



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.**

**ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE  
*SALMONELLA* ORANIENBURG EXPUESTA A AGUA DE RÍO**

---

Por:

**Manuel Angel Castillo Olea**

TESIS APROBADA POR LA

CORDINACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA PRODUCTOS AGRÍCOLAS DE  
ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Manuel Angel Castillo Olea, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



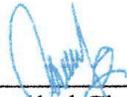
---

Dra. Nohelia Castro del Campo  
Directora de tesis



---

Dr. Juan Ramón Ibarra Rodríguez  
Co-director de tesis



---

Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz  
Integrante del comité de tesis

JOSE A. MEDRANO

---

Dr. José Andrés Medrano Félix  
Integrante del comité de tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Estudio de la Variabilidad Genética de *Salmonella* Oranienburg Expuesta a Agua de Río” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Manuel Angel Castillo Olea, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**  
Coordinación de Programas Académicos

  
Dr. Pablo Wong González  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

En primera instancia al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado para concluir satisfactoriamente mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) A.C. Coordinación Culiacán por permitirme ser parte de esta institución y haberme brindado todas las facilidades para llevar a cabo mis estudios de posgrado.

Al Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria (LANIA), por el apoyo brindado para llevar a cabo el cumplimiento del proyecto de investigación.

A la Dra. Nohelia Castro del Campo por aceptar ser mi directora de tesis y ser una excelente mentora, por su dedicación, ayuda y conocimientos compartidos. En especial por otorgarme la oportunidad de incursionar en la investigación científica.

Al Dr. Juan Ramón Ibarra Rodríguez por su apoyo incondicional y disponibilidad para el desarrollo de este trabajo de investigación, gracias por la amistad incondicional durante todo este tiempo.

Al Dr. José Andrés Medrano Félix, por su responsabilidad y asesoramiento durante el desarrollo del proyecto, gracias por siempre estar dispuesto a aportar sus conocimientos y amistad.

Al Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz, por compartir sus conocimientos y experiencias. Gracias por su confianza y apoyo incondicional.

Al Dr. Osvaldo López Cuevas por su apoyo incondicional, por compartir sus conocimientos y consejos.

A la QFB Célida Isabel Martínez Rodríguez por su amistad y apoyo técnico durante este tiempo.

A la LBG. Hilary Arim Beltrán Saucedo por su apoyo incondicional, por siempre aportar en cada aspecto de esta etapa, por siempre estar a mi lado, muchas gracias.

A mi compañero y amigo LBG. Angel Ibarra Rodríguez por su constante apoyo técnico, el cual fue fundamental para llevar a cabo este proyecto de investigación y por su invaluable amistad durante tantos años.

A la MC. Guadalupe Estefanía Alarcón Fabela, por todos los momentos que hemos vivido juntos, por brindarme tu amistad y cariño en todo momento.

Al MC. Irvin González López por el apoyo técnico brindado en el laboratorio y las ideas aportadas en la investigación, así como por su amistad.

A mis compañeros y amigos, Yazmín, Eden, Rosalía, Berenice y Jean Pierre, gracias por su apoyo constante y amistad.

A los kinis; Leonardo Lara, Eduardo Vargas, Felipe Núñez, David Obeso, Alejandro Araujo, Alexis Beltrán, Luis González. Muchas gracias por su amistad.

A todos aquellos que no he mencionado, pero formaron parte de esta etapa y brindaron su apoyo, confianza y amistad, gracias.

## **DEDICATORIA**

*A mis padres, Héctor Marcelino Castillo Castro y Jesús Olea Félix, por su apoyo y amor incondicional, por ser mi ejemplo a seguir en la vida, por confiar en mi capacidad y por siempre hacer de mi una mejor persona. Los amo.*

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	2
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>DEDICATORIA</b> .....	6
<b>CONTENIDO</b> .....	7
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	9
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	10
<b>RESUMEN</b> .....	11
<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	13
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	15
2.1. Generalidades de <i>Salmonella</i> .....	15
2.2. Morfología.....	15
2.3. Taxonomía.....	15
2.4. Epidemiología .....	16
2.5. Rutas de Transmisión .....	18
2.6. Persistencia de <i>Salmonella</i> en el Ambiente.....	19
2.7. Características Genéticas de <i>Salmonella</i> .....	21
2.8. Mutaciones .....	23
2.9. Tasa de Mutación .....	26
2.10. Mecanismos Moleculares de Respuesta a Estrés en <i>Salmonella</i> .....	30
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	32
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	33
4.1. Objetivo General.....	33
4.2. Objetivos Específicos .....	33
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	34
5.1. Experimento de Acumulación de Mutaciones.....	34
5.1.1. Reactivación y Preparación de Cepas Bacterianas .....	34
5.1.2. Experimento De Supervivencia ( <i>in vitro</i> ).....	35
5.1.3. Cámaras de Supervivencia ( <i>in situ</i> ) .....	35
5.1.4. Jaulas Experimentales.....	36
5.2. Secuenciación De Genomas .....	37
5.2.1. Preprocesamiento de las Secuencias.....	38
5.2.2. Anotación del Genoma .....	38
5.2.3. Búsqueda de Variantes en el Genoma .....	38
5.2.4. Búsqueda de Elementos Genéticos Móviles.....	39

## CONTENIDO (continuación)

<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	40
6.1. Supervivencia de <i>Salmonella</i> Oranienburg en Agua de Río. ....	40
6.2. Secuenciación de genomas.....	43
6.3. Anotación del genoma de referencia de <i>Salmonella</i> Oranienburg S347 .....	44
6.4. Anotación del Genoma de Referencia de <i>Salmonella</i> Oranienburg S76.....	49
6.3. Tasa de Mutación de <i>Salmonella</i> Oranienburg expuesta a agua de río.....	51
6.4. Espectro de mutaciones de <i>Salmonella</i> Oranienburg expuesta a agua de Río .....	55
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	71
<b>8. RECOMENDACIONES</b> .....	72
<b>9. REFERENCIAS</b> .....	73

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Rutas de Transmisión de Salmonella .....	18
2. Ciclo de vida de Salmonella enterica. ....	20
3. Pangenoma de Salmonella enterica.....	23
4. Adaptación ambiental mediada por la variedad de mutaciones en una población. ....	26
5. Relación de la tasa de mutación con respecto al tamaño de población.....	29
6. Cuenta viable de Salmonella durante el estudio de supervivencia en el río.....	40
7. Cuenta viable de Salmonella durante el estudio de supervivencia en laboratorio. ....	41
8. Visualización del genoma anotado de la cepa S347 utilizada como referencia generado por medio del servidor PATRIC.....	47
9. Perfil de profagos encontrado en el genoma de referencia de <i>Salmonella</i> Oranienburg S347 utilizando PHASTER.....	48
10. Genoma anotado de la cepa S76 utilizado como referencia.....	50
11. Perfil de profagos encontrado en el genoma de referencia de <i>Salmonella</i> Oranienburg S76 utilizando PHASTER.....	51
12. Árbol filogenético de la cepa de <i>Salmonella</i> Oranienburg S347 .....	54
13. Árbol filogenético de la cepa de <i>Salmonella</i> Oranienburg S76 .....	55
14. Mutación no sinónima dentro del gen rpoS en S. Oranienburg S347. ....	67

## LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Intervalo de muestreos. Cada muestreo se realizó en el intervalo indicado desde el tiempo inicial.....	39
2	Estructura Genómica de las cepas en estudio.....	46
3	Características proteicas de <i>Salmonella</i> Oranienburg S347.....	47
4	Genes de relevancia biológica en el genoma de referencia.....	49
5	Regiones de Bacteriófagos identificadas en los genomas de <i>Salmonella</i> S347.....	51
6	Características proteicas de <i>Salmonella</i> Oranienburg S76.....	52
7	Mutaciones presentes en los genomas analizados.....	55
8	Tasa de Mutación de las cepas analizadas.....	56
9	Mutaciones de interés presentes en el genoma de <i>Salmonella</i> Oranienburg S76.....	59
10	Mutaciones de interés presentes en el genoma de <i>Salmonella</i> Oranienburg S347.....	65

