICSTM: Targeted Metagenomic Sequencing (Zymo Research, Irvine.) (Can-Herrera *et al.*, 2021; Çelik *et al.*, 2021; Piraine *et al.*, 2021; Resendiz-Nava *et al.*, 2023).

5.4.4. Análisis bioinformático

Se llevó a cabo un proceso de *demultiplexing* en los archivos que contenían las secuencias adquiridas, con el propósito de eliminar los códigos de barras que se habían introducido durante la preparación de las *librerías*. Después, se aplicó un procedimiento de *trimming* utilizando el software de análisis de Illumina para homogeneizar las secuencias resultantes. Las secuencias resultantes se dividieron en archivos FASTQ y se sometieron a un procesamiento mediante el paquete DADA2 para eliminar las secuencias quiméricas y deducir cuales son las secuencias variantes de amplicones (secuencias agrupadas con un 100% de similitud, ASV, por sus siglas en inglés). La asignación taxonómica de los ASV a nivel de familia se realizó con la herramienta Uclust del programa QIIME v.1.9.1 con la base de datos de referencia de Zymo Research Database (Abellan-Schneyder *et al.*, 2021; Berni Canani *et al.*, 2017; Neu *et al.*, 2021; Piraine *et al.*, 2021; Resendiz-Nava *et al.*, 2023).

5.4.5. Análisis de la diversidad y abundancia bacteriana

Se identificó la composición de la microbiota en la carne de cerdo evaluando la abundancia relativa y el porcentaje de ocurrencia con valores de corte $\geq 1\%$ y $\geq 50\%$ (Resendiz-Nava *et al.*, 2023). Se realizó la estimación de la abundancia relativa a nivel taxonómico de familia y se realizaron análisis de diversidad alfa mediante los índices de riqueza (richness), índice Simpson y equidad (*evenness*) (Feranchuk *et al.*, 2018; Hagerty *et al.*, 2020). La estimación de la diversidad alfa se realizó con el programa estadístico PAST versión 4.03. Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis mediante la prueba T de Student y prueba de Fisher's utilizando el programa StatView 5.0.1. El nivel de significancia establecido fue $P < 0.05$ (K. Li *et al.*, 2013; Neu *et al.*, 2021)

5.5. Análisis estadístico

Los resultados de TVB-N y pH fueron objeto de análisis estadístico a través de pruebas de T-Student, con un nivel de significancia establecido en $P < 0.05$. La ejecución de estos análisis se realizó empleando el software Minitab (versión 19.3.03, liberada el 17 de marzo de 2022).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Aislamiento e identificación de Bacterias Asociadas al Deterioro de la Carne de Cerdo

Con el fin de aislar e identificar bacterias asociadas al deterioro (BAD) de la carne de cerdo se utilizó una combinación de métodos cultivo-independientes y cultivo-dependientes. En esta investigación, se optó por utilizar medios oligotróficos; esta elección se basó en la previa documentación que sugiere que los medios de agar convencionales no son idóneos para el aislamiento de bacterias asociadas al deterioro en carne (Medina *et al.*, 2017). La implementación de esta metodología permitió recuperar un total de 75 cepas bacterianas a partir de chuleta de cerdo almacenadas a 4 °C durante 8 días. Estas cepas presentaban diversas características morfológicas (Figura 5), provenientes de los diferentes medios oligotróficos (M1, M2, M3 y M4).

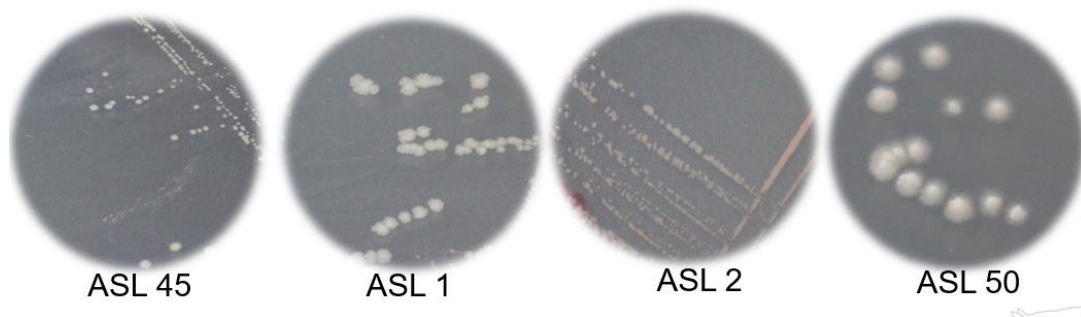


Figura 5. Diversas morfologías en los aislamientos obtenidos.

ASL: Aislamiento

La mayor cantidad de cepas se recuperó del agar M4, seguido por el agar M1, M2 y, en último lugar, el agar M3 (Figura 6).

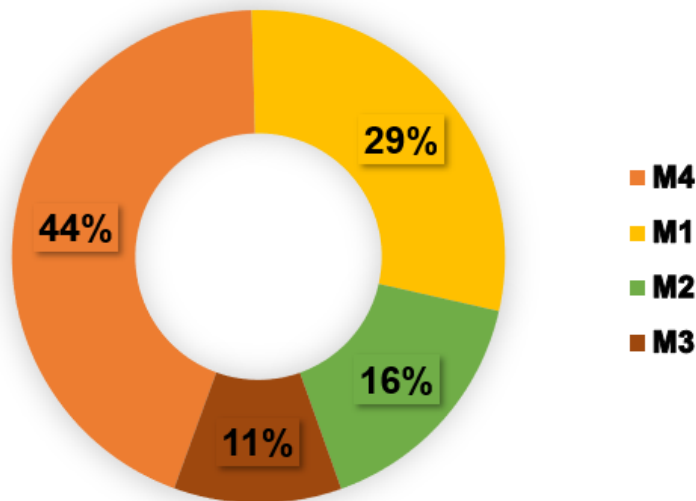


Figura 6. Porcentaje de aislamientos recuperados en los diferentes medios oligotróficos. (n = 75 aislamientos)

Este resultado resalta la importancia de seleccionar cuidadosamente los medios de cultivo para aislar bacterias con bajos requerimientos nutricionales. El agar M4 demostró ser eficaz para el aislamiento de bacterias oligotróficas en la carne de cerdo debido a su limitada disponibilidad de nutrientes. La variación en la recuperación en distintos medios refleja la diversidad en los requerimientos nutricionales de las bacterias asociadas al deterioro, lo que sugiere que cada medio favorece grupos bacterianos específicos (Ahn *et al.*, 2019; Sáenz-García *et al.*, 2020).

6.2. Modelo *in vitro* propuesto para identificar bacterias deterioradoras en carne de cerdo

Para evaluar la reproducibilidad y consistencia del modelo *in vitro* propuesto para determinar la capacidad deterioradora de las bacterias aisladas de la carne de cerdo, se realizó una comparación entre "carne convencional" y "carne estéril," ambas muestras almacenadas durante 8 días a 4 °C. La medición de nitrógeno volátil total (TVB-N), se realizó durante los 0, 2, 4 y 8 días (Figura 7).

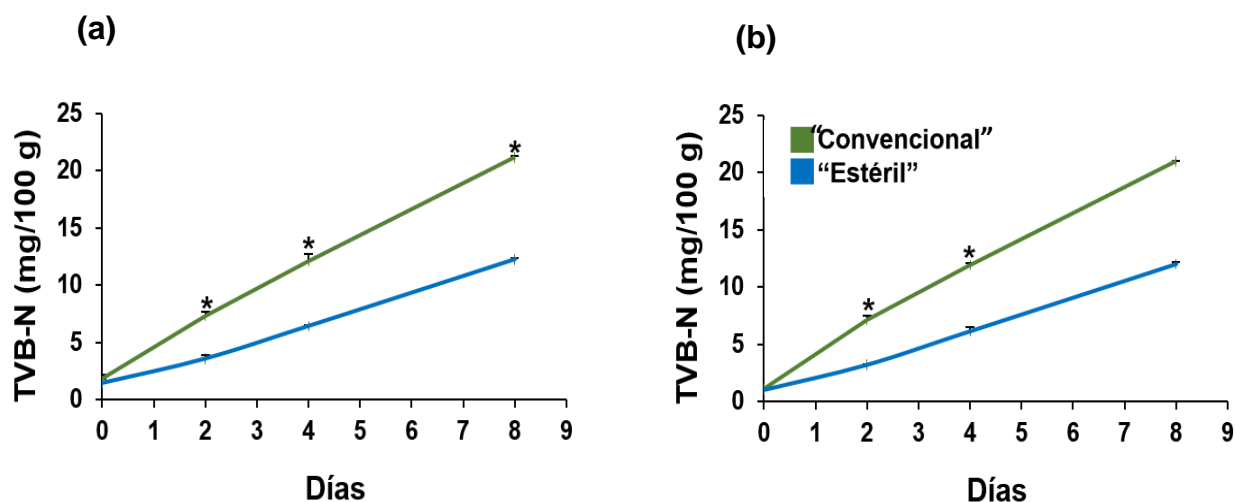


Figura 7. Determinación de TVB-N en carne de cerdo almacenada durante 8 días, ambos experimentos se realizaron con “carne convencional” vs “carne estéril” (a). Experimento 1 (b) Experimento 2. Los resultados están expresados como mg/100 g de peso. El gráfico presenta los valores promedio \pm error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas según la prueba T de Student ($P < 0.05$)

La determinación de TVB-N se utiliza para cuantificar los compuestos nitrogenados, que se generan debido a la actividad bacteriana implicada en el deterioro de la carne de cerdo (Alizadeh-Sani *et al.*, 2020; Dirpan y Hidayat, 2023). En ambos experimentos, se observa un aumento significativo ($P < 0.05$) en la producción de TVB-N a medida que transcurren los días, siendo la carne convencional la que muestra una mayor producción en comparación con la carne estéril (Figura 8).

Los valores iniciales de TVB-N en la “carne convencional” fueron de 1.83 mg/100 g en el experimento 1 y de 1.09 mg/100 g en el experimento 2, lo que sugiere que el producto cumplía con los parámetros de frescura establecidos (Alizadeh-Sani *et al.*, 2020; Lee y Shin, 2019).

La “carne estéril” tenía una producción inicial de TVB-N de 1.44 mg/100 g y aumentó significativamente a 12.2 mg/100 g (Figura 7a). La producción de TVB-N en la “carne estéril” inició en 1.04 mg/100 g y finalizó en 11.98 mg/100 g (Figura 7b). La reducción en la producción de TVB-N en la carne de cerdo esterilizada se atribuye a la efectividad del método de esterilización en la reducción de la carga bacteriana inicial y por ende el retraso de la descomposición de proteínas. Por parte de las BCD (Hwang *et al.*, 2015; Saenz-García *et al.*, 2020; Q. Wang *et al.*, 2020).

El umbral aceptable de TVB-N para considerar la carne de cerdo como fresca y no en proceso de deterioro es de 20 mg/100 g (GB, 2016; Holman *et al.*, 2021). En la Figura 7a y 7b, se observa que los valores de TVB-N en la “carne convencional” superaron el límite para el día 8 de almacenamiento. En contraste, el contenido de TVB-N en la “carne estéril” se mantuvo significativamente por debajo de este umbral, registrando valores de 12.2 y 11.98 mg/100 g, respectivamente.

El incremento en los niveles de TVB-N en la carne convencional se debe a la actividad proteolítica de las bacterias que provocan el deterioro de la carne; estas bacterias degradan moléculas que contienen nitrógeno, como proteínas y ácidos nucleicos, y a la acumulación de compuestos no proteicos, como amoníaco, aminas primarias, secundarias y terciarias, y otros compuestos volátiles (Khezrian y Shahbazi, 2018; Lv *et al.*, 2023).

En un estudio previo, Lv y colaboradores (2023) observaron que los valores de TVB-N fueron similares y superaron el límite máximo aceptable de 20 mg de TVB-N/100 g para carne de cerdo, después de 8 días, aunque en el caso de la carne tratada con recubrimientos comestibles, el contenido final de TVB-N se mantuvo por debajo de dicho límite. Estos hallazgos también coinciden con los resultados presentados en el estudio de Alizadeh-Sani y colaboradores (2020). En su investigación, llevaron a cabo un seguimiento de los niveles de TVB-N en muestras de carne de cordero durante un período de 15 días de almacenamiento. El valor inicial de TVB-N en la carne de cordero fue de 7.61 mg/ 100 g de carne, lo que sugiere una alta calidad higiénica en las muestras iniciales. A medida que se prolongaba el tiempo de almacenamiento, se observó un aumento significativamente más rápido en los niveles de TVB-N en el grupo de control en comparación con las muestras tratadas con aceite de romero. Ambos experimentos presentaron una tendencia similar a la observada en nuestro estudio.