## RESUMEN

*Salmonella* es uno de los principales patógenos causantes de enfermedades gastrointestinales a nivel mundial. Al igual que la mayoría de las bacterias, las especies de *Salmonella* cursan procesos adaptativos (fenotípicos y genotípicos), particularmente en su fase ambiental de donde obtiene beneficios en compensación a los estímulos que recibe a lo largo de su ciclo de vida. En las fuentes de agua superficial (ríos y canales) de los municipios de Culiacán y Navolato, en el estado de Sinaloa, se documentó una alta prevalencia de distintos serotipos de *Salmonella*, los cuales sufren cambios genéticos que podrían ayudar a su supervivencia en ambientes no hospedantes. Sin embargo, a falta de información sobre el papel que juega el agua en los procesos evolutivos de *Salmonella* hace de este tema un área de oportunidad en la ciencia. En este trabajo, se buscó evaluar el efecto del agua de río sobre la tasa y espectro mutacional de *Salmonella* a través del tiempo. Para ello se realizó la exposición durante 3 meses en agua de río de dos cepas de *Salmonella* Oranienburg, un aislado ambiental (S76) y un aislado clínico (S347), en el río Humaya contenidas en capsulas de supervivencia. Las cápsulas de supervivencia se recolectaron durante 30 días y se trasladaron de manera aséptica al LANIIA donde se extrajo el ADN. Algunas cepas de *Salmonella* fueron secuenciadas para evaluar las variantes acumuladas en el tiempo, por medio del llamado de variantes utilizando los programas bioinformáticos SAMTOOLS 1.8 y SNPeff 4.4. Los resultados obtenidos mostraron la acumulación de 215 mutaciones para *Salmonella* Oranienburg S347 durante 30 días de exposición y una tasa de mutación de  $2.10 \times 10^{-8}$  a  $1.96 \times 10^{-9}$  mutaciones por sitio por generación; para el caso de *Salmonella* Oranienburg S76-1 se encontraron un total de 351 mutaciones y una tasa de  $4.1 \times 10^{-8}$  a  $2.23 \times 10^{-8}$  durante 5 días de exposición al ambiente y se encontraron mutaciones en los genes *MutL* y *MutY*, los cuales están relacionados con la generación de fenotipos hipermutantes de *Salmonella*. En conclusión, estos resultados sugieren que las cepas analizadas cuentan con la capacidad genética para generar un fenotipo hipermutante y que son capaces de alterar su tasa de mutación para persistir en el ambiente. Se recomienda llevar a cabo el análisis de cepas silenciadas para los genes que presentaron mutaciones, en particular los relacionados a reparación de ADN para esclarecer su impacto en la supervivencia en ambientes acuáticos.

**Palabras clave:** *Salmonella*, mutaciones, agua de río, tasa de mutación

## ABSTRACT

*Salmonella* is one of the main pathogens causing gastrointestinal diseases worldwide. *Salmonella*, as well as most bacteria undergo adaptive processes (phenotypic and genotypic), particularly in their environmental phase from where they obtain benefits in compensation for the stimuli to which they are exposed throughout their life cycle. In the surface water sources (rivers and canals) of the municipalities of Culiacán and Navolato, Sinaloa, it has been possible to determine a high prevalence of different *Salmonella* serotypes, which undergo genetic changes that generally help them survive in this non-host environment. However, the limited information on how the environment affects the evolution of *Salmonella* in the environment makes this topic an area of opportunity in science. Therefore, the objective of this work is to evaluate the changes in the mutational rate and spectrum that *Salmonella* experiences when remaining for long periods of time in river water. For this, two strains of *Salmonella* Oranienburg, the *Salmonella* Oranienburg strain (an environmental isolate and a clinical isolate), were exposed for 3 months in the Humaya River. Survival capsules were collected for 30 days from which DNA was extracted and their genome sequenced to evaluate the variants accumulated over time by calling variants using the bioinformatics programs SAMTOOLS 1.8 and SNPEff 4.4. The results obtained showed the accumulation of 215 mutations for *Salmonella* Oranienburg S347 during 30 days of exposure and a mutation rate of  $2.10 \times 10^{-8}$  to  $1.96 \times 10^{-9}$  mutations per site per generation; For the case of *Salmonella* Oranienburg S76-1, a total of 351 mutations and a mutation rate of  $4.1 \times 10^{-8}$  to  $2.23 \times 10^{-8}$  were found during 5 days of exposure to the environment and mutations were found in genes related to DNA repair such as they are MutL and MutY, which are related to the generation of hypermutant phenotypes of *Salmonella*. In conclusion, these results suggest that the analyzed strains have the genetic capacity to generate a hypermutant phenotype and that they are capable of altering their mutation rate to persist in the environment. It is recommended to carry out the analysis of silenced strains for the genes that presented mutations, in particular those related to DNA repair to clarify their impact on survival in aquatic environments.

**Keywords:** *Salmonella*, mutations, river water, mutation rate.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Salmonella* es una bacteria patógena anaerobia facultativa, intracelular, Gram-negativa, de importancia clínica y ambiental en todo el mundo. Provoca alrededor de 93.8 millones de casos de gastroenteritis al año y es considerada mundialmente como una de las cuatro principales causas de enfermedades diarreicas por el consumo de alimentos o agua contaminada (Majowicz et al., 2010; OMS, 2019). *Salmonella*, es considerada como uno de los principales patógenos zoonóticos causantes de infecciones gastrointestinales en humanos (Coburn et al., 2007; CDC, 2019). Durante su ciclo de vida ambiental, *Salmonella* sobrevive, se adapta y se reproduce primordialmente en agua (superficial, residual, marina, entre otras) (Dolejska, 2009; Levantesi, 2012; Lopez Cuevas, 2009).

La supervivencia de *Salmonella* en cuerpos de agua puede variar en función de las condiciones ambientales, siendo capaz de persistir desde 28 hasta 112 días en agua dulce ( Moore, 2003; Sugumar, 2003). Bonadonna y colaboradores (2006), reportan el aislamiento de 45 serotipos de *Salmonella* en agua de río en Italia. De igual manera, Simental y Martínez-Urtaza (2008) reportaron el aislamiento de una diversidad de 11 serotipos en aguas de arroyo en Bahía de Todos Santos, México. En ambos estudios, el serotipo con mayor prevalencia fue *S. Typhimurium*. En el contexto local, López-Cuevas y colaboradores (2009), reportaron el aislamiento de cepas de *Salmonella* en 20 de 51 muestras de agua de canal en una región con gran actividad agrícola, de igual manera Jiménez y Chaidez (2012), estudiaron la incidencia de *Salmonella* en agua de río en Sinaloa, donde detectaron la presencia de *Salmonella* en 84% del total de 84 muestras analizadas. La diversidad genética de los serotipos circundantes en agua de los ríos Culiacán, Humaya y Tamazula en el valle de Culiacán fue reportada por Jiménez-Edeza y colaboradores (2014). Se identificaron 28 serotipos de *Salmonella* no tifoidea, siendo los de mayor prevalencia *S. Oranienburg* y *S. Saintpaul*, los cuales mostraron una diversidad genética relativamente alta, mostrando 15 y 4 tipos de patrones genéticos diferentes, respectivamente. Lo anterior sugiere que diferentes poblaciones de *Salmonella* tienen la capacidad de persistir en este ambiente, probablemente como resultado de la generación de variantes transitorias de poblaciones genéticamente homogéneas, por efecto del estrés. Asimismo, la exposición de *Salmonella* a un ambiente no hospedante como el agua de río, podría activar mecanismos de respuesta a factores de estrés en la bacteria, activando mecanismos que causan

cambios tanto fenotípicos como genotípicos (Gibson, 2010). La velocidad con la que las mutaciones se acumulan, le permite a los microorganismos sobrevivir a factores estresantes generando poblaciones transitorias diversas; por ejemplo, en presencia de bacteriófagos o al ser expuestas al sistema inmune de un hospedero, generando altos niveles en sus tasas de mutación; al salir de la condición estresante y regresar al estado basal (Massey y Buckling, 2002; Pal et al., 2007; Mastroeni et al., 2011). Uno de los principales mecanismos de generación de mutaciones es la respuesta al daño por estrés, donde se involucran las polimerasas de translesión: polB (pol II), dinB (pol IV), umuDC (pol V) que pertenecen a la familia “Y” de polimerasas, las cuales presentan características estructurales únicas que les permiten unirse al ADN dañado por radiación, así como *samAB* el cual es un operón homólogo del operón *umuDC* de *E. coli* (Nohmi, 1991) que se encuentra presente en las especies de *Salmonella*. Estas polimerasas forman parte de la respuesta SOS y tienen la capacidad de ignorar el daño al ADN y continuar con el proceso de replicación, lo que genera el alza en la acumulación de mutaciones, llegando incluso a promover hasta el 90% de las mutaciones deletéreas en un genoma (Andersson y Koskiniemi, 2009; Delmas, 2006). Esta capacidad de continuar replicándose aún con daño en la fidelidad del material genético conlleva a la inserción o deleción de bases nitrogenadas, lo que contribuye a la diversidad bacteriana que se observa en diversos escenarios. Es por eso, que la adaptabilidad de *Salmonella* puede medirse en relación con la acumulación de mutaciones a lo largo de su genoma. Por ello el presente trabajo pretende analizar el espectro de eventos mutacionales de *Salmonella* Oranienburg, al exponerse directamente al agua de río.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades de *Salmonella*

*Salmonella* fue descubierta por Theobald Smith quien nació en 1885 y nombrada en honor a Daniel Elmer Salmon, a quien se le atribuye ser el primer médico veterinario y microbiólogo en visualizar a *Salmonella*.

Los individuos del género *Salmonella* conforman un grupo de bacterias con capacidad de producir infecciones gastroentéricas en animales y cuya gran diversidad genética le permite mantener un amplio rango de hospederos, incluido el humano. Su relevancia reside principalmente en los millones de casos de infecciones que produce y en los miles de muertes que provoca año con año, afectando principalmente a países de ingresos medios/bajos, donde sus efectos impactan fuertemente a los sectores alimenticio, salud y social (OMS, 2018).

### 2.2. Morfología

El género *Salmonella* está constituido por bacilos cortos gram-negativos, anaerobios facultativos, que son móviles gracias a sus flagelos peritricos. Poseen un tamaño promedio de 2-3 x 0.4-0.6 µm. Esta bacteria crece en un rango de temperatura entre 7 y 48 °C; a un pH óptimo entre 4 y 8 (Grimont, 2007).

### 2.3. Taxonomía

La nomenclatura de *Salmonella* es muy compleja y los científicos utilizan diferentes sistemas para referirse a este género. Desde 1950 se utiliza el método de serotipificación estándar, internacionalmente reconocido y basado en los antígenos de superficie O (somático) y H (flagelar) para discriminar entre grupos específicos de *Salmonella*.

Hasta la fecha solo dos especies con genomas secuenciados se han reportado: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*. Por otra parte, Shelobolina y colaboradores (2004) propusieron una nueva especie, *Salmonella subterranea* la cual presentaba un 96.4% de similitud a *Salmonella bongori*. Esto último fue refutado por Hata y colaboradores (2016) quienes realizaron un análisis filogenético basado en el análisis Multilocus Sequence Typing (MLST, por sus siglas en inglés) utilizando las 10 proteínas más hipervariables de entre 150 proteínas constitutivas de diferentes bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*; reportando que *S. subterranea* se debería de agrupar en un nuevo género denominado por ellos como *Atlantibacter*; ya que se alineó en un clado junto a *Enterobacter massiliensis*, *Escherichia vulneris*, *Escherichia hermannii* (Popoff y Minor, 1997; Popoff y Minor, 2015).

De las dos especies, *Salmonella enterica* compromete a más de 2,557 serovariedades y se subdivide en 6 subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, e *indica*, dentro de las cuales la subespecie *enterica* cuenta con alrededor de 1,531 serovariedades, las cuales son responsables del 99% de las infecciones por *Salmonella* en humanos (Grimont, 2007).

## 2.4. Epidemiología

*Salmonella* es el agente causal de una gastroenteritis, generalmente autolimitada, también conocida como salmonelosis. Entre los síntomas de dicha enfermedad se encuentran: náuseas, vómitos, dolores abdominales, diarrea, fiebre y dolor de cabeza; estos se dejan de observar entre 2 a 7 días, pero la enfermedad se puede complicar causando deshidratación y llevar hasta la muerte a niños, ancianos y personas inmunocomprometidas si no son tratados rápidamente. Los infectados, además, pueden presentar septicemia y artritis reactiva que se puede presentar de 3 a 4 semanas después de iniciar los síntomas agudos (Hohmann, 2001).

La salmonelosis no tifoidea puede resultar en salmonelosis invasiva, la cual requiere hospitalización y tratamientos a base de antibióticos. Ésta, suele afectar a pacientes inmunocomprometidos, pero también se puede presentarse en niños y ancianos (Brichta-Harhay, 2011). La salmonelosis invasiva incluye una variedad de manifestaciones clínicas tales como: bacteriemia, infección endovascular, y artritis reumatoide (Sanchez-Vargas, 2011).

En 2010, se estimó que a nivel mundial se producen anualmente 93.8 millones de casos de gastroenteritis causados por especies de *Salmonella*, de los cuales 155,000 terminan en defunciones. Sin importar la morbilidad global de este género, la mortalidad se encuentra delimitada a países en vías de desarrollo, ya sea por la falta de agua potable y/o por medidas de sanitización mal implementadas o inadecuadas (Majowickz, 2010; Gal-Mor et al., 2014).

En contraparte, en Estados Unidos de América se estima que al año se presentan más de 1,200,000 casos de salmonelosis, de los cuales alrededor de 23,000 terminan en hospitalizaciones y 450 en defunciones aproximadamente. Del total de casos, 1 millón de casos se le atribuyen al consumo de comida o agua contaminada con *Salmonella* de los cuales 19,000 terminan en hospitalizaciones y 380 en defunciones (CDC, 2018).

Estas cifras aumentan año con año sin importar los esfuerzos del centro de control y prevención de enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) y la administración de alimentos y drogas (FDA, por sus siglas en inglés) para aminorar y controlar las infecciones de este patógeno. En 2018 se reportaron 16 brotes de *Salmonella* en Estados Unidos de América relacionados al consumo de alimentos contaminados, en lo que corresponde al año 2019 se reportaron 10 brotes por *Salmonella* de los cuales 7 fueron relacionados con alimentos contaminados y los restantes por el contacto con animales (CDC, 2019).

Para el caso de Europa, se reporta la salmonelosis como la segunda causa de infección gastrointestinal, siendo *Salmonella* Enteritidis el agente causal de uno de cada siete brotes en la Unión Europea; en 2016 se confirmaron 95,326 casos de los cuales 134 terminaron en defunciones (eCDC, 2018).

En México, la Dirección General de Epidemiología (DGE), por medio del Boletín Epidemiológico del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) que se publica semanalmente, reportó un aproximado de 76,000 casos de salmonelosis en el año 2019 a nivel nacional; en Sinaloa se reportaron 2,283 casos de salmonelosis, lo cual coloca al estado en el octavo lugar (SINAVE, 2019).

Relacionado a lo reportado por el SINAVE, Gutierrez-Cogco y colaboradores (2000) analizaron cepas provenientes de laboratorios tanto del sector salud como del sector privado, así como cepas ambientales a nivel nacional, para identificar los serotipos presentes en el país, obteniendo como resultado que, de las más de 24,000 cepas analizadas, éstas se distribuían en 200 serotipos diferentes de *Salmonella entérica*. Esto último concuerda con lo reportado por Contreras-Soto y

colaboradores (2019) quienes mencionan que existen al menos 216 serotipos diferentes de *Salmonella enterica* reportados en México, de los cuales los serotipos más prevalentes son: Enteritidis, Typhimurium, Anatum, Agona y Meleagridis. Lo anterior pone en contexto no solo la gran diversidad de serotipos que existen en el país, sino la elevada prevalencia de infecciones reportadas anualmente en la región y la relevancia que implica el estudio de su persistencia en ambientes no hospedantes.

## 2.5. Rutas de Transmisión

*Salmonella* se encuentra mayormente en el ambiente cuando no se encuentra en su hospedero y se han dilucidado diversas vías por las cuales puede llegar a distintos reservorios como son: humanos, animales, comida y el medio ambiente (Hoelzer et al., 2011). En lo anterior radica la importancia de identificar las rutas potenciales de contaminación como se muestra en la figura 1.