En este estudio, se ha propuesto un modelo *in vitro* con el propósito de identificar bacterias deterioradoras en carne de cerdo. A través, de la comparación entre “carne convencional” y “carne estéril” almacenadas durante 8 días a 4 °C, hemos evaluado la reproducibilidad y consistencia de nuestro modelo, centrándonos en la

medición de TVB-N. Los resultados obtenidos en este experimento indican que la carne convencional mostró un aumento significativo en la producción de TVB-N, superando el límite máximo aceptable de 20 mg de TVB-N por cada 100 g de carne después de 8 días de almacenamiento. Por otro lado, la carne esterilizada presentó una producción de TVB-N que se mantuvo considerablemente por debajo de este límite, lo cual puede atribuirse a la eficacia del método de esterilización en la reducción de la carga bacteriana inicial.

Estos resultados refuerzan la importancia de nuestro modelo *in vitro* para evaluar la capacidad deterioradora de las bacterias aisladas de la carne de cerdo, destacando la influencia de la carga bacteriana en la producción de TVB-N. Además, nuestros hallazgos concuerdan con investigaciones previas (Alizadeh-Sani *et al.*, 2020; Lee y Shin, 2019) respaldando la utilidad de este enfoque en la detección y evaluación de bacterias deterioradoras en productos cárnicos.

6.3. Cambios del pH en la carne de cerdo durante el almacenamiento

La determinación del pH en la carne emerge como un parámetro esencial en la evaluación de su calidad y estado de frescura. Este parámetro brinda información valiosa acerca del proceso de deterioro que la carne está experimentando.

Se llevó a cabo una evaluación de los cambios de pH en muestras de carne de cerdo "convencional" y "carne estéril", ambas sometidas a un periodo de almacenamiento a 4 °C por 8 días. La medición del pH se efectuó en los días 0, 2, 4 y 8 (Figura 8).

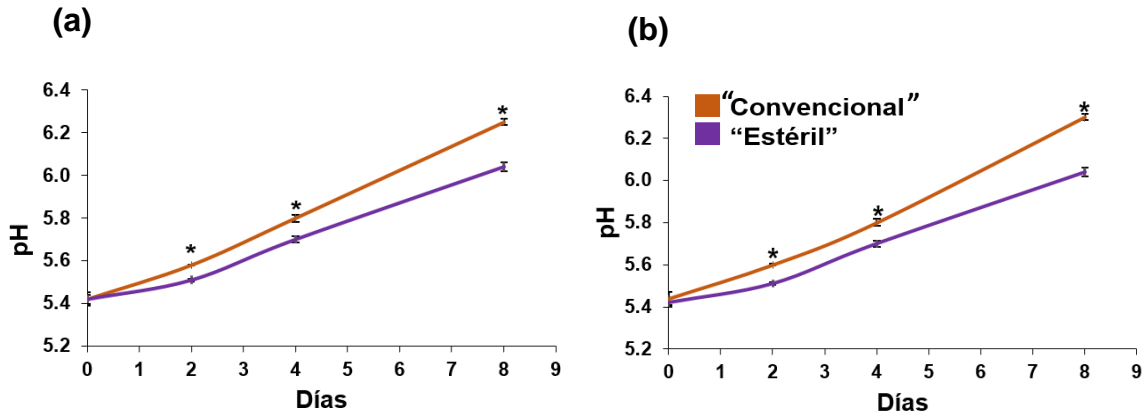


Figura 8. Determinación de pH en carne de cerdo durante 8 días, ambos experimentos se realizaron con “carne convencional” vs “carne estéril” (a). Experimento 1 (b). Experimento 2. El gráfico presenta los valores promedio \pm error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas: prueba T de Student ($P < 0.05$)

En ambas pruebas representadas en la Figura 8, se evidencia un incremento notable ($P < 0.05$) en los valores de pH a medida que avanza el tiempo de almacenamiento a 4 °C, destacándose la “carne convencional” como aquella con valores de pH más altos.

El pH inicial en la carne convencional fue de 5.42 en el experimento 1 y 5.44 para el experimento 2; aunque el pH normal en la carne fresca oscila entre 7.0 y 7.2, este desciende rápidamente después del sacrificio del ganado debido al proceso de glucólisis anaeróbica, ocasionado por la interrupción del suministro de oxígeno a los músculos. En la glucólisis, las reservas de glucógeno se transforman en ácido láctico, lo que reduce el pH. Este proceso concluye con el agotamiento de los niveles de glucógeno (Dirpan y Hidayat, 2023).

El incremento subsiguiente en el pH se atribuye a la alcalinización ocasionada por la liberación de productos resultantes de la proteólisis post-mortem (Lee y Shin, 2019). Como se visualiza en las Figuras 8a y 8b, el pH de las muestras de “carne convencional” experimentó un aumento significativo durante el periodo de almacenamiento ($P < 0.05$), registrando valores de 6.25 y 6.30 en ambos experimentos.

Investigaciones anteriores han señalado que el incremento en el pH está vinculado con el rápido deterioro de la carne durante su almacenamiento. En el caso de la “carne estéril”, la variación poco evidente en el pH se atribuye a la eficacia del método de esterilización para reducir la carga bacteriana inicial y retardar la descomposición de proteínas (Hwang *et al.*, 2015; Saenz-García *et al.*, 2020; Q. Wang *et al.*, 2020). La evaluación del pH en la carne de cerdo a lo largo del tiempo de almacenamiento proporciona información valiosa sobre los cambios químicos y las reacciones enzimáticas provocadas por las bacterias en la misma.

6.4. Evaluación de la capacidad deterioradora de bacterias aisladas en carne de cerdo

Se realizaron pruebas de nitrógeno volátil total (TVB-N) con los 75 aislamientos obtenidos en la sección 5.2.1, con el propósito de categorizar a las bacterias como BAD o BCD. Esta clasificación se basó en los criterios establecidos por la Norma Nacional de la República Popular de China (GB 2707-2016), que establece un umbral de referencia en 20 mg/100 g (Figura 9).

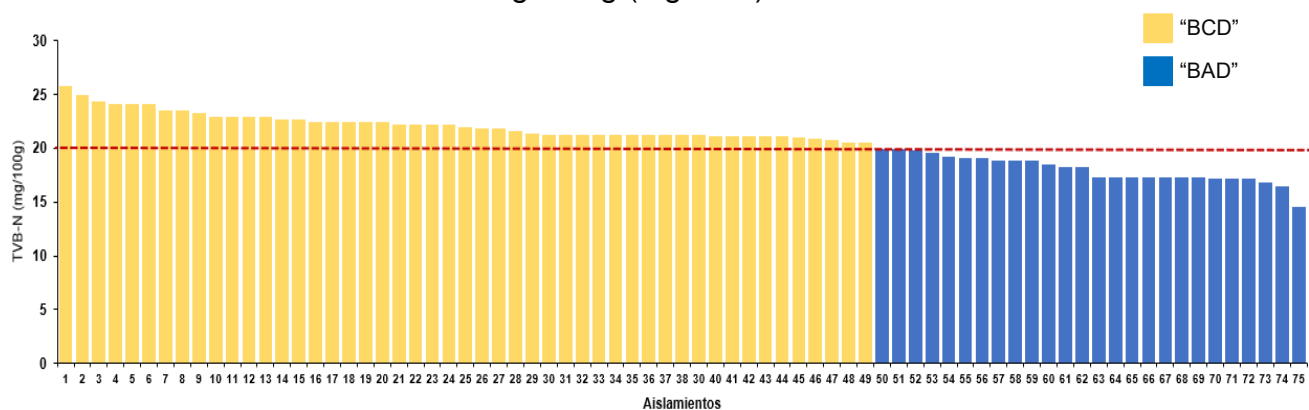


Figura 9. Evaluación de la capacidad deterioradora de los 75 aislamientos mediante la determinación de TVB-N. Se utilizó como umbral de referencia una concentración >20 mg TVB-N/100 g, marcada por una línea roja punteada.

Aquellas bacterias que excedieron este límite, representando el 65 % de los aislamientos en presente estudio, fueron clasificadas como BCD. Por otro lado, el 35 % de los aislamientos no rebasaron los niveles de TVB-N establecidos y se clasificaron como BAD.

Los 49 aislamientos obtenidos fueron sometidos a un nuevo proceso de selección, considerando tanto el medio como la muestra de origen, resultando finalmente en 27 aislamientos.

Posteriormente, se realizó la identificación de los aislamientos pertenecientes al grupo de las BCD (Figura 10).

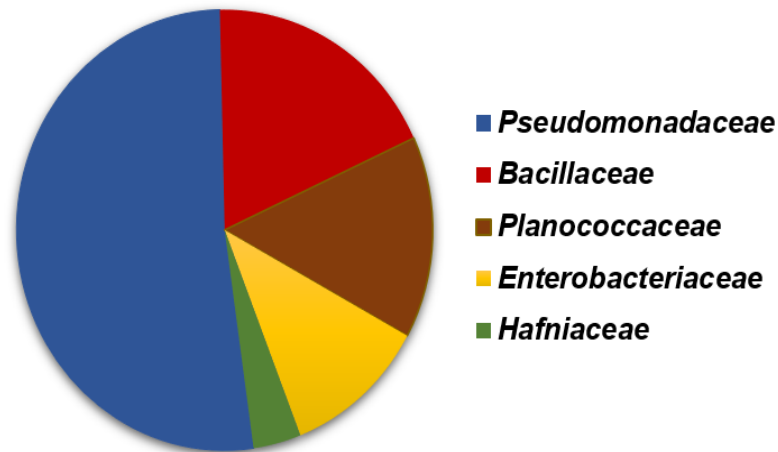


Figura 10. Diversidad de aislamientos causantes de deterioro (BCD) a nivel Familia, obtenidos a partir de carne de cerdo almacenada durante 8 días.

(n = 27 aislamientos)

La identificación de los aislados obtenidos de los diferentes medios de cultivo se realizó mediante el análisis de secuenciación del gen *16S rRNA* (Lee et al., 2017). Las familias identificadas como BCD, engloba a las familias *Pseudomonadaceae*, *Bacillaceae*, *Planococcaceae*, *Enterobacteriaceae* y *Hafniaceae*. Se observó que *Pseudomonadaceae* predominó significativamente, representando el 52 % del total, seguida de *Bacillaceae* con un 18 %, *Planococcaceae* con un 15 %, *Enterobacteriaceae* con un 11 %, y *Hafniaceae* con un 4 %.

El conocimiento de las poblaciones microbianas asociadas con el deterioro de la carne es extenso. De acuerdo con la literatura, los géneros más comúnmente involucrados en el deterioro de la carne son *Pseudomonas*, *Enterobacterias*, *Bacillus*, *Hafnia*, *Serratia* *Kurthia* (Chaillou et al., 2020; Kukhtyn et al., 2020),

pertenecientes a las familias identificadas en este trabajo de investigación. La presencia de géneros bacterianos en la chuleta de cerdo podría atribuirse al hecho de que la carne de cerdo constituye una matriz compleja y rica en nutrientes (proteína, en su mayoría), facilitando el crecimiento microbiano (Eshamah *et al.*, 2020; N. Li *et al.*, 2019).

El deterioro es el resultado de la interacción entre la proliferación de bacterias y la actividad enzimática de estas; como resultado, el deterioro se debe a las bacterias predominantes en la matriz de carne (BCD) (Lee *et al.*, 2017). Los factores como la temperatura, el pH, entre otros, tienen un impacto en la tasa de crecimiento, selección y actividad bacteriana durante el almacenamiento (Comi, 2017). Se estima que sólo el 10 % de los microorganismos inicialmente presentes son psicrotolerantes y pueden crecer en condiciones de refrigeración (0 a 8 °C) y la fracción de microorganismos que causan deterioro es aún menor (FoodSafety.gov, 2019; Jääskeläinen *et al.*, 2018; H. S. Lee *et al.*, 2017).

Los hallazgos de esta investigación coinciden de manera significativa con los resultados previamente publicados por Li y col., (2019), quienes informaron sobre la composición de la microbiota y controlaron las poblaciones bacterianas predominantes en el tocino almacenado a temperaturas de refrigeración, utilizando métodos tanto independientes como dependientes del cultivo. Estos resultados respaldan la noción de que los géneros bacterianos identificados en ambas investigaciones pueden considerarse indicativos del deterioro de la carne de cerdo almacenada en condiciones de refrigeración. Investigadores como Zhao y col., (2019), Chaillou y col., (2020), así como Vargas y col., (2022), también han documentado resultados similares. La consistencia en los hallazgos de estas investigaciones refuerza aún más la importancia de comprender la microbiota asociada al deterioro de la carne.

Tras la identificación de las bacterias causantes del deterioro, se llevaron a cabo pruebas de TVB-N mediante el modelo *in vitro* previamente mencionado. El propósito fue identificar los géneros que más influyen en la producción de nitrógeno

en la carne de cerdo almacenada a 4 °C durante 8 días. Los resultados de esta evaluación se muestran en la Figura 11.