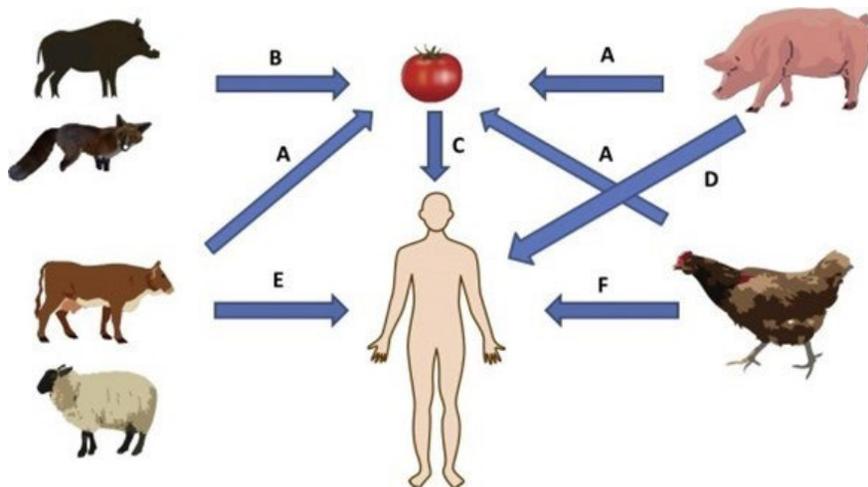


Figura 1. Rutas de Transmisión de *Salmonella*

Las heces de los animales de granja pueden contaminar el agua de irrigación para cultivos y, por consiguiente, contaminar los alimentos que entren en contacto con el agua (Figura 1, “A”); las heces de los animales salvajes pueden contaminar los cultivos, tanto de manera directa, como

indirecta al contaminar el agua de riego (Figura 1, “B”); los productos que han sido contaminados con *Salmonella* pueden entrar en la cadena de producción de alimentos y ser consumidos por los humanos (Figura 1, “C”); la carne de puerco es una fuente de *Salmonella* (Figura 1, “D”); la carne de res y los productos derivados pueden ser una fuente del microorganismo (Figura 1, “E”); las aves de corral y los productos derivados de las mismas son la principal fuente de contaminación por *Salmonella* en el humano (Figura 1, “F”) (Sánchez-Vargas, 2011).

La principal vía de transmisión es fecal-oral, en donde se incluyen contacto directo con animales, transmisiones por alimentos, transmisión por agua y de igual manera, se pueden dar transmisiones nosocomiales (Hoelzer et al., 2011; Hale et al., 2012).

*Salmonella* se adquiere normalmente por la ingestión oral del microorganismo ya sea en alimentos o agua contaminada por la bacteria, se ha demostrado que la dosis infectiva (DI) de *Salmonella* es de aproximadamente  $10^6$  UFC/g (Gawande y Bhagwat, 2002). Aparte de que el incremento en pH producido por el alimento ayuda a la supervivencia de *Salmonella*, el estómago induce la respuesta de ácido tolerancia (RAT), que se define como la capacidad de respuesta adaptativa a pH moderadamente ácidos, causando un incremento de la supervivencia bajo condiciones letales de pH en *Salmonella* aumentando la capacidad invasiva y la virulencia de la misma, induciendo la activación de las proteínas de shock ácido, para prevenir o reparar el daño causado por estrés ácido (Audia et al., 2001). Una vez que sobrevive al ácido gástrico del estómago obtiene acceso al epitelio intestinal, siendo este el sitio de colonización, teniendo un tiempo de incubación de 6 a 72 horas (Foster, 2000; Álvarez-Ordóñez et al., 2011 ; Laufer, 2015).

*Salmonella* se multiplica en el intestino delgado, colonizando e invadiendo los tejidos intestinales, produciendo una enterotoxina (Stn) la cual es responsable de los síntomas como diarrea y la reacción inflamatoria (Nakano, 2012). Además, *Salmonella* es una bacteria intracelular facultativa la cual se puede encontrar en una gran variedad de células *in vivo* y puede internalizarse en macrófagos evadiendo al sistema inmune, esta habilidad es vital para su patogenicidad (Ibarra, 2009).

## 2.6. Persistencia de *Salmonella* en el Ambiente

*Salmonella* es capaz de persistir en distintos nichos ambientales como aguas superficiales, aguas

residuales, superficies inertes y alimentos durante su ciclo de vida fuera de un hospedero donde se ven limitadas por la concentración de nutrientes, variaciones en temperatura y pH, radiación ultravioleta, así como estrés osmótico, oxidativo y la depredación por otros microorganismos ( Simental, 2008; Dolejska, 2009; Levantesi, 2012).

*Salmonella* presenta un estilo de vida cíclico, lo que sugiere que *Salmonella* posee una alta resistencia a factores de estrés ambiental, resultando en la habilidad de la bacteria para sobrevivir en un ambiente no hospedante, esto es vital para que aumente la probabilidad de infección en el ser humano (Figura 2) (Winfield, 2003). Esto concuerda con las observaciones en los ambientes acuáticos, donde se ha encontrado mayor prevalencia de *Salmonella*, como lo reportan Simental y Martínez-Urtaza (2008) quienes aislaron un total de 23 cepas pertenecientes a 11 serovariedades diferentes con una incidencia del 16% en aguas residuales, 10% en agua de arroyos y donde el serotipo *S. Typhimurium* resultó ser el más predominante.

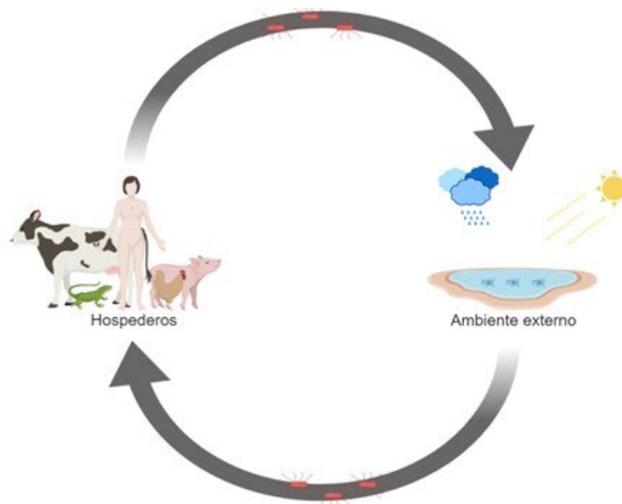


Figura 2. Ciclo de vida de *Salmonella enterica*.

En otro estudio, Haley y colaboradores (2009), aislaron 197 cepas de 13 serotipos diferentes, de agua del río Little en Georgia, Estados Unidos de América, durante 12 meses, con una temperatura promedio de 25°C, siendo *S. Arizonae* el de mayor prevalencia (40%), cabe destacar que no todos los serotipos se encuentran en el mismo tipo de ambiente acuático, estos varían dependiendo de la habilidad que posean los serotipos para resistir los diversos factores ambientales (Spector y Kenyon 2012).

Relacionado a lo anterior, en Sinaloa, López-Cuevas y colaboradores (2009), así como Jiménez-Edeza y colaboradores (2011), reportaron el aislamiento de 20 y 111 cepas de *Salmonella enterica* en agua de río, respectivamente; adicionalmente, Estrada-Acosta y colaboradores (2014), reportaron el aislamiento de 56 cepas de *Salmonella* provenientes de agua de canales de riego. En estos estudios se encontraron los serotipos Typhimurium, Infantis, Anatum, Agona, Oranienburg, Minnesota, Saintpaul y Give, siendo los serotipos Oranienburg, Saintpaul, Give, Anatum y Minnesota los de mayor prevalencia. De igual manera, Castañeda-Ruelas (2018) reportó que aproximadamente el 87% de estos serotipos presentaban resistencia por lo menos a un antibiótico, lo cual es de alta relevancia ya que podrían servir como un reservorio ambiental de genes de resistencia.

La mayoría de los estudios realizados sobre la supervivencia de *Salmonella* en ambientes acuáticos se han realizado bajo condiciones controladas de laboratorio y son muy pocos los que estudian la supervivencia de *Salmonella* en ambientes caóticos y en constante cambio, como se presentan en la naturaleza.

En experimentos controlados *in vitro* se ha demostrado que la supervivencia de *Salmonella* en cuerpos de agua varía dependiendo de las condiciones ambientales, por ejemplo, Sugumar y Mariappan (2003) reportan que *Salmonella* puede sobrevivir hasta 16 semanas en agua dulce y 24 semanas en agua marina a temperatura de 23°C +/-2 y hasta 48 semanas en agua dulce y 58 semanas en agua marina a 5°C +/- 1.

Con relación a lo anterior, Moore y colaboradores (2003) evaluaron la supervivencia de *Salmonella* Typhimurium multirresistente en microcosmos simulando agua superficial y sedimentos contaminados, observándose que la concentración de bacteria, aunque tuvo un decremento, se mantuvo en niveles detectables hasta los 54 días y en el caso de los sedimentos se observó que ésta pudo persistir aproximadamente 4 meses.

## 2.7. Características Genéticas de *Salmonella*

Avances en materia de genómica, como el desarrollo de nuevas tecnologías, reducción de costos y mayor accesibilidad a nuevas plataformas para secuenciar genomas completos de bacterias

individuales, han permitido mejorar nuestra comprensión de la evolución de las especies y examinar en detalle características específicas de bacterias de relevancia clínica, como *Salmonella* (Deng, 2003).

Los genomas de las bacterias entéricas secuenciadas coinciden con características como la presencia de un único cromosoma, frecuentemente de 4.3-5.0 Mb de tamaño, y específicamente para el caso de *Salmonella* estos valores fluctúan entre 4.5-5.0 Mb y cuenta con un contenido de GC desde 50-52% ( Baker, 2007; Deng, 2003; Fu, 2015). Adicionalmente, se han reportado cepas que además pueden tener ADN extracromosómico en forma de plásmidos. Los plásmidos a menudo portan genes asociados con la resistencia a antibióticos y pueden considerarse como un conjunto de genes en rápida evolución. Entre el repertorio genético de *Salmonella* se encuentran alrededor de 4,000 genes, de los cuales aproximadamente 200 son funcionalmente inactivos ( Baker, 2007). Estos eventos de diversificación pueden observarse al estudiar el genoma completo de una especie o subespecie en el que se pueden identificar y delimitar los genes que se comparten entre todos los individuos (Pangenoma), logrando distinguir entre el cúmulo de genes compartidos por todos los individuos (genoma core) que se pueden definir como genes necesarios entre todos los individuos que realizan funciones relacionadas con la supervivencia ya sea en el ambiente o en el hospedero, así como los genes que son característicos de una población de individuos o de una subespecie (genoma accesorio), donde se pueden encontrar islas de patogenicidad; un ejemplo particular son las islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPI), las cuales son combinaciones de genes asociados con la virulencia e invasión de la misma. Estas se agrupan en “clusters” o “casetes” que difieren en contenido de GC con respecto al genoma core, lo que sugiere que son de reciente adquisición en el genoma por transferencia genética horizontal (Medini et. al, 2005). Otro ejemplo de genes accesorios son los profagos o genes remanentes de bacteriófagos que su función principal es la de permanecer latentes en la célula infectada pero que tienen la habilidad de movilizar ADN cromosómico entre bacterias brindándoles el beneficio de compartir genes de virulencia o resistencia a antibióticos (Baker y Dougan, 2007; Jacobsen, 2012).

Investigaciones como la de Jacobsen y colaboradores (2012) reportaron la construcción del Pangenoma de *Salmonella enterica*, utilizando 44 genomas completos de distintas serovariedades de esta especie, reportando un pangenoma de 9,161 familias génicas en total, las cuales se definen como agrupaciones de genes alineados que son homólogos y comparten funciones entre sí, además las diferentes serovariedades analizadas comparten un genoma core de 3,224 familias génicas y

una diversidad de familias génicas para cada serotipo que varía entre 29 (*Salmonella* Enteritidis) y 189 (*Salmonella* Tennessee) (Figura 3) (Jacobsen, 2012).

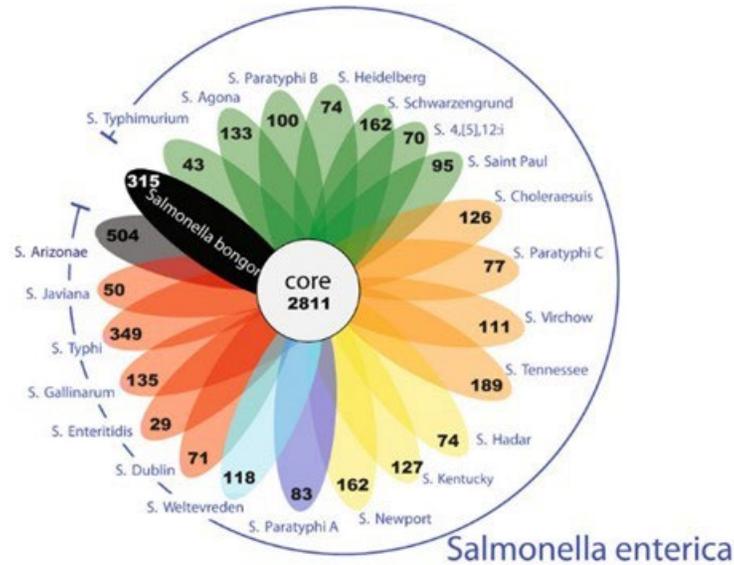


Figura 3. Pangenoma de *Salmonella enterica*

En un estudio más reciente publicado por Laing y colaboradores (2017) utilizando 4,939 genomas pertenecientes a *Salmonella enterica*, obtuvieron como resultado un pangenoma de 25.3 Mpb con genes promedio alrededor de 1000 pb, es decir 25,300 familias génicas, compartiendo solamente 1.5 Mpb (1,500 familias génicas) entre todos los genomas (genoma core), con lo que se observa un pangenoma cerrado y que la variabilidad que existe entre la misma especie al estudiar un gran número de individuos así como las diferencias genómicas entre las distintas serovariedades no son dependientes del tamaño del genoma, sino de los genes que se encuentren o no en ellas.

## 2.8. Mutaciones

Las mutaciones se definen como alteraciones en las secuencias genéticas o en la organización genética de un organismo. Ya que las mutaciones surgen por cambios físicos en el material

genético, la mayoría de los cambios ocurren durante la replicación del ADN y existen diferentes formas en las que pueden originarse (Eyre-Walker y Keightley 2007; Loewe y Hill, 2010).

La variación que existe entre diferentes serotipos, inclusive entre cepas del mismo serotipo, ya sea en la formación de biofilm, motilidad, virulencia, resistencia a diferentes tipos de estreses ambientales y la reparación de ADN, contribuyen al aumento en la diversidad bacteriana (Ferenci, 2016). Es por ello, que *Salmonella enterica*, al contar con una diversidad de más de 2,600 serotipos indica la ocurrencia de miles de eventos evolutivos en su genoma que la ha llevado a diversificarse por causa de mecanismos mutacionales (Loewe y Hill, 2010). Dichos mecanismos, se pueden definir desde diferentes enfoques de análisis, por ejemplo:

- Según las células que afecta la mutación. Dentro de éstas se engloban mutaciones germinales y mutaciones somáticas.

- La extensión del material genético. Éstas abarcan desde mutaciones en un solo gen (sustitución de un nucleótido o modificación del marco de lectura abierto), a nivel de modificaciones cromosómicas (duplicaciones, inversiones, deleciones y translocaciones) o genómicas abarcando eventos de euploidía y aneuploidía (Lodish, et. al, 2000).

- El origen de la mutación. Mutaciones inducidas que se presentan al exponer un organismo a un agente mutágeno (radiación ionizante, agentes químicos intercalantes) y las mutaciones espontaneas las que pueden ser ocasionadas por errores en la replicación del ADN, lesiones espontaneas y elementos genéticos transponibles (Lodish, et. Al, 2000).

- Las consecuencias de la mutación. Éstas se engloban en tres consecuencias principales: la primera de ellas son las mutaciones benéficas, que se definen como aquellas mutaciones que le confieren una ventaja evolutiva que le permite al organismo adaptarse a un ambiente estresante; las mutaciones neutras, son aquellas que no afectan la prevalencia del mismo; y las mutaciones perjudiciales causan daño al organismo a nivel de fertilidad ocasionando la reducción de la supervivencia de un organismo o a la extinción del mismo (Desai, 2007; Eyre-Walker, 2007).

Las mutaciones son fuente de variación genética que en conjunto con la selección natural impulsan la evolución (Loewe y Hill, 2010). Todos los mecanismos antes mencionados se pueden englobar en tres eventos mutacionales principales: 1) Mutaciones puntuales, 2) Eventos de inserciones y deleciones y 3) rearrreglos genómicos. Dentro de estos se pueden estudiar, por medio de herramientas bioinformáticas, los cambios en un nucleótido que generan lo que se denomina polimorfismo de nucleótido simple (SNP); las inserciones o deleciones (INDELS), que se engloban juntas ya que por la naturaleza de las mismas es complicado discernir cual sucedió en realidad;

transposiciones, duplicaciones, inversiones y translocaciones, las cuales son resultado del movimiento de una secuencia y su inserción en otra posición y generan los rearrreglos genómicos a mayor nivel (Gonzalez-Perez, et. al, 2014; Wang y Ozer, 2017).