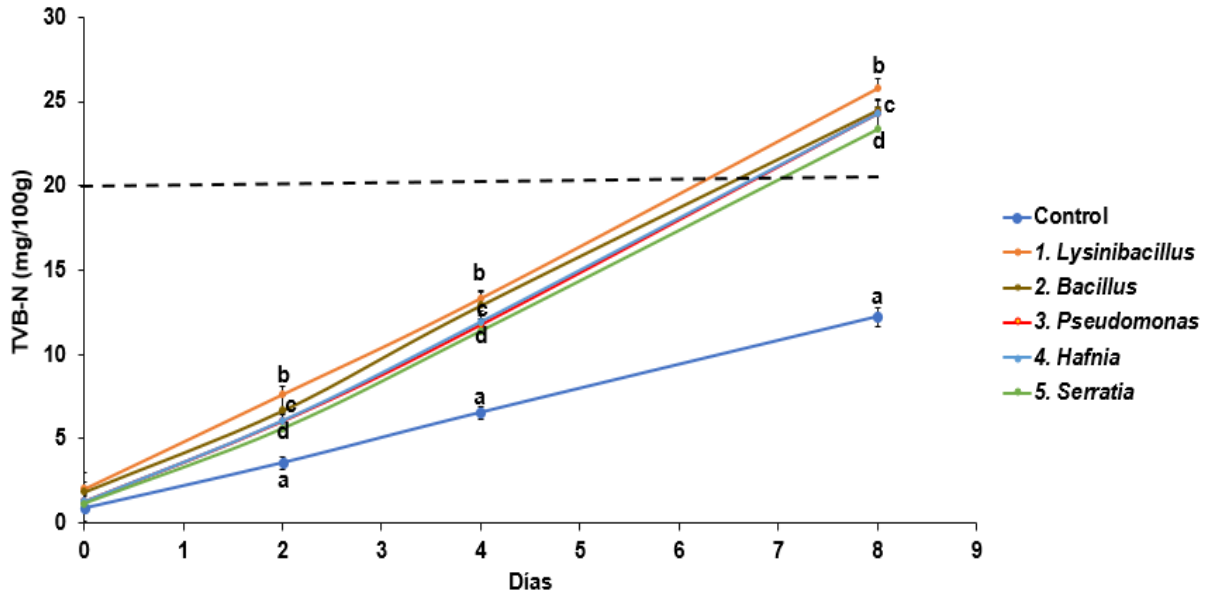


Figura 11. Capacidad deterioradora de los géneros bacterianos presentes en carne de cerdo después de 8 días de almacenamiento. El gráfico presenta los valores promedio \pm error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas: ANOVA de Fisher ($P < 0.05$).

La Figura 11 muestra que el género con mayor capacidad deterioradora fue *Lysinibacillus*, seguida de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Hafnia* y *Serratia*. La producción de TVB-N aumentó de manera progresiva a medida que avanzaba el almacenamiento, superando los niveles permitidos de TVB-N (≥ 20 mg TVB-N/100g) en el sexto día. El octavo día, se observó la máxima producción de TVB-N, alcanzando valores de 26, 25, 24, 24 y 22 mg TVB-N/100 g, respectivamente, para cada uno de los géneros ($P < 0,05$). Estos resultados indican una correlación directa entre el tiempo de almacenamiento y la producción de TVB-N por parte de los diferentes géneros bacterianos. En contraste, el grupo de control no superó los valores mínimos de TVB-N establecidos, con una producción final de 12 mg TVB-N/100 g.

El deterioro de la carne es un proceso complicado en el que diferentes comunidades bacterianas exhiben tanto relaciones positivas como negativas, tales como

antagonismo y metabiosis. Estas interacciones son influidas por una serie de factores bióticos y abióticos, estrechamente relacionados a la cantidad inicial y la diversidad de microorganismos presentes, así como a su crecimiento, la oxidación de lípidos y las reacciones enzimáticas autolíticas (Chen *et al.*, 2023; Comi, 2017).

Los microorganismos poseen la capacidad de actuar sobre las proteínas a través de su actividad proteolítica, convirtiéndolas en compuestos más reducidos, como aminoácidos liberados, los cuales se someten a desaminación oxidativa, descarboxilación y desulfuración, generando NH₃, CO₂ y H₂S como productos resultantes. Dimetilamina (DMA) y trimetilamina (TMA), sirven como indicadores adicionales de la descomposición microbiana de las proteínas en los alimentos (Zequan *et al.*, 2019). *Lysinibacillus*, se distingue por su capacidad para generar endosporas, permitiéndole sobrevivir en temperaturas bajas (Abreu *et al.*, 2021; C. Li *et al.*, 2020). Debido a deficiencias en algunas enzimas involucradas en el procesamiento de azúcares o polisacáridos, *Lysinibacillus* es capaz de utilizar sustratos predominantemente ricos en componentes proteicos, como la carne. La presencia abundante de enzimas proteolíticas y sistemas de transporte permite a esta bacteria emplear vías metabólicas exclusivas, utilizando una amplia variedad de compuestos orgánicos y aminoácidos (Jamal y Ahmad, 2022; Nandy *et al.*, 2013).

Es importante destacar que algunos microorganismos proteolíticos, al liberar aminoácidos, tienen la capacidad de potenciar el crecimiento de otros. En particular, el desarrollo de *Bacillus* y *Enterobacteriaceae* resulta en una notable producción de nitrógeno, contribuyendo así al complejo proceso de descomposición en los alimentos.

Otros estudios previos han informado que *Pseudomonas* es la bacteria más comúnmente encontrada durante el proceso de deterioro de la carne debido a su capacidad para prosperar en una amplia variedad de entornos, lo que se atribuye a sus bajos requerimientos nutricionales y su versatilidad metabólica como la producción de proteasas extracelulares y lipasas a bajas temperaturas (Chen *et al.*, 2023; H. Zhang *et al.*, 2019).

Por otro lado, la familia *Enterobacteriaceae* es comúnmente asociada con el deterioro de la carne roja almacenada por períodos prolongados. Este fenómeno se evidenció en su estudio, donde después de 9 días de almacenamiento en condiciones refrigeradas (0 a 8 °C), se observó un aumento significativo en la producción de TVB-N, hallazgo que también se respalda con resultados similares encontrados en carne de vacuno refrigerada (Khezrian y Shahbazi, 2018).

Estudios anteriores han mostrado la relevancia de la temperatura de almacenamiento en el crecimiento y potencial de deterioro de las bacterias presentes en la carne. En el estudio, realizado por Zhang y col., (2019), se logró la identificación de las bacterias BCD y se llevaron a cabo análisis adicionales utilizando muestras de pollo conservadas a una temperatura óptima de 4 °C. Aquí, se pudo observar que las notables fluctuaciones de temperatura durante el procesamiento, transporte y almacenamiento desempeñan un papel determinante en el desarrollo bacteriano. Por ende, los resultados concernientes a las bacterias de deterioro y los metabolitos asociados podrían experimentar variaciones sustanciales en distintas temperaturas, tales como 0 - 8 °C.

Los resultados obtenidos en nuestra investigación son consistentes con los informados por otros estudios (Khezrian y Shahbazi, 2018; Shavisi *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019) para hamburguesa de res, carne fresca de cerdo, y carne picada, respectivamente. En estos casos, la mayoría de las familias de bacterias identificadas como causantes del deterioro coinciden con las mencionadas en la presente investigación.

La evaluación de la capacidad deterioradora de bacterias aisladas en carne de cerdo destaca la complejidad de los procesos microbianos que afectan la calidad y seguridad alimentaria. Los resultados evidencian la presencia de bacterias con variados niveles de capacidad deterioradora.

6.5. Determinación de pH a las BCD

La evaluación del pH en la carne es esencial para medir su calidad y frescura, y podría indicar una relación con el modelo in vitro propuesto para determinar la capacidad deterioradora de las bacterias aisladas de la carne de cerdo. Después de identificar las bacterias responsables del deterioro, se evaluó el pH para comprender los rangos en los que las bacterias BCD podrían estar presentes. Esta determinación se llevó a cabo utilizando carne de cerdo almacenada a 4 °C durante 8 días (Figura 12).

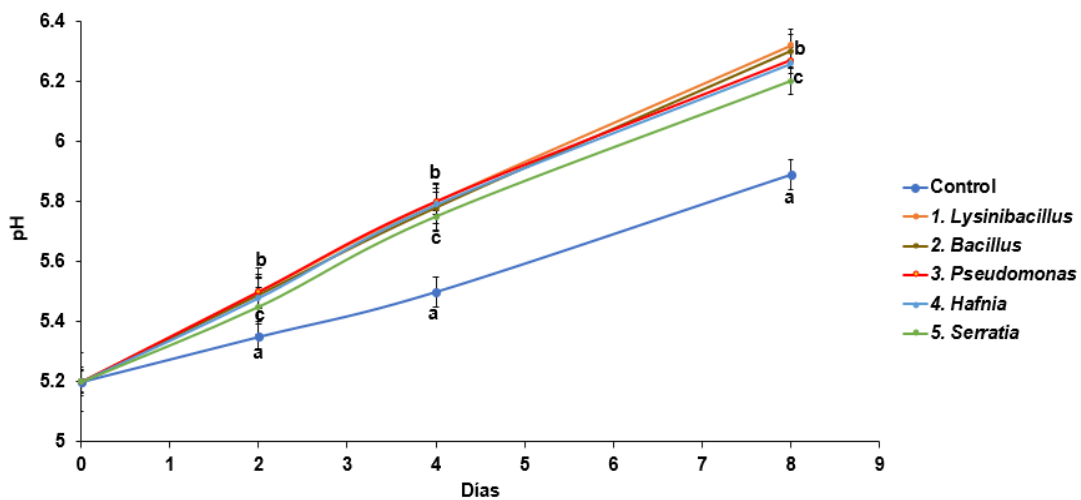


Figura 12. Determinación de pH en los géneros bacterianos presentes en carne de cerdo después de 8 días de almacenamiento. El gráfico presenta los valores promedio \pm error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas: ANOVA de Fisher ($P < 0.05$).

Como indica la Figura 12, se observa un incremento gradual en el pH tanto en el grupo de control como en los géneros bacterianos a medida que avanza el periodo de almacenamiento. Además, se puede apreciar que los cambios en el pH durante el almacenamiento muestran una tendencia consistente entre todos los géneros bacterianos.

El pH inicial fue de 5.2; sin embargo, después de 8 días de almacenamiento, las bacterias *Lysinibacillus*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Hafnia* presentaron un pH alrededor de 6.3, evidenciando que no había diferencias estadísticas significativas

($P > 0.05$) entre ellas. Sin embargo, *Serratia*, con un pH final de 6.2, mostró una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$). En contraste, el grupo de control, que tuvo un pH inicial de 5.2, presentó un pH de 5.9 en el día 8, mostrando diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) en comparación con los géneros bacterianos.

El pH inicial de las muestras de carne de cerdo inoculadas se situó dentro del rango de valores reportados previamente para la carne fresca de cerdo, entre 5.2 y 5.6, lo cual es considerado un rango óptimo para garantizar una adecuada vida útil comercial y asegura que la carne conserva las características fisicoquímicas adecuadas (Hernández-García *et al.*, 2022; Sammanee *et al.*, 2022; Tang *et al.*, 2022)

El incremento del pH se atribuye principalmente a la actividad bacteriana. Durante el proceso de descomposición, las bacterias presentes en la carne inician la proteólisis de las proteínas y otros compuestos orgánicos presentes en el tejido muscular. Como consecuencia de esta actividad bacteriana, se generan subproductos metabólicos, como el amoníaco (NH_3), que actúa como una base fuerte y desprotona el agua para originar iones de amonio e hidróxido. La liberación de amoníaco por parte de las bacterias puede elevar el pH del entorno circundante, resultando en un aumento de la alcalinidad (Chen *et al.*, 2023; Kang *et al.*, 2014; G. Wang *et al.*, 2021).

La práctica común de refrigerar carne, aunque eficaz para la preservación, puede tener consecuencias desfavorables cuando se prolonga su almacenamiento a bajas temperaturas. Esta situación propicia el desarrollo de bacterias psicrótroficas, incluyendo especies como *Pseudomonas* spp. y algunas *Enterobacterias*, desempeñando un papel crucial en el deterioro de la carne. Estas bacterias influyen en el pH de la carne al producir, mediante su actividad proteolítica, una notable cantidad de proteasas extracelulares y lipasas que provocan el deterioro de la carne de cerdo, causando así un aumento en el pH. Este proceso da origen a compuestos orgánicos volátiles, como el ácido metil-2-butenoico, contribuyendo así al aumento en la producción de TVB-N (Tang *et al.*, 2022).

Hernández-García y colaboradores (2022), llevaron a cabo una evaluación del parámetro de pH en un estudio centrado en la calidad y estabilidad de filetes de carne de cerdo. Sus hallazgos revelaron valores similares a los reportados en esta investigación. Además, observaron que, durante el almacenamiento, los valores de pH de la carne aumentan debido al incremento del contenido de bases nitrogenadas, resultado de la proteólisis inducida por la actividad microbiana. Estos resultados también concuerdan con los reportados por E.J. Lee y Shin (2019) y por Tang y colaboradores (2022).

6.6. Correlaciones entre el pH y la concentración de TVB-N en la carne de cerdo

Se llevó a cabo análisis de correlación de Pearson con el objetivo de identificar posibles asociaciones entre las variaciones de pH y la concentración de TVB-N (≥ 20 mg/100 g) que se manifiestan durante el proceso de deterioro de la carne de cerdo y pH de los aislamientos con capacidad deterioradora. Este enfoque nos proporcionó una comprensión detallada de la fuerza y dirección de las asociaciones observadas contribuyendo así a la interpretación completa de las relaciones entre el pH y la concentración de TVB-N en la carne de cerdo deteriorada (Figura 13).

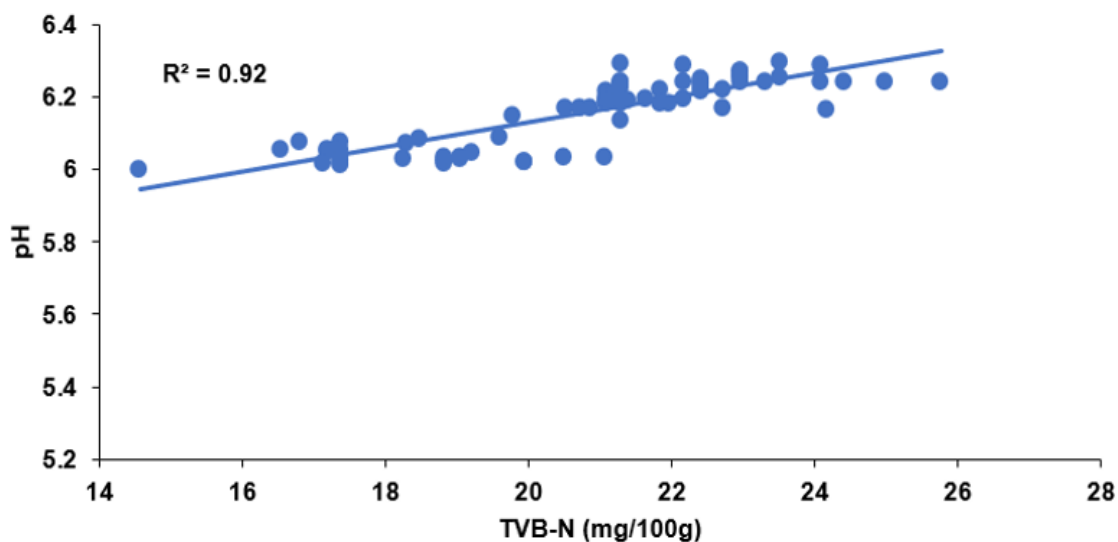


Figura 13. Correlación de Pearson entre valores de TVB-N y pH en aislamientos deterioradores de carne de cerdo deteriorada.

La relación entre los niveles de TVB-N y los valores de pH reveló una correlación positiva significativa ($r = 0.92$) (Figura 13), indicando una fuerte conexión entre los parámetros evaluados (Schober *et al.*, 2018). Según los hallazgos de este estudio, se determinó que las bacterias clasificadas como BCD deben presentar un valor de $\text{pH} \geq 6.2$, ya que a partir de este punto se observa una producción significativa de TVB-N (≥ 20 mg TVB-N/100g).

Este punto se resalta aún más al considerar que las bacterias proteolíticas encuentran condiciones favorables en productos cárnicos con valores de pH elevados. Esto se debe a que la carne con un pH más alto presenta menores reservas de glucógeno o glucosa, lo que convierte a las proteínas y aminoácidos en la principal fuente de energía disponible para las bacterias causantes del deterioro (BCD). En consecuencia, un pH más elevado indica mayor proteólisis mediada por las BCD y, por ende, una mayor producción y/o acumulación de TVB-N (Holman *et al.*, 2021; Honikel, 2014; Li *et al.*, 2019).

Esta asociación positiva entre los valores de pH y la concentración de compuestos nitrogenados volátiles (TVB-N) no es exclusiva de la carne de cerdo. Estudios anteriores han informado hallazgos similares en otras matrices alimentarias, como la carne de pato y de pescado (Qiao *et al.*, 2017; Tian *et al.*, 2017; Wang y Xie, 2020). Estos resultados respaldan la idea de que la relación entre el pH y la generación de TVB-N es un fenómeno observado en diversas fuentes de alimentos.

6.7. Análisis de la biodiversidad bacteriana y su abundancia relativa en carne de cerdo durante el almacenamiento

La diversidad de la comunidad microbiana y la abundancia relativa de las especies bacterianas presentes se evaluaron después de la secuenciación masiva del gen *16S rRNA*. A continuación, se ilustran los cambios en las abundancias relativas dentro de las comunidades bacterianas en cada uno de los días de almacenamiento a nivel familia y género (Figura 14 y 15).

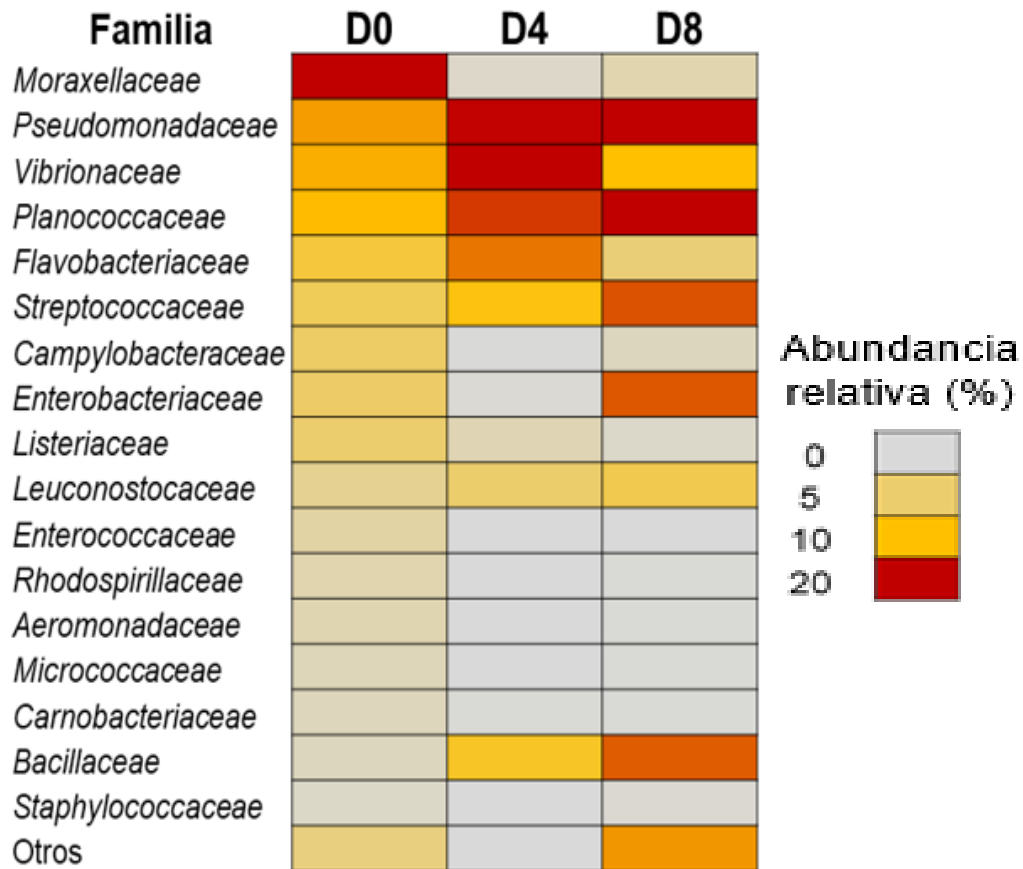


Figura 14. Mapa de calor que muestra los cambios en la composición de la comunidad bacteriana de la carne de cerdo almacenada por 8 días. Se muestran las abundancias relativas de las especies bacterianas a nivel de familia. Aquellas familias con una abundancia relativa <1% se agrupan bajo la categoría "Otros".

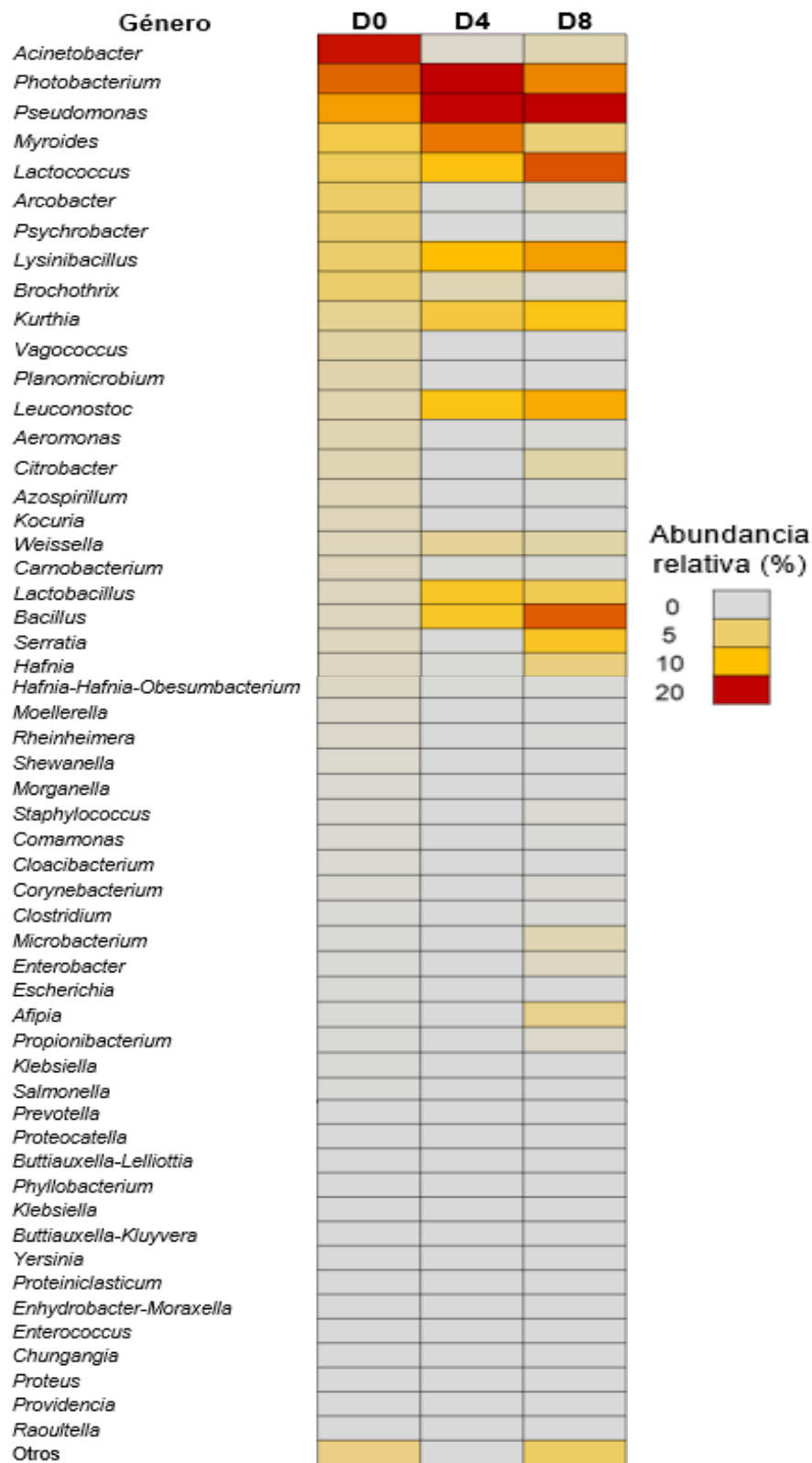


Figura 15. Mapa de calor que muestra los cambios en la composición de la comunidad bacteriana de la carne de cerdo almacenada por 8 días. Se muestran las abundancias relativas de las especies bacterianas a nivel de género. Aquellos géneros con una abundancia relativa <1% se agrupan bajo la categoría "Otros".

A lo largo del proceso de deterioro, se notaron marcadas variaciones en las comunidades bacterianas, lo cual podría estar asociado con el metabolismo y crecimiento bacteriano, así como el agotamiento de nutrientes (Zhang *et al.*, 2018).

La composición intrafamiliar difirió significativamente en cada momento del muestreo. En el transcurso del estudio, se identificaron un total de 18 familias (Figura 14) y 55 géneros diferentes (Figura 15). La diversidad bacteriana inicial podría estar asociada con la presencia de bacterias complejas en el entorno y la contaminación durante el proceso de obtención de la carne, transporte y punto de venta (Xia *et al.*, 2023).

Al comienzo del experimento, la diversidad genética de la comunidad microbiana fue más destacada, siendo *Moraxellaceae*, *Vibrionaceae* y *Pseudomonadaceae* las familias dominantes (Figura 14). Posteriormente, se observó una marcada disminución en la presencia de *Moraxellaceae*, posiblemente como resultado de la inhibición del crecimiento debido a la competencia bacteriana, especialmente por parte de las *Enterobacteriaceae*, este declive está vinculado a la capacidad mejorada de este grupo para llevar a cabo un metabolismo anaeróbico (Figura 14) (Zhang *et al.*, 2018).