Por lo general, la afectación del material genético de un organismo por alguno de estos eventos repercute en la fidelidad del ADN, lo que por un lado puede representar efectos negativos como en su supervivencia ante condiciones estresantes cuando se acumulan demasiadas mutaciones perjudiciales, o bien, en algunos casos resultar en la variación del fenotipo, lo que conlleva a la evolución y adaptación al ambiente estresante (Loewe y Hill, 2010). Es por ello, que la mayoría de los organismos cuentan con estrategias para reparar o ignorar los cambios que sufre el ADN para mitigar los efectos perjudiciales por la acumulación de mutaciones, como son: 1) reparación por escisión de bases; 2) reparación por escisión de nucleótidos; 3) reparación por error de apareamiento; 4) recombinación homóloga; y 5) unión de extremos no homólogos. Cuando alguno de estos mecanismos falla o es incapaz de reparar los cambios en la fidelidad del ADN, se generan mutaciones que pueden continuar en la próxima replicación y llegar a fijarse en la población, lo que en algunos casos brinda la variación suficiente entre individuos de una población para que sobreviva. La figura 4 esquematiza como la variación facilita la adaptación a estímulos nuevos (Foster, 2005; Denamur y Matic, 2006; Chatterjee y Walker, 2017).

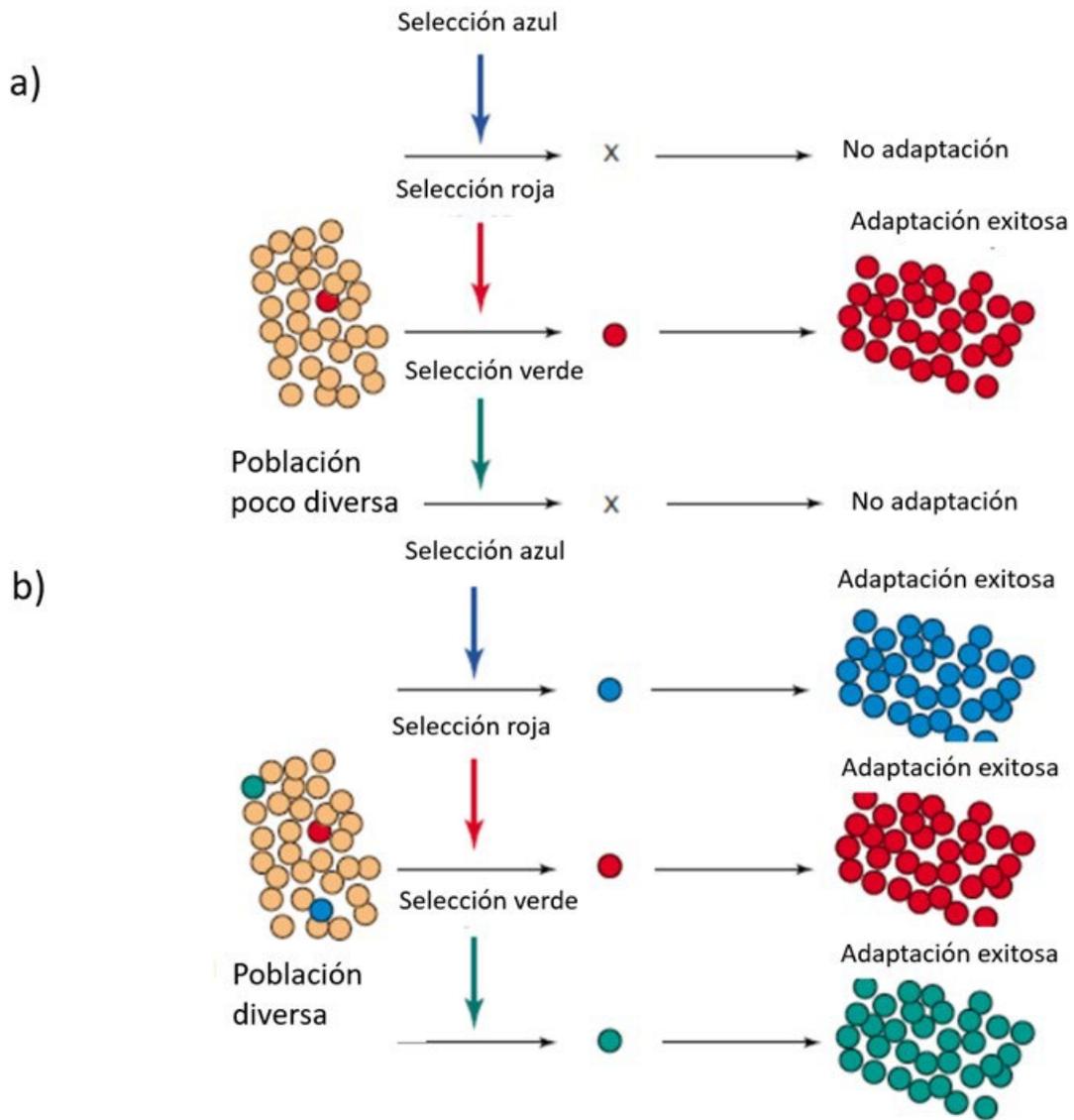


Figura 4. Adaptación ambiental mediada por la variedad de mutaciones en una población. Se esquematiza el efecto de las mutaciones en una población y su beneficio en la adaptación; a) se observa como una baja diversidad de mutaciones en la población inicial, limita la adaptación al ambiente; b) la variación que existe con respecto a la población inicial, permite que se adapte a un mayor número de ambientes (tomado de Massey y Buckling, 2002).

## 2.9. Tasa de Mutación

Las mutaciones son un factor importante en la evolución de un organismo, por ello la tasa de mutación, que representa la medida en función del tiempo en la cual se acumulan nuevas

mutaciones en el genoma de un organismo, ha sido estudiada de diferentes maneras. Uno de los primeros acercamientos al estudio de la tasa de mutación fue el realizado por Drake (1991) quien estudió el patrón que presenta la tasa de mutación de diferentes microorganismos, concluyendo que la tasa de mutación escala inversamente con el tamaño del genoma y que es esencialmente constante entre todos los tipos de vida microscópica; pero estos análisis se realizaron utilizando cuatro taxones de bacteriófagos, lo cual limita el alcance de la interpretación de los resultados, al no reflejar las condiciones y características de otros grupos taxonómicos.

Existen diferentes estudios concernientes a la tasa de mutación en los cuales se reporta que el promedio de la tasa de mutaciones por sustitución de bases en genes del cromosoma es igual para animales y plantas como organismos superiores ( Mower, 2007; Wolfe, 1987). Contrastando con esto, la tasa de mutación en el genoma mitocondrial de las plantas es 10 veces más baja que en el genoma cromosomal y en animales es 10 veces más elevada ( Wolfe, 1987). Esto se debe en parte a que los genomas mitocondriales en los animales carecen del gen de reparación de ADN *RecA*, el cual se encuentra presente en los genomas mitocondriales de plantas (Lin, 2006). Esto concuerda con Sloan y colaboradores (2010) que demostraron que la sustitución acelerada de nucleótidos se encuentra altamente relacionada con la pérdida de sitios de edición por ARN en el genoma mitocondrial, es decir, el genoma mitocondrial de las plantas al tener un mecanismo de reparación es menos propenso a acumular mutaciones.

Los cambios en la tasa de mutación por lo general se estudian examinando la tasa de sustitución nucleotídica sinónima o silenciosa. Esto, porque las mutaciones sinónimas son aquellas que generan cambios ya sea en el exón de un gen, es decir la sección de ADN que se traduce a RNA mensajero, o en un sitio sin que modifique la secuencia aminoacídica, por lo que se consideran mutaciones neutrales y son las más fáciles de observar debido a que no tienen repercusiones en el organismo (Eyre-Walker y Keightley, 2007).

El estudio genómico de la evolución permitió distinguir las variantes genéticas que influyen en la selección natural, lo cual dio comienzo a una nueva era de estudio, ya que en las primeras investigaciones el estudio de la evolución se realizaba a nivel molecular analizando cambios de aminoácidos en las proteínas codificadas por los genes, por lo que, las mutaciones se heredarían en las nuevas generaciones si la proteína nueva era selectivamente ventajosa en términos funcionales sobre la existente. Si la proteína era funcionalmente equivalente a la anterior, también se podría dar la fijación en la población, sin embargo, esto no permitía ver mutaciones perjudiciales como

las que truncan una proteína u ocasionan una proteína inestable biológicamente ( Lynch, 2011).

Los estudios genómicos de las mutaciones han demostrado que estas ocurren cada nueva generación, pero pueden ser eliminadas por la selección natural y la deriva genética. Además, se ha demostrado que esto varía dependiendo del tipo de proteína, es decir algunas proteínas por cuestiones de fidelidad genética tienden a sufrir en menor cantidad mutaciones (Sung, 2012). De tal forma que algunas proteínas como, por ejemplo, las histonas y la ubiquitina en células eucariotas son altamente conservadas por su grado de funcionalidad, mientras que otras como las presentes en el complejo mayor de histocompatibilidad presentan altas tasas de mutación ( Awadi, 2018).