Carnobacteriaceae, otra familia bacteriana, muestra una disminución a medida que avanzan los días de almacenamiento (Figura 14). Ese grupo es conocido como una bacteria deterioradora importante en diversas matrices alimentarias y se encuentra en toda la cadena de producción de la carne, desde el animal hasta el producto final. Investigaciones adicionales también han señalado su presencia en pechugas de pavo crudas, jamón, carne de pescado y carne de cerdo. Aunque los miembros de la familia *Carnobacteriaceae* podrían denominarse BCD, su predominio se ve superado por bacterias pertenecientes a la familia *Lactobacillaceae* en condiciones anaeróbicas, bajas temperaturas y valores bajos de pH (Remenant *et al.*, 2015).

En el cuarto día hay una disminución más pronunciada en la diversidad bacteriana, alcanzando solo el 50 % de la diversidad inicial (Figura 14 y 15). Esto podría atribuirse al agotamiento de los nutrientes fácilmente degradables, lo que resulta en la disminución de familias que carecen de las habilidades para metabolizar

nutrientes más complejos. Algunas bacterias también pueden generar condiciones específicas de antagonismo o metabiosis (Bozaris y Parlapani, 2017; Comi, 2017).

En el octavo día, se puede observar que la diversidad bacteriana ha aumentado en un 70 % con respecto al día 4, aunque aún se mantiene por debajo del nivel inicial (Figura 14 y 15). Este cambio en la diversidad bacteriana está relacionado con el agotamiento de la glucosa. Durante el almacenamiento, la glucosa se posiciona como una fuente energética esencial para los microorganismos que desencadenan la liberación de olores característicos del deterioro en productos cárnicos. La disminución de los recursos de glucosa conlleva a menudo a un cambio del metabolismo sacarílico hacia la degradación de aminoácidos en algunas especies bacterianas (Dorn-In *et al.*, 2023; Xiao *et al.*, 2013). Este fenómeno subraya la complejidad de las interacciones bacterianas durante el proceso de deterioro, donde factores como la disponibilidad de sustratos y el tipo de bacterias individuales presentes juegan un papel crucial (Dorn-In *et al.*, 2023; Xiao *et al.*, 2013).

La Figura 16, presenta el porcentaje de abundancia relativa por géneros, destacando aquellos encontrados con mayor prominencia durante el almacenamiento de la carne por 8 días. Estos géneros pertenecen a las familias previamente mencionadas, y entre las bacterias identificadas se encuentran *Pseudomonas*, *Lysinibacillus*, *Bacillus*, y *Serratia*.

A nivel de género, también es posible observar patrones de coexistencia o exclusión mutua entre diferentes géneros. Algunos géneros pueden presentar correlaciones positivas, lo que indica que sus abundancias tienden a aumentar o disminuir simultáneamente. Por otro lado, se pueden identificar géneros con correlaciones negativas, señalando una relación inversa en la que el aumento de la abundancia de uno se asocia con la disminución del otro. Estos patrones de correlación ofrecen valiosa información sobre las interacciones dinámicas entre los diferentes géneros bacterianos durante el período de almacenamiento de la carne (Dorn-In *et al.*, 2023).

A lo largo de todo el periodo de almacenamiento, se evidenció la presencia constante de las familias *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae* y *Planococcaceae*, respaldando así la categorización de estas como BCD. El

comportamiento dinámico de estas cuatro familias, así como los géneros que las componen, se destaca a medida que avanza el tiempo (Figura 16).

La familia *Pseudomonadaceae* donde se encuentra las *Pseudomonas*, se distingue por exhibir una mayor abundancia relativa en el día 0 ($P < 0.05$) en comparación con las demás familias. Para el día 8 se observa un aumento significativo en la abundancia relativa, indicando una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) (Figura 16a y b).

El comportamiento de la familia *Enterobacteriaceae*, es destacado por el incremento significativo ($P < 0.05$) en su abundancia relativa a lo largo del tiempo (Figura 16a). A pesar de experimentar una disminución en el día 4, se observa un aumento estadísticamente significativo en su abundancia relativa para el día 8, indicando una diferencia notable ($P < 0.05$). Este comportamiento también se refleja en los géneros *Hafnia* y *Hafnia Obesumbacterium*, que son parte de esta familia. Por otro lado, el género *Serratia* (Figura 16b), a pesar de pertenecer a esta familia, presenta un incremento gradual conforme avanzan los días ($P < 0.05$).

Contrario a lo observado con *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae* exhibió un comportamiento lineal, mostrando diferencia significativa ($P < 0.05$) en el porcentaje de abundancia relativa (Figura 16a y b).

Para concluir, se observa que *Lysinibacillus*, que forma parte de la familia *Planococcaceae*, exhibe un patrón de comportamiento semejante al de los géneros mencionados anteriormente, con un aumento progresivo a medida que transcurren los días de almacenamiento ($P < 0.05$). Este microorganismo se posiciona en segundo lugar con el mayor porcentaje de abundancia relativa (Figura 16a y b).

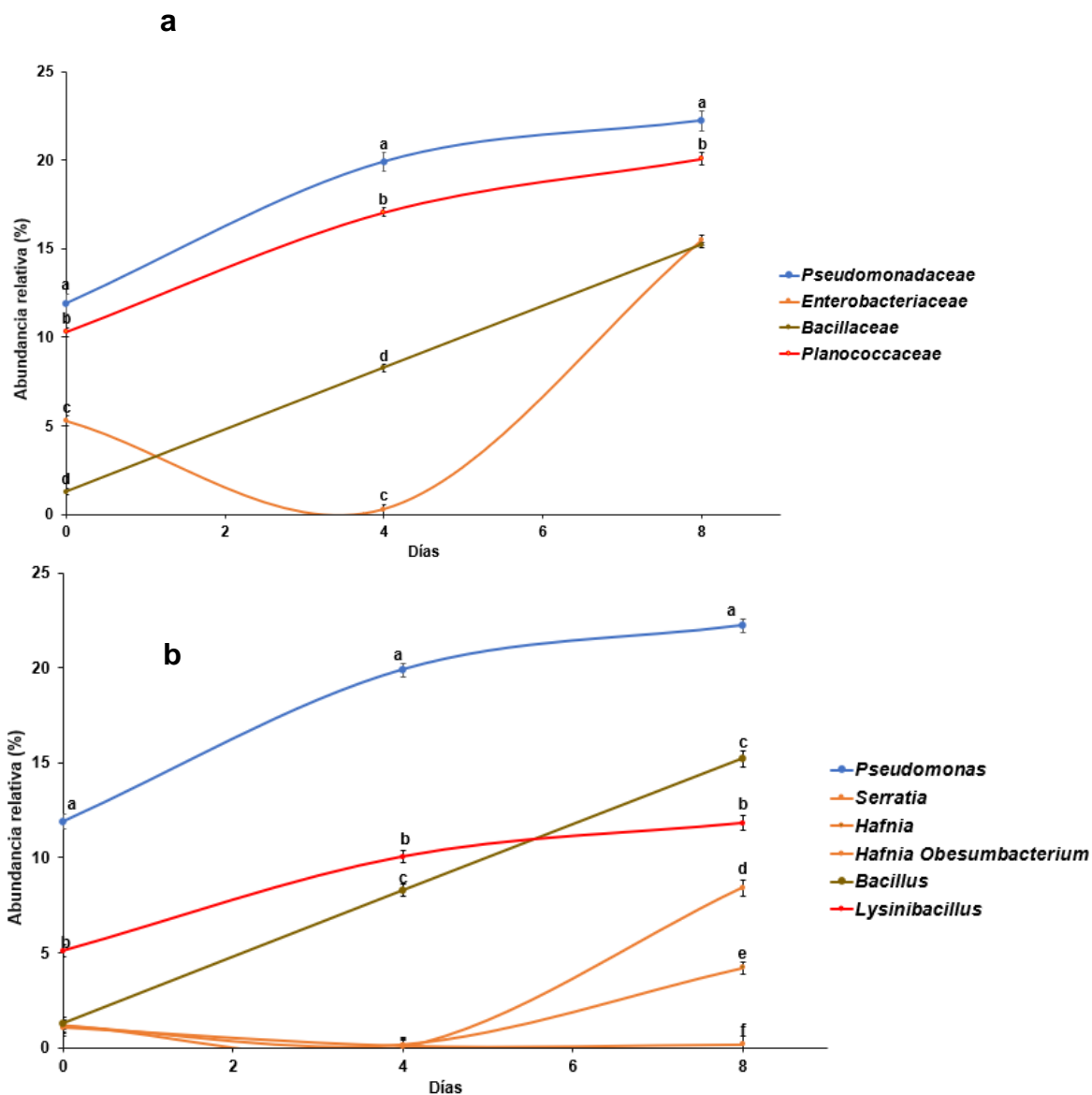


Figura 16. Abundancia relativa de las familias (a) y géneros (b) encontrados durante los 8 días de almacenamiento. El gráfico presenta los valores promedio \pm error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas: ANOVA de Fisher ($P < 0.05$).

Investigaciones previas han señalado la presencia frecuente de enterobacterias en carne refrigerada de cerdo, ternera y cordero. La prevalencia de *Enterobacteriaceae* sugiere una posible contaminación inicial o la existencia de microflora en la línea de producción o en el envasado (Remenant *et al.*, 2015). Estos microorganismos podrían desempeñar un papel significativo en el deterioro de los alimentos, ya que tienen la capacidad de metabolizar los aminoácidos y convertirlos en compuestos volátiles, como las aminas y compuestos sulfúricos (Remenant *et al.*, 2015).

Paralelamente, otro estudio (Xiao *et al.*, 2013) sobre el deterioro de la carne de Yao durante el almacenamiento indicó que *Enterobacteriaceae* fue uno de los taxones predominantes desde la etapa intermedia del periodo de almacenamiento experimental en adelante.

Los géneros que forman parte de la familia *Pseudomonadaceae* tienen una preferencia por metabolizar la glucosa. No obstante, cuando el gradiente de difusión de la glucosa desde el tejido subyacente hasta la superficie de la carne ya no puede satisfacer las demandas de la abundante población bacteriana deterioradora, inician a degradar los aminoácidos y proteínas. Esto conduce a la producción de amoníaco, aminas y sulfuros, que son compuestos químicos distintivos del deterioro de la carne de cerdo (Dorn-In *et al.*, 2023; Tian *et al.*, 2017).

Por otro lado, la familia *Bacillaceae* produce diversos compuestos nitrogenados asociados con el deterioro de la carne de cerdo (X.-R. Li *et al.*, 2021). Estas bacterias son reconocidas por su capacidad para formar esporas; también, se les atribuye la responsabilidad de la generación de acidez en la carne y otros cambios de deterioro, como el ablandamiento y la decoloración de la superficie, la licuefacción del producto, a lo largo de un amplio rango de temperaturas de procesamiento y almacenamiento (Xiao *et al.*, 2013).

Estudios comparables se han llevado a cabo para analizar la estructura de la microbiota y las posibles funciones que afectan el deterioro de la carne fresca de vacuno. Se han observado similitudes significativas en la diversidad bacteriana, así como cambios notables, incluyendo la disminución o desaparición de ciertas bacterias, de manera consistente con los hallazgos de este estudio. Además, la conservación de algunas especies bacterianas también fue observada en la investigación realizada por otros autores (Chen *et al.*, 2023; B. K. Hwang *et al.*, 2020; N. Li *et al.*, 2019).

Asimismo, se llevó a cabo la evaluación de la diversidad bacteriana mediante el análisis de la riqueza, el índice de Simpson, Shannon y la equidad (*evenness*), y los resultados obtenidos están representados en la Figura 17a, b, c y d.

El análisis de la riqueza de especies en la comunidad estudiada de carne de cerdo durante un período de 8 días (Figura 17a) ha proporcionado una perspectiva esencial de la diversidad biológica. Revela una mayor diversidad bacteriana en el día cero en comparación con los días subsiguientes ($P < 0.05$). No obstante, se observa una disminución en el día 4, seguida de un aumento en el día 8. Este patrón sugiere una fluctuación significativa en la variedad de bacterias a lo largo del tiempo, destacando la dinámica compleja de la microbiota en la carne de cerdo durante el período de estudio. Las disminuciones en la riqueza y diversidad bacteriana observadas al final del período de almacenamiento, en comparación con el día inicial, podrían ser atribuibles a diversos factores. Entre ellos se encuentran la posible deficiencia de nutrientes, el agotamiento de los niveles de oxígeno, la inhibición del crecimiento bacteriano y el aumento de la competencia entre las distintas cepas bacterianas (Xiao *et al.*, 2013).

El análisis de diversidad biológica mediante el Índice de Simpson arrojó resultados que detallan la composición de la comunidad estudiada. Los hallazgos clave se discuten a continuación (Figura 17b). La observación de las tres barras que representan los diferentes días de evaluación revela una baja diversidad, sin diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$). Esto sugiere que algunas especies podrían estar dominando la comunidad, ya que la falta de variación estadística indica una posible uniformidad en la composición de la población a lo largo de los días evaluados. La baja diversidad según el índice de Simpson sugiere interacciones ecológicas específicas, como competencia entre especies o condiciones ambientales particulares que favorecen a algunos organismos en detrimento de otros. Esta información es valiosa para comprender las dinámicas subyacentes en las comunidades estudiadas (Cauchie *et al.*, 2020; Xia *et al.*, 2023).