Estas contradicciones, con respecto a las mutaciones en el estudio de la evolución genómica son generadas por cambios temporales en la tasa de mutación. Por ejemplo, en la bacteria endosimbionte *Buchnera* spp, la tasa de sustitución de nucleótidos es elevada en comparación con otras bacterias no simbiotes, ya que esta con el tiempo perdió enzimas de reparación de ADN, por lo que las mutaciones se incorporan con mayor facilidad en su genoma, degenerando su genoma hasta el punto de perder los genes requeridos para la respiración anaeróbica, aumentando la supervivencia dentro de las células que infecta (Itoh, 2002). Otro ejemplo de ello es *Pseudomonas fluorescens* que al ser cultivada en presencia de bacteriófagos la tasa en la que acumula mutaciones incrementa, lo que conlleva la aparición de cepas hipermutantes que le brinda la oportunidad no solo de sobrevivir al bacteriófago, sino llevar hasta la extinción del mismo ya que este no puede reconocer las proteínas de membranas una vez mutadas (Pal et. al, 2007)

Por lo anterior, las secuencias de ADN son más informativas que las secuencias de las proteínas para el estudio de las mutaciones ya que proveen datos en las regiones no codificantes, las cuales por lo general incluyen elementos genéticos que controlan la transcripción del ADN y la traducción de los RNA mensajeros, así como los datos de las regiones codificantes ( Lynch, 2016). Conocer esta información nos permite analizar la tasa de sustituciones nucleotídicas sinónimas y no sinónimas, en contraste con sólo estudiar las proteínas una vez expresadas, lo cual es útil para el estudio de los efectos de la selección natural. Por ejemplo, las sustituciones sinónimas no cambian el aminoácido resultante durante la traducción, por lo que la tasa de sustituciones sinónimas puede utilizarse como un estimado de la tasa de sustitución nucleotídica neutral y la tasa de substituciones nucleotídicas no sinónimas, que resultan en sustituciones aminoacídicas, puede ser un estimador de la tasa de sustitución nucleotídica derivada de la selección positiva o negativa (Reva, 2011).

Otra vertiente observada en algunos estudios es que, en la ausencia de mutaciones benéficas, la

selección natural reduce la tasa de mutación hasta que sea balanceada por la deriva genética, u otros costos fisiológicos (Figura 5), es decir, la tasa de mutación llega a un punto donde biológicamente es imposible llegar a cero. Existen diferentes trabajos teóricos que exploran estos cambios (Lynch, 2008; Lynch, 2011; Soderberg y Berg 2011). Por otro lado, cuando se dan mutaciones benéficas, las poblaciones con una alta tasa de mutación tienden a producir una variante de la mutación benéfica, lo que conlleva a que esta se establezca y no sea necesario seguir acumulando mutaciones, hasta que un nuevo estímulo lo ocasione (Lynch, 2011).

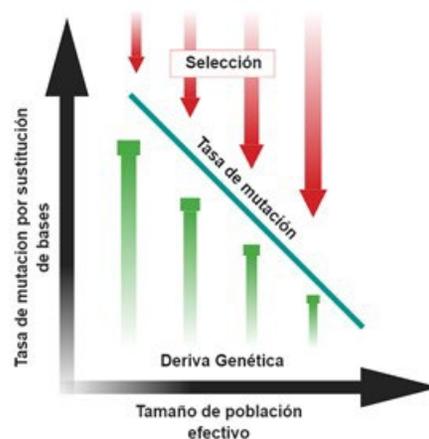


Figura 5. Relación de la tasa de mutación con respecto al tamaño de población.

Por otra parte, en la ausencia de mutaciones deletéreas o dañinas (selección negativa) la selección natural incrementa la tasa de mutación hasta que las mutaciones benéficas dejen de generarse. Esto explica por qué las cepas que tienen una elevada tasa de mutación, consideradas por ello como hipermutantes o hipermutadoras, se generan espontáneamente y se diseminan rápidamente en diferentes estudios de adaptación de poblaciones microbianas en el laboratorio y se ha correlacionado con estilos de vida patogénicos en el ambiente, teniendo como implicaciones que al estarse generando una gran variedad de individuos para compensar el estrés al que se encuentran sometidos, pueden ocurrir mutaciones en genes de virulencia, adherencia o resistencia, incrementando la posibilidad de que causen malestar al humano (LeClerc et al. 1996; Notley-McRobb et al. 2002; Richardson et al. 2002; Shaver et al. 2002; Voordeckers et al. 2015).

En algunos casos las poblaciones hipermutantes que se logran establecer en un experimento de

laboratorio, bajan su tasa de mutación con el avance del mismo, lo cual sugiere que la tasa de mutación es dinámica (Notley-McRobb et al. 2002; Wielgoss et al. 2013).

Según Wielgoss (2013) las poblaciones hipermutantes continúan incrementando la adaptabilidad de la cepa durante los análisis, lo cual lo lleva a teorizar que el establecimiento de una población mutante debe depender de la dinámica que existe entre las mutaciones benéficas y las deletéreas.

Respecto a *Salmonella*, Lind y Andersson (2008) determinaron el tipo de mutaciones de *S. Typhimurium* secuenciando tanto el genotipo salvaje, así como, mutantes carecientes del sistema de reparación de ADN y establecieron la tasa de mutación de *S. Typhimurium* para la cepa silvestre en  $7.0 \times 10^{-10}$  y para la mutante en  $2 \times 10^{-8}$  mutaciones por sitio por generación.

Oladeinde y colaboradores (2018) evaluaron el efecto de la cama de aves de corral sobre la supervivencia de *Salmonella* Heidelberg y reportaron la microevolución que sufrió durante 14 días de exposición, analizando el genoma de 86 aislados provenientes de dos cepas reportando 200 mutaciones acumuladas en el genoma, además, lograron identificar que las cepas que contenían los plásmidos incX1, colE1 y ColpVC, fueron capaces de sobrevivir hasta el día 14, lo que muestra el efecto de selección positiva que aplica la cama sobre la evolución de la bacteria.

## 2.10. Mecanismos Moleculares de Respuesta a Estrés en *Salmonella*

Para entender los mecanismos de la evolución de los organismos se requiere información sobre la aparición de nuevas mutaciones y su efecto a nivel molecular y fenotípico (Loewe, 2008).

Diferentes tipos de estrés inducen distintos tipos de respuestas. El ambiente externo se encuentra lleno de factores estresantes, por ello se teoriza que el incremento en la tasa de mutación, en condiciones de estrés, es una respuesta adaptativa del microorganismo (Gibson, 2010). El ambiente puede generar cantidades de estrés que estimulan la variación genética en bacterias, plantas y células humanas (Lynch, 2011). La evolución del genoma bacteriano se puede llevar a cabo por diferentes mecanismos, como la transferencia horizontal génica (THG), recombinación homóloga, delección de genes y mutaciones puntuales. Éstas conducen la divergencia adaptativa de los microorganismos en la diferenciación de nichos (Wielgoss et al. 2013).

*Salmonella* puede estar expuesta a diferentes tipos de estrés en un ambiente no hospedante, por

ejemplo, exposición a radiación ultravioleta, bajo la cual sufre daño el ADN al grado de impedir la replicación, causando la activación de la respuesta SOS mediada por *LexA* y *RecA*, induciendo la expresión de aproximadamente 40 genes entre los que destacan las polimerasas de translesión del ADN (Nohmi, 2006). Dichas polimerasas, son responsables de evadir el daño causado al ADN por procesos mutagénicos y llevar a cabo el proceso de replicación. En *Salmonella* se han reportado seis polimerasas de las cuales cuatro son inducidas por la respuesta SOS polB (pol II), *dinB* (pol IV), *umuDC* (pol V) y *samAB*; a estas se les atribuye la formación del 90% de las mutaciones espontáneas deletéreas. La respuesta SOS activa estas polimerasas a través del regulón *LexA* y ocasiona un incremento de entre 10 y 20 veces más en los niveles de expresión, dependiendo de la polimerasa que se analice. Así mismo, esta sobreexpresión conduce a un incremento de hasta 25 veces en la tasa de mutaciones deletéreas, mientras que en mutantes carentes de su actividad, la tasa de delección disminuye hasta 10 veces ( Andersson, 2009; Delmas, 2006). Por su efecto altamente mutagénico, las polimerasas con propensión al error se sugieren como inductores de mutaciones globales ( Kuban, 2006).