Se aprecia que en el Índice de Shannon se registra un valor de 2.5 en el día 0, evidenciando notables discrepancias entre los días 4 y 8, respectivamente ($P < 0.05$). Se observan alteraciones en la estructura de la comunidad bacteriana, con disminuciones en el día 4 y aumentos en el día 8 (Figura 17c). Estos cambios pueden vincularse a la introducción o pérdida de especies, así como a ajustes en

las interacciones ecológicas. Este índice, en consecuencia, facilita la validación de interacciones particulares entre especies, tales como las relacionadas con *Pseudomonadacea*, *Enterobacteriaceae* y *Bacillaceae*. Además, posibilita la identificación de la influencia de factores ambientales, como las temperaturas de refrigeración y la disminución de nutrientes en el entorno (Konopiński, 2020).

Durante los días evaluados, se aprecia que no existe una distribución homogénea de la diversidad bacteriana, como se refleja en los valores altos de equidad (*evenness*) (Figura 17d), indicando una marcada dominancia de algunas especies sobre otras (Cauchie *et al.*, 2020). Además, se observa que esta dominancia tiende a aumentar a medida que transcurren los días.

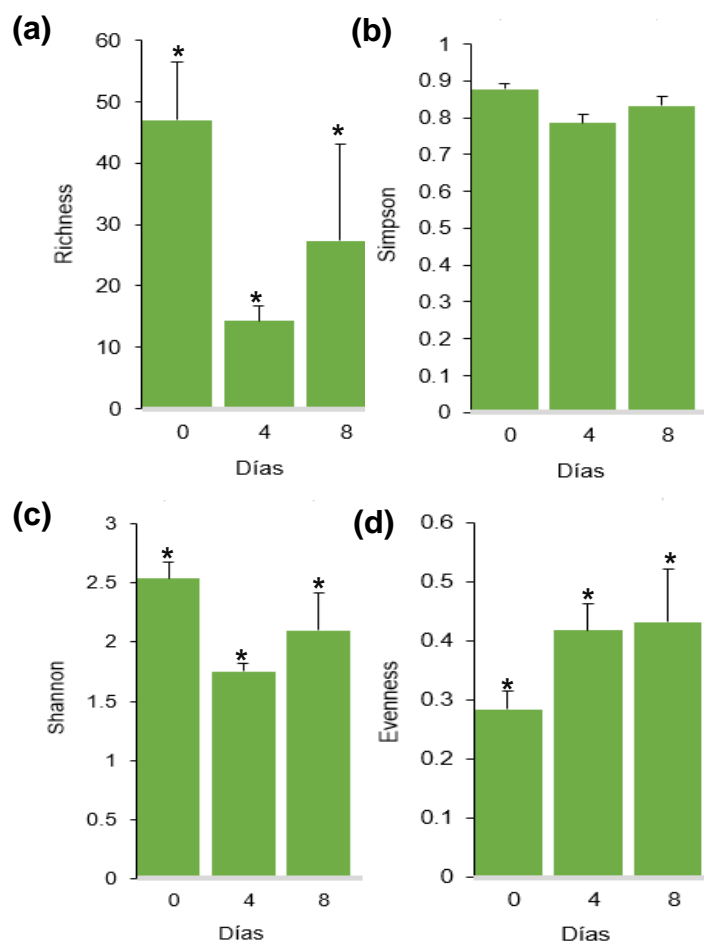


Figura 17. Diversidad bacteriana en la carne de cerdo durante el almacenamiento de 8 días. (a). Riqueza, (b). Índice de Simpson, (c). Índice de Shannon y (d). equidad (*evenness*). Los datos se presentan como medias \pm error estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas: prueba de Fisher ($P < 0.05$).

Cauchie y colaboradores (2020), llevaron a cabo un estudio sobre las comunidades bacterianas de deterioro presentes en envoltorios para alimentos y muestras de carne de cerdo picada envasadas en atmósferas modificadas, utilizando análisis metagenéticos. Al correlacionar los índices de Shannon y Simpson, informaron resultados coherentes con los hallazgos encontrados en esta investigación. Estas correlaciones también se han explorado en otros alimentos como salchichas, carnes blancas y pescado (Barcenilla *et al.*, 2022; Fougy *et al.*, 2016; Poirier *et al.*, 2018; Shedleur-Bourguignon *et al.*, 2023).

El empleo de índices como la riqueza de especies, el índice de Simpson, el índice de Shannon y la equidad (*evenness*) ha demostrado ser fundamental para caracterizar la biodiversidad y la abundancia relativa bacteriana durante el almacenamiento de la carne de cerdo. Estos índices proporcionan una perspectiva integral de la estructura de la comunidad bacteriana, permitiendo identificar patrones temporales en la diversidad y evaluar la equitativa distribución de las especies.

7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio han contribuido significativamente a la comprensión de los procesos microbiológicos asociados al deterioro de la carne de cerdo. Se ha observado que el agar M4 se destaca como un medio eficaz para el aislamiento de bacterias oligotróficas en la carne de cerdo, lo cual se atribuye a su limitada disponibilidad de nutrientes.

El modelo *in vitro* propuesto ha permitido establecer correlaciones significativas entre la concentración de TVB-N y el grado de deterioro de la carne, así como distinguir entre bacterias consideradas como BAD y BCD. La identificación de familias como *Pseudomonadaceae*, *Bacillaceae*, *Planococcaceae*, *Enterobacteriaceae* y *Hafniaceae* en la categoría BCD respalda la metodología como una herramienta para medir la capacidad deterioradora de las bacterias y comprender su impacto en la calidad de la carne de cerdo de manera objetiva.

Se ha establecido una correlación positiva entre el pH y la producción de TVB-N, proporcionando una comprensión significativa de las condiciones asociadas con el deterioro de la carne de cerdo.

El análisis metagenómico fue esencial para cuantificar e identificar la diversidad bacteriana en la carne de cerdo, enriqueciendo nuestra comprensión de los procesos microbiológicos vinculados al deterioro del producto. La evaluación de la diversidad bacteriana mediante indicadores como la riqueza, el índice de Simpson, Shannon y la equidad (*evenness*) ha demostrado ser fundamental para comprender la complejidad de las comunidades microbianas. Estas métricas han proporcionado una visión detallada de la estructura y distribución de las especies bacterianas presentes, permitiendo discernir patrones y cambios a lo largo del tiempo, y enriqueciendo así nuestro conocimiento en este ámbito.

8. REFERENCIAS

Abellan-Schneyder, I., Schusser, A. J., y Neuhaus, K. (2021). ddPCR allows 16S rRNA gene amplicon sequencing of very small DNA amounts from low-biomass samples. *BMC Microbiology*, 21(1), 349. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02391-z>

Abreu, A. C. da S., Carazzolle, M. F., Crippa, B. L., Barboza, G. R., Mores Rall, V. L., de Oliveira Rocha, L., y Silva, N. C. C. (2021). Bacterial diversity in organic and conventional Minas Frescal cheese production using targeted 16S rRNA sequencing. *International Dairy Journal*, 122, 105139. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105139>

Ahn, Y., Lee, U. J., Lee, Y.-J., LiPuma, J. J., Hussong, D., Marasa, B., y Cerniglia, C. E. (2019). Oligotrophic Media Compared with a Tryptic Soy Agar or Broth for the Recovery of *Burkholderia cepacia* Complex from Different Storage Temperatures and Culture Conditions. 29(10), 1495–1505. <https://doi.org/10.4014/jmb.1906.06024>

Alizadeh-Sani, M., Mohammadian, E., y McClements, D. J. (2020). Eco-friendly active packaging consisting of nanostructured biopolymer matrix reinforced with TiO₂ and essential oil: Application for preservation of refrigerated meat. *Food Chemistry*, 322, 126782. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126782>

Andreani, N. A., Carraro, L., Fasolato, L., Balzan, S., Lucchini, R., Novelli, E., y 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. *Italian Journal of Food Safety*, 5(4),. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2016.6175>

Bahlinger, E., Dorn-In, S., Beindorf, P.-M., Mang, S., Kaltner, F., Gottschalk, C., Gareis, M., y Schwaiger, K. (2021). Development of two specific multiplex qPCRs to determine amounts of *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Brochothrix thermosphacta* and *Staphylococcus* in meat and heat-treated meat products.

International Journal of Food Microbiology, 337, 108932.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108932>

Barcenilla, C., Álvarez-Ordóñez, A., López, M., Alvseike, O., y Prieto, M. (2022). Microbiological Safety and Shelf-Life of Low-Salt Meat Products—A Review. *Foods*, 11(15), 2331. <https://doi.org/10.3390/foods11152331>

Bassey, A. P., Chen, Y., Zhu, Z., Odeyemi, O. A., Gao, T., Olusola, O. O., Ye, K., Li, C., y Zhou, G. (2021). Evaluation of spoilage indexes and bacterial community dynamics of modified atmosphere packaged super-chilled pork loins. *Food Control*, 130, 108383. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108383>

Bassey, A. P., Chen, Y., Zhu, Z., Odeyemi, O. A., Frimpong, E. B., Ye, K., Li, C., y Zhou, G. (2021). Assessment of quality characteristics and bacterial community of modified atmosphere packaged chilled pork loins using 16S rRNA amplicon sequencing analysis. *Food Research International*, 145, 110412. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110412>

Bekhit, A. E.-D. A., Holman, B. W. B., Giteru, S. G., y Hopkins, D. L. (2021). Total volatile basic nitrogen (TVB-N) and its role in meat spoilage: A review. *Trends in Food Science y Technology*, 109, 280–302. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.006>

Bergmark, L., Poulsen, P. H. B., Al-Soud, W. A., Norman, A., Hansen, L. H., y Sørensen, S. J. (2012). Assessment of the specificity of Burkholderia and Pseudomonas qPCR assays for detection of these genera in soil using 454 pyrosequencing. *FEMS Microbiology Letters*, 333(1), 77–84. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02601.x>

Berni Canani, R., De Filippis, F., Nocerino, R., Laiola, M., Paparo, L., Calignano, A., De Caro, C., Coretti, L., Chiariotti, L., Gilbert, J. A., y Ercolini, D. (2017). Specific Signatures of the Gut Microbiota and Increased Levels of Butyrate in Children Treated with Fermented Cow's Milk Containing Heat-Killed *Lactobacillus paracasei* CBA L74. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(19), e01206-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01206-17>

Blázquez, I. O., y Julio, J. (2019). *Ánalisis microbiológico de alimentos cárnicos*. 39.

Böll, H. (2021). MEAT ATLAS Facts and figures about the animals we eat. https://friendsoftheearth.eu/wp-content/uploads/2021/09/MeatAtlas2021_final_web.pdf

Boziaris, I. S., y Parlapani, F. F. (2017). Chapter 3—Specific Spoilage Organisms (SSOs) in Fish. En A. Bevilacqua, M. R. Corbo, y M. Sinigaglia (Eds.), *The Microbiological Quality of Food* (pp. 61–98). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100502-6.00006-6>

Buzdy, J. (2022). Food Waste and its Links to Greenhouse Gases and Climate Change [Web oficial del gobierno de los Estados Unidos]. USDA, DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DE EE. UU. <https://www.usda.gov/media/blog/2022/01/24/food-waste-and-its-links-greenhouse-gases-and-climate-change>

Can-Herrera, L. A., Gutierrez-Canul, C. D., Dzul-Cervantes, M. a. A., Pacheco-Salazar, O. F., Chi-Cortez, J. D., y Carbonell, L. S. (2021). Identification by molecular techniques of halophilic bacteria producing important enzymes from pristine area in Campeche, Mexico. *Brazilian Journal of Biology*, 83, e246038. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.246038>

Casaburi, A., Piombino, P., Nychas, G.-J., Villani, F., y Ercolini, D. (2015). Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage. *Food Microbiology*, 45, 83–102. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.02.002>

Cauchie, E., Delhalle, L., Taminiau, B., Tahiri, A., Korsak, N., Burteau, S., Fall, P. A., Farnir, F., Baré, G., y Daube, G. (2020). Assessment of Spoilage Bacterial Communities in Food Wrap and Modified Atmospheres-Packed Minced Pork Meat Samples by 16S rDNA Metagenetic Analysis. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.03074>

Çelik, Z. C., Çakiris, A., Yanıkoğlu, F., Abacı, N., Ekmekçi, S. S., Iğın, C., Çelik, H., y Tağtekin, D. (2021). Metagenomic analysis of black-stained plaques in permanent

dentition. *Archives of Oral Biology*, 128, 105171. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2021.105171>

Chaillou, S., Chaulot-Talmon, A., Caekebeke, H., Cardinal, M., Christieans, S., Denis, C., Hélène Desmonts, M., Dousset, X., Feurer, C., Hamon, E., Joffraud, J.-J., La Carbona, S., Leroi, F., Leroy, S., Lorre, S., Macé, S., Pilet, M.-F., Prévost, H., Rivollier, M., ... Champomier-Vergès, M.-C. (2020). Origin and ecological selection of core and food-specific bacterial communities associated with meat and seafood spoilage. *The ISME Journal*, 9(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.202>

Chen, Y., Ma, F., Wu, Y., Tan, S., Niu, A., Qiu, W., y Wang, G. (2023). Biosurfactant from *Pseudomonas fragi* enhances the competitive advantage of *Pseudomonas* but reduces the overall spoilage ability of the microbial community in chilled meat. *Food Microbiology*, 115, 104311. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104311>

Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., Brown, C. T., Porrás-Alfaro, A., Kuske, C. R., y Tiedje, J. M. (2014). Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D633–D642. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1244>

Comi, G. (2017). Chapter 8—Spoilage of Meat and Fish. En A. Bevilacqua, M. R. Corbo, y M. Sinigaglia (Eds.), *The Microbiological Quality of Food* (pp. 179–210). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100502-6.00011-X>

Conway, E. J., y Byrne, A. (1933). An absorption apparatus for the micro-determination of certain volatile substances: The micro-determination of ammonia. *The Biochemical Journal*, 27(2), 419–429.

Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., Brown, C. T., Porrás-Alfaro, A., Kuske, C. R., y Tiedje, J. M. (2014). Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D633–D642. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1244>

Dave, D., y Ghaly, A. E. (2021). Meat Spoilage Mechanisms and Preservation Techniques: A Critical Review. *American Journal of Agricultural and Biological*

<http://www.thescipub.com/pdf/10.3844/ajabssp.2011.486.510>

Davoli R, Braglia S. Molecular approaches in pig breeding to improve meat quality. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2007 Dec;6(4):313-21. doi: 10.1093/bfgp/elm036. Epub 2008 Jan 21. PMID: 18208864.

Dirpan, A., y Hidayat, S. H. (2023). Quality and Shelf-Life Evaluation of Fresh Beef Stored in Smart Packaging. *Foods*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/foods12020396>

Dorn-In, S., Führer, L., Gareis, M., y Schwaiger, K. (2023). Cold-tolerant microorganisms causing spoilage of vacuum-packed beef under time-temperature abuse determined by culture and qPCR. *Food Microbiology*, 109, 104147. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104147>

Ercolini, D., Russo, F., Torrieri, E., Masi, P., y Villani, F. (2020). Changes in the Spoilage-Related Microbiota of Beef during Refrigerated Storage under Different Packaging Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 4663–4671. <https://doi.org/10.1128/AEM.00468-06>

Eshamah, H. L., Naas, H. T., Garbaj, A. M., Azwai, S. M., Gammoudi, F. T., Barbieri, I., y Eldaghayes, I. M. (2020). Extent of pathogenic and spoilage microorganisms in whole muscle meat, meat products and seafood sold in Libyan market. *Open Veterinary Journal*, 10(3), 276–288. <https://doi.org/10.4314/ovj.v10i3.6>

FAO. (2019). El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Progresos en la lucha contra la pérdida y el desperdicio de alimentos 2019: Moving forward on food loss and waste ... Reduction. FOOD y AGRICULTURE ORG. <https://www.fao.org/3/ca6030es/ca6030es.pdf>

FAO. (2020a). FAO - Noticias: La pérdida y el desperdicio de alimentos deben reducirse a fin de aumentar la seguridad alimentaria y la sostenibilidad del medio ambiente. Obtenido de <https://www.fao.org/news/story/es/item/1310444/icode/>

FAO. (2020b). Meat Market Review—Overview of global meat market developments in 2020. 11. Obtenido de <https://www.fao.org/news/story/es/item/1310444/icode/>

FAO. (2022). Plataforma técnica sobre la medición y la reducción de las pérdidas y el desperdicio de alimentos | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Obtenido de <https://www.fao.org/platform-food-loss-waste/es/>

Feranchuk, S., Belkova, N., Potapova, U., Kuzmin, D., y Belikov, S. (2018). Evaluating the use of diversity indices to distinguish between microbial communities with different traits. *Research in Microbiology*, 169(4), 254–261. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.03.004>

FoodSafety.gov. (2019, abril 12). Cold Food Storage Chart [Text]. Cold Food Storage Chart. <https://espanol.foodsafety.gov/tablas-de-seguridad-alimentaria-mfu8/Tabla-de-conservación-de-alimentos-fríos>

Fougy, L., Desmots, M.-H., Coeuret, G., Fassel, C., Hamon, E., Hézard, B., Champomier-Vergès, M.-C., y Chaillou, S. (2016). Reducing Salt in Raw Pork Sausages Increases Spoilage and Correlates with Reduced Bacterial Diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(13), 3928–3939. <https://doi.org/10.1128/AEM.00323-16>

Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A., y Olsen, G. J. (2008). Critical Evaluation of Two Primers Commonly Used for Amplification of Bacterial 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2461–2470. <https://doi.org/10.1128/AEM.02272-07>

Gao, X., Li, P., Mei, J., y Xie, J. (2021). TMT-Based Quantitative Proteomics Analysis of the Fish-Borne Spoiler *Shewanella putrefaciens* Subjected to Cold Stress Using LC-MS/MS. *Journal of Chemistry*, 2021, , 1-16. e8876986. <https://doi.org/10.1155/2021/8876986>

GB, 2016. (2016). Determinación del Nitrógeno Básico Volátil Total en los Alimentos (GB5009.228-2016). <https://www.chinesestandard.net/PDF.aspx/GB5009.228-2016>

GENEWIZ, EE.UU. (2023, octubre). <https://www.genewiz.com/Public/Services/Sanger-Sequencing/>

Goldberg, A. L. (2013). Protein Degradation. En W. J. Lennarz y M. D. Lane (Eds.), *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)* (pp. 617–624). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00063-3>

Gonzalez-Rivas, P. A., Chauhan, S. S., Ha, M., Fegan, N., Dunshea, F. R., y Warner, R. D. (2020). Effects of heat stress on animal physiology, metabolism, and meat quality: A review. *Meat Science*, 162, 108025. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.108025>

Guo, B., y Dalrymple, B. P. (2017). Chapter 11—Transcriptomics of Meat Quality. En P. P. Purslow (Ed.), *New Aspects of Meat Quality* (pp. 259–320). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100593-4.00012-6>

Gustavsson, J., Cederberg, C., y Sonesson, U., Van Otterdijk, R., y Meybeck, A. (2021). Pérdidas y desperdicio de alimentos en el mundo. 42.

Hagerty, S. L., Hutchison, K. E., Lowry, C. A., y Bryan, A. D. (2020). An empirically derived method for measuring human gut microbiome alpha diversity: Demonstrated utility in predicting health-related outcomes among a human clinical sample. *PLoS ONE*, 15(3), e0229204. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229204>

Hebbel, D. H. S. (2019). Carne y carne y productos cárnicos, 20 (111), 5-23.

Hernández-García, E., Vargas, M., y Torres-Giner, S. (2022). Quality and Shelf-Life Stability of Pork Meat Fillets Packaged in Multilayer Polylactide Films. *Foods*, 11(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/foods11030426>

Hernández Hernández, M. (2020). Métodos moleculares fenotípicos y genotípicos—Química General -. StuDocu. <https://www.studocu.com/es-mx/document/instituto-universitario-del-centro-de-mexico/quimica-general/metodos-moleculares-fenotipicos-y-genotipicos/12843630>

Hernández, M., Quijada, N. M., Rodríguez-Lázaro, D., y Eiros, J. M. (2020). Bioinformatics of next generation sequencing in clinical microbiology diagnosis. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(2), 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.06.003>

Hoffman, J. R., y Falvo, M. J. (2014). Protein – Which is Best? *Journal of Sports Science y Medicine*, 3(3), 118–130.

Holman, B. W. B., Bekhit, A. E.-D. A., Waller, M., Bailes, K. L., Kerr, M. J., y Hopkins, D. L. (2021). The association between total volatile basic nitrogen (TVB-N) concentration and other biomarkers of quality and spoilage for vacuum packaged beef. *Meat Science*, 179, 108551. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108551>

Holman, B. W. B., Collins, D., Kilgannon, A. K., y Hopkins, D. L. (2020). Using shear force, sarcomere length, particle size, collagen content, and protein solubility metrics to predict consumer acceptance of aged beef tenderness. *Journal of Texture Studies*, 51(4), 559–566. <https://doi.org/10.1111/jtxs.12523>

Holman, L. E., de Bruyn, M., Creer, S., Carvalho, G., Robidart, J., & Rius, M. (2019). Detection of introduced and resident marine species using environmental DNA metabarcoding of sediment and water. *Scientific reports*, 9(1), 11559.

Honikel, K. O. (2014). CONVERSION OF MUSCLE TO MEAT | Glycolysis. En M. Dikeman y C. Devine (Eds.), *Encyclopedia of Meat Sciences (Second Edition)* (pp. 353–357). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384731-7.00095-7>

Hwang, B. K., Choi, H., Choi, S. H., y Kim, B.-S. (2020). Analysis of Microbiota Structure and Potential Functions Influencing Spoilage of Fresh Beef Meat. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1657. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01657>

Hwang, K.-E., Choi, Y.-S., Kim, H.-W., Choi, M.-S., Song, D.-H., Kim, Y.-J., Ham, Y.-K., y Kim, C.-J. (2015). Combined Effects of Mugwort Herb and Vitamin C on Shelf-Life of Vacuum-Packed Seasoned Pork. *Food Science of Animal Resources*, 35(4), 421–430. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.4.421>

Jääskeläinen, E., Hultman, J., Parshintsev, J., Riekkola, M.-L., y Björkroth, J. (2018). Development of spoilage bacterial community and volatile compounds in chilled beef under vacuum or high oxygen atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, 223, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.022>

Jamal, Q. M. S., y Ahmad, V. (2022). Lysinibacilli: A Biological Factories Intended for Bio-Insecticidal, Bio-Control, and Bioremediation Activities. *Journal of Fungi*, 8(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/jof8121288>

Kang, Z.-L., Wang, P., Xu, X.-L., Zhu, C.-Z., Zou, Y.-F., Li, K., y Zhou, G.-H. (2014). Effect of a beating process, as a means of reducing salt content in Chinese-style meatballs (kung-wan): A dynamic rheological and Raman spectroscopy study. *Meat Science*, 96(2, Part A), 669–674. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.09.024>

Karwowska, M., Łaba, S., y Szczepański, K. (2021). Food Loss and Waste in Meat Sector—Why the Consumption Stage Generates the Most Losses? *Sustainability*, 13(11). 6227, Article 11. <https://doi.org/10.3390/su13116227>

Khezrian, A., y Shahbazi, Y. (2018). Application of nanocomposite chitosan and carboxymethyl cellulose films containing natural preservative compounds in minced camel's meat. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 1146–1158. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.117>

Konopiński, M. K. (2020). Shannon diversity index: A call to replace the original Shannon's formula with unbiased estimator in the population genetics studies. *PeerJ*, 8, e9391. <https://doi.org/10.7717/peerj.9391>

Kukhtyn, M., Salata, V., Berhilevych, O., Malimon, Z., Tsvihun, A., Gutyj, B., y Horiuk, Y. (2020). Evaluation of storage methods of beef by microbiological and chemical indicators. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 14, 602–611. <https://doi.org/10.5219/1381>

Lee, E.-J., y Shin, H.-S. (2019). Development of a freshness indicator for monitoring the quality of beef during storage. *Food Science and Biotechnology*, 28(6), 1899–1906. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00633-5>

Lee, H., Kim, M. S., Lee, W.-H., y Cho, B.-K. (2018). Determination of the total volatile basic nitrogen (TVB-N) content in pork meat using hyperspectral fluorescence imaging. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 259, 532–539. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.12.102>

- Lee, H. S., Kwon, M., Heo, S., Kim, M. G., y Kim, G.-B. (2017). Characterization of the Biodiversity of the Spoilage Microbiota in Chicken Meat Using Next Generation Sequencing and Culture Dependent Approach. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 37(4), 535–541. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2017.37.4.535>
- Li, C., Li, H., Yao, T., Su, M., Li, J., Liu, Z., Xin, Y., Wang, L., Chen, J., y Gun, S. (2020). Effects of microbial inoculation on enzyme activity, available nitrogen content, and bacterial succession during pig manure composting. *Bioresource Technology*, 306, 123167. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123167>
- Li, K., Bihan, M., y Methé, B. A. (2013). Analyses of the Stability and Core Taxonomic Memberships of the Human Microbiome. *PLOS ONE*, 8(5), e63139. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063139>
- Li, N., Zhang, Y., Wu, Q., Gu, Q., Chen, M., Zhang, Y., Sun, X., y Zhang, J. (2019). High-throughput sequencing analysis of bacterial community composition and quality characteristics in refrigerated pork during storage. *Food Microbiology*, 83, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.04.013>
- Li, X., Li, C., Ye, H., Wang, Z., Wu, X., Han, Y., y Xu, B. (2019). Changes in the microbial communities in vacuum-packaged smoked bacon during storage. *Food Microbiology*, 77, 26–37. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.08.007>
- Li, X.-R., Ma, E.-B., Yan, L.-Z., Meng, H., Du, X.-W., Zhang, S.-W., y Quan, Z.-X. (2021). Bacterial and fungal diversity in the traditional Chinese liquor fermentation process. *International Journal of Food Microbiology*, 146(1), 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.030>
- Liu, X., Ji, L., Wang, X., Li, J., Zhu, J., y Sun, A. (2018). Role of RpoS in stress resistance, quorum sensing and spoilage potential of *Pseudomonas fluorescens*. *International Journal of Food Microbiology*, 270, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.011>
- Luong, N.-D. M., Coroller, L., Zagorec, M., Membré, J.-M., y Guillou, S. (2020). Spoilage of Chilled Fresh Meat Products during Storage: A Quantitative Analysis of

Literature Data. Microorganisms, 8(8), Article 8.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8081198>

Luzardo, B. (2017). Vida útil de la carne: influencia del envasado y sistema de producción. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 1, 1-22.

Luzardo-Buiatria. (2017). VIDA ÚTIL DE LA CARNE: INFLUENCIA DEL ENVASADO Y SISTEMA DE PRODUCCIÓN. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 1, 1-22. <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/7130/1/LUZARDO-BUIATRIA-2017.pdf>

Lv, Y., Deng, Y., Wang, M., Li, C., Xie, P., Sun, B., Yang, X., y Lang, Y. (2023). Effect of chitosan-gelatine edible coating containing nano-encapsulated clove ethanol extract on cold storage of chilled pork. *Meat Science*, 204, 109288. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2023.109288>

Martín, F. (2020, marzo 13). Aspectos microbiológicos e inocuidad de la carne fresca—BM Editores. <https://bmeditores.mx/entorno-pecuario/aspectos-microbiologicos-e-inocuidad-de-la-carne-fresca/>

Masterson, B. (2013). Conway's Microdiffusion Analysis: Eighty years on and still counting! *The Biochemical journal*, 2013, 1–7. <https://doi.org/10.1042/BJ20131140>

Medina, E., Pérez-Díaz, I., Garrido Fernández, A., y Arroyo-López, F. (2017). The Microbiological Quality of Food Foodborne Spoilers (pp. 1–301). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100502-6.00012-1>

Nandy, A., Kumar, V., y Kundu, P. P. (2013). Utilization of proteinaceous materials for power generation in a mediatorless microbial fuel cell by a new electrogenic bacteria *Lysinibacillus sphaericus* VA5. *Enzyme and Microbial Technology*, 53(5), 339–344. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.07.006>

Neu, A. T., Allen, E. E., y Roy, K. (2021). Defining and quantifying the core microbiome: Challenges and prospects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(51), e2104429118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2104429118>

Novoa-Palomares, F., Salas-Díaz, L., Pérez-Téllez, C., Medina, I. P., Torres García, O., y Bello, F. J. (2022). Análisis comparativo de la actividad antimicrobiana de secreciones y excreciones larvianas de *Calliphora vicina* y *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae). *Biomédica*, 42(1), 54–66. <https://doi.org/10.7705/biomedica.6067>

Pellissery, A. J., Vinayamohan, P. G., Amalaradjou, M. A. R., & Venkitanarayanan, K. (2020). Spoilage bacteria and meat quality. In *Meat quality analysis* (pp. 307-334). Academic Press.

Peruzy, M. F., Murru, N., Yu, Z., Cnockaert, M., Joossens, M., Proroga, Y. T. R., y Houf, K. (2019). Determination of the microbiological contamination in minced pork by culture dependent and 16S amplicon sequencing analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 290, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.025>

Piraine, R. E. A., Leite, F. P. L., y Bochman, M. L. (2021). Mixed-Culture Metagenomics of the Microbes Making Sour Beer. *Fermentation*, 7(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/fermentation7030174>

Poirier, S., Rué, O., Peguilhan, R., Coeuret, G., Zagorec, M., Champomier-Vergès, M.-C., Loux, V., y Chaillou, S. (2018). Deciphering intra-species bacterial diversity of meat and seafood spoilage microbiota using *gyrB* amplicon sequencing: A comparative analysis with 16S rDNA V3-V4 amplicon sequencing. *PLoS ONE*, 13(9), e0204629. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204629>

Puga, F. (2020, marzo 13). Aspectos microbiológicos e inocuidad de la carne fresca—BM Editores. <https://bmeditores.mx/entorno-pecuario/aspectos-microbiologicos-e-inocuidad-de-la-carne-fresca/>

Qiao, L., Tang, X., y Dong, J. (2017). A feasibility quantification study of total volatile basic nitrogen (TVB-N) content in duck meat for freshness evaluation. *Food Chemistry*, 237, 1179–1185. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.031>

Remenant, B., Jaffrès, E., Dousset, X., Pilet, M.-F., y Zagorec, M. (2015). Bacterial spoilers of food: Behavior, fitness and functional properties. *Food Microbiology*, 45, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.009>

Resendiz-Nava, C. N., Alonso-Onofre, F., Silva-Rojas, H. V., Rebollar-Alviter, A., Rivera-Pastrana, D. M., Stasiewicz, M. J., Nava, G. M., y Mercado-Silva, E. M. (2023). Tomato Plant Microbiota under Conventional and Organic Fertilization Regimes in a Soilless Culture System. *Microorganisms*, 11(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071633>

Rodríguez, V., Maffioly, J., y ; Lagadar, M. (2019). POLIMORFISMOS DEL GEN SOX6 Y SU RELACIÓN CON LA CALIDAD DE CARNE DE CERDO. <https://publitec.com/wp-content/uploads/carne-de-cerdo.pdf>

Rodriguez, V., Maffioly, J., Zdanovicz, L., Fabre, R., Barrandeguy, M., García, M., y Lagadari, M. (2022). Genetic diversity of meat quality related genes in Argentinean pigs. *Veterinary and Animal Science*, 15, 100237. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2022.100237>

Ruiz, M. J., Padola, N. L., Leotta, G., Colello, R., Passucci, J., Rodríguez, E., Fernández Fellenz, D., Krüger, A., Sanz, M., Elichiribehety, E., y Etcheverría, A. I. (2021). Calidad microbiológica de la carne picada y detección de patógenos en muestras ambientales de carnicerías de la ciudad de Tandil, provincia de Buenos Aires, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 54(3), 31-40. S0325754121000754. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.04.003>

Sáenz-García, C. E., Castañeda-Serrano, P., Mercado Silva, E. M., Alvarado, C. Z., y Nava, G. M. (2020). Insights into the Identification of the Specific Spoilage Organisms in Chicken Meat. *Foods*, 9(22), <https://doi.org/10.3390/foods9020225>

Sammanee, P., Ngamsanga, P., Jainonthee, C., Chupia, V., Sawangrat, C., Kerdjana, W., Lampang, K. N., Meeyam, T., y Pichpol, D. (2022). Decontamination of Pathogenic and Spoilage Bacteria on Pork and Chicken Meat by Liquid Plasma Immersion. *Foods*, 11(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/foods11121743>

Shao, L., Chen, S., Wang, H., Zhang, J., Xu, X., y Wang, H. (2021). Advances in understanding the predominance, phenotypes, and mechanisms of bacteria related to meat spoilage. *Trends in Food Science y Technology*, 118, 822–832. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.11.007>

Schober, P., Boer, C., & Schwarte, L. A. (2018). Correlation coefficients: appropriate use and interpretation. *Anesthesia & analgesia*, 126(5), 1763-1768.

Shavisi, N., Khanjari, A., Basti, A. A., Misaghi, A., y Shahbazi, Y. (2017). Effect of PLA films containing propolis ethanolic extract, cellulose nanoparticle and *Ziziphora clinopodioides* essential oil on chemical, microbial and sensory properties of minced beef. *Meat Science*, 124, 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.10.015>

Shedleur-Bourguignon, F., Duchemin, T., P. Thériault, W., Longpré, J., Thibodeau, A., Hocine, M. N., y Fravallo, P. (2023). Distinct Microbiotas Are Associated with Different Production Lines in the Cutting Room of a Swine Slaughterhouse. *Microorganisms*, 11(1), 133. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010133>

SIAP. (2020). La Carne de porcino otra opción de consumo. gov.mx. <http://www.gob.mx/agricultura|cdmx/articulos/la-carne-de-porcino-otra-opcion-de-consumo?idiom=es>

SIAP. (2022). Producción Ganadera. gov.mx. <http://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-pecuaria>

Stoops, J., Ruyters, S., Busschaert, P., Spaepen, R., Verreth, C., Claes, J., Lievens, B., y Van Campenhout, L. (2015). Bacterial community dynamics during cold storage of minced meat packaged under modified atmosphere and supplemented with different preservatives. *Food Microbiology*, 48, 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.12.012>

Tang, Z., Chen, H., Zhang, M., Fan, Z., Zhong, Q., Chen, W., Yun, Y.-H., y Chen, W. (2022). Antibacterial Mechanism of 3-Carene against the Meat Spoilage Bacterium *Pseudomonas lundensis* and Its Application in Pork during Refrigerated Storage. *Foods*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/foods11010092>

Tian, X., Wu, W., Yu, Q., Hou, M., Gao, F., Li, X., y Dai, R. (2017). Bacterial diversity analysis of pork longissimus lumborum following long term ohmic cooking and water bath cooking by amplicon sequencing of 16S rRNA gene. *Meat Science*, 123, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.09.007>

USDA. (2019). Food Loss and Waste. USDA, DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DE EE. UU. <https://www.usda.gov/foodlossandwaste>

USDA. (2020). Pork 2020 Export Highlights. USDA Foreign Agricultural Service. <https://www.fas.usda.gov/pork-2020-export-highlights>

Vargas, D. A., Blandon, S. E., Sarasty, O., Osorio-Doblado, A. M., Miller, M. F., y Echeverry, A. (2022). Shelf-Life Evaluation of Pork Loins as Influenced by the Application of Different Antimicrobial Interventions. *Foods*, 11(21), Article 21. <https://doi.org/10.3390/foods11213464>

Wang, G., Qing li, Tang, W., Ma, F., Wang, H., Xu, X., y Qiu, W. (2021). AprD is important for extracellular proteolytic activity, physicochemical properties and spoilage potential in meat-borne *Pseudomonas fragi*. *Food Control*, 124, 107868. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.107868>

Wang, Q., Zhang, L., y Ding, W. (2020). Eugenol nanocapsules embedded with gelatin-chitosan for chilled pork preservation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 158, 837–844. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.182>

Wang, X.-Y., 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. *Current Microbiology*, 77(8), 1637–1646. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01978-5>

Wei, Z., Chu, R., Li, L., Zhang, J., Zhang, H., Pan, X., Dong, Y., y Liu, G. (2021). Study on Microbial Community Succession and Protein Hydrolysis of Donkey Meat during Refrigerated Storage Based on Illumina NOVA Sequencing Technology. *Food Science of Animal Resources*, 41(4), 701–714. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2021.e30>

Xia, J., Jiang, N., Zhang, B., Sun, R., Zhu, Y., Xu, W., Wang, C., Liu, Q., y Ma, Y. (2023). Bacterial Changes in Boiled Crayfish between Different Storage Periods and Characterizations of the Specific Spoilage Bacteria. *Foods*, 12(16), Article 16. <https://doi.org/10.3390/foods12163006>

Xiao, X., Dong, Y., Zhu, Y., y Cui, H. (2013). Bacterial Diversity Analysis of Zhenjiang Yao Meat During Refrigerated and Vacuum-Packed Storage by 454 Pyrosequencing. *Current Microbiology*, 66(4), 398–405. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0286-1>

Zardez, L. (2021, diciembre 2). Influencia del pH en las características de la carne. <https://www.hannainst.es/blog/1126/influencia-del-ph-en-carne>

Zequan, X., Zirong, W., Jiankun, L., Xin, M., Hopkins, D. L., Holman, B. W. B., y Bekhit, A. E.-D. A. (2019). The effect of freezing time on the quality of normal and pale, soft and exudative (PSE)-like pork. *Meat Science*, 152, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.02.003>

Zhang, H., Kong, B., Xiong, Y. L., y Sun, X. (2019). Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4°C. *Meat Science*, 81(4), 686–692. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.11.011>

Zhang, Y., Yao, Y., Gao, L., Wang, Z., y Xu, B. (2018). Characterization of a microbial community developing during refrigerated storage of vacuum-packed Yao meat, a Chinese traditional food. *LWT*, 90, 562–569. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.005>

Zhao, S., Li, N., Li, Z., He, H., Zhao, Y., Zhu, M., Wang, Z., Kang, Z., y Ma, H. (2019). Shelf life of fresh chilled pork as affected by antimicrobial intervention with nisin, tea polyphenols, chitosan, and their combination. *International Journal of Food Properties*, 22(1), 1047–1063. <https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1625918>