Existen otras condiciones capaces de inducir respuestas de estrés celular, tales como estrés oxidativo, cambios de pH o la deficiencia de nutrientes las cuales son reguladas por el factor de transcripción sigma *RpoS* (Weber, 2005; Winfield, 2003). Weber y colaboradores (2009) reportan que la inducción de *RpoS* incrementa la expresión de más de 300 genes, entre los cuales se encuentra el gen *dinB* que codifica la polimerasa *dinB* (pol IV) (Layton, 2003).

### 3. HIPÓTESIS

Las cepas de *Salmonella* presentan una tasa de mutación entre  $7.0 \times 10^{-10}$  y  $2.0 \times 10^{-8}$  al ser expuestas a agua de río.

La tasa de mutación de *Salmonella* influye de manera positiva en su persistencia en el agua de río confiriéndole un efecto benéfico en la adaptabilidad al ambiente.

Entre los genes que sufren mutaciones puntuales por la exposición de *Salmonella* al ambiente no hospedante, están aquellos relacionados con factores de supervivencia de *Salmonella* tales como *mutS* y *RpoS*.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Evaluar la adaptabilidad de *Salmonella* Oranienburg expuestas a agua de río de Culiacán, Sinaloa.

### 4.2. Objetivos Específicos

Determinar la tasa de mutación de *Salmonella* Oranienburg expuestas a agua de río de Culiacán, Sinaloa.

Identificar *in silico* las mutaciones puntuales presentes en los genomas de *Salmonella* Oranienburg expuestas en agua de río en Culiacán, Sinaloa.

Caracterizar el espectro mutacional de *Salmonella* Oranienburg expuestas a agua de río.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Experimento de Acumulación de Mutaciones

#### 5.1.1 Reactivación y Preparación de Cepas Bacterianas

Las cepas de *Salmonella* Oranienburg utilizadas en este estudio, pertenecen al cepario del Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria (LANIIA) del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) Coordinación Culiacán. Se seleccionaron aquellas que han presentado la mayor prevalencia en agua de río de la región del valle de Culiacán, Sinaloa en estudios previos, los cuales se enfocaban en evaluar la presencia y prevalencia de *Salmonella* en aguas superficiales (López-Cuevas et al., 2009; Estrada-Acosta et al., 2014; Castañeda-Ruelas et al., 2018). En específico, se utilizaron las cepas: S76, la cual es un aislado ambiental proveniente de agua de río y la cepa S347, aislada de un brote de gastroenteritis en Morelia (Vázquez-Garcidueñas et al., 2014).

Las cepas preservadas en viales de crío-preservación y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  se reactivaron utilizando un asa de platino estéril, tomando una muestra de cada cepa e inoculándolo en 5 mL de Caldo de Soya Trypticaseína (TSB, siglas en inglés) contenidos en un tubo de cultivo y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 h (Microbank, ProLab Diagnostics, U.S.A).

Para seleccionar colonias de *Salmonella*, se tomó una muestra de la suspensión celular y se estrió en Agar XLD (BD Bioxon, México), enseguida se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Una vez reactivadas, se tomó una colonia característica de cada serotipo y se cultivó en 50 mL de TSB, incubándose a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 h bajo condiciones aerobias (Shell-lab, U.S.A). Posteriormente, la suspensión celular se purificó por centrifugación a 10,000 rpm por 10 min (Thermo Scientific, U.S.A). La concentración bacteriana se verificó en un Espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, U.S.A) llevándolo a una densidad óptica (DO) de 1 de absorbancia a 600 nm, equivalente a  $3 \times 10^8$  UFC/mL, confirmándolo realizando diluciones decimales extendiendo en placas con agar XLD (BD Bioxon, México).

### 5.1.2 Experimento De Supervivencia (*in vitro*)

Para el experimento de supervivencia, se siguió el experimento propuesto por Moore y colaboradores en 2003. El microcosmos consistió en peceras de acrílico de 5 L de capacidad las cuales contenían 3 L de agua estéril proveniente del río Humaya tomada en diciembre de 2019; el agua se recolectó en contenedores de 10L y se transportó inmediatamente en hieleras al laboratorio, donde se guardó a 4°C en refrigeración. Posteriormente, se agregaron 10 mL de la suspensión de *Salmonella* Oranienburg previamente reactivada a una concentración de  $3 \times 10^8$  UFC/mL de cada cepa en una pecera, siendo un total de dos peceras, cada una conteniendo una cepa de *Salmonella* Oranienburg de origen ambiental aislada de agua de río y una cepa de *Salmonella* Oranienburg de origen clínico y se mantuvieron durante 3 meses en temperatura ambiente (25°C) y agitación. Solo se utilizó un microcosmos por cepa en este estudio.

La determinación de la supervivencia fue estudiada por un lapso de 90 días, tiempo en el que se tomaron alícuotas de 1 mL de cada pecera, en lapsos de 1, 3, 5, 15, 30, 60 y 90 días mismas que fueron transferidos a 9 mL de buffer de fosfatos y se realizaron diluciones seriadas. Cada dilución fue sembrada por triplicado en placas de agar XLD (BD Bioxon, México), y para determinar el número de células viables en la muestra diluida se utilizó el método de conteo viable directo.

### 5.1.3 Cámaras de Supervivencia (*in situ*)

El experimento se realizó a un costado del cárcamo de la planta potabilizadora de la Junta de Agua Potable y Alcantarillado de Culiacán, en el Río Humaya, ubicado en Culiacán, Sinaloa dentro de las coordenadas: “(24.829938, -107.402246)”.

Este experimento se llevó a cabo con el fin de exponer los serotipos de *Salmonella* al ambiente no hospedante (agua de río), y determinar la influencia de esta exposición sobre la tasa de mutación. Para ello, se utilizaron cámaras de supervivencia, que se componen de tubos de policloruro de vinilo (PVC) con una longitud de 9 cm y 4.5 cm de diámetro; a cada extremo se acopló una membrana de nitrocelulosa estéril con un diámetro de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  (PALL Science, U.S.A), la cual se sujeta con un cople de PVC y las uniones entre el cople y el tubo fueron selladas con plástico

Parafilm para evitar la salida de la bacteria que es inoculada dentro de la misma (Davis, 2005) (Figura 6).

Las cámaras de supervivencia se inocularon tomando 10 mL de la suspensión bacteriana de *Salmonella* Oranienburg de cada cepa a una concentración de  $3 \times 10^8$  UFC/mL y colocando por separado cada serotipo en las cámaras de supervivencia (C.S.) estériles.

#### **5.1.4 Jaulas Experimentales**

Las jaulas experimentales se utilizaron como contención para resguardar las cámaras de supervivencia, inoculadas con los serotipos de *Salmonella*, expuestas al agua de río. Las dimensiones de las jaulas diseñadas son de aproximadamente 0.70 x 0.25 m, construidas con tubos PVC de 2.5 cm de diámetro recubiertos con malla mosquitera plástica (González I., 2017). En la parte superior de cada jaula se ubica una compuerta para permitir el acceso a las cápsulas. Para cada serotipo se utilizó una jaula experimental.

Las cámaras de supervivencia previamente inoculadas con los serotipos de *Salmonella* en estudio y contenidas en las jaulas experimentales, se expusieron al agua de río durante 3 meses con la finalidad de interactuar con los factores presentes en el agua de río e inducir una respuesta a la presión selectiva en este ambiente.

Las jaulas experimentales, así como las cámaras de supervivencia, permiten el libre flujo de agua y partículas menores a  $0.45 \mu\text{m}$  a través del interior de la cápsula, exponiendo el interior a factores que puedan afectar la adaptabilidad de la bacteria, pero manteniendo protegida a *Salmonella* de depredadores y eventos de contaminación; esto, con la finalidad de simular el comportamiento natural de las bacterias que son liberadas en el agua del río.

Durante el tiempo de exposición en el río, se recolectaron 12 cámaras de supervivencia en cada tiempo a evaluar, los tiempos evaluados se muestran en el cuadro 1 y se llevaron al laboratorio en contenedores con agua de río, con el fin de mantener la naturaleza experimental (temperatura y nutrientes) para los microorganismos en estudio. Una vez en el laboratorio, las cámaras se desinfectaron externamente utilizando alcohol etílico al 70%, con el fin de evitar la contaminación de la muestra.

Cuadro 1. Intervalo de muestreos. Cada muestreo se realizó en el intervalo indicado desde el tiempo inicial.

	Cepas	
	S76	S347
Muestreo (días)	Capsulas recolectadas	
1	12	12
3	12	12
5	12	12
15	12	12
30	12	12
60	12	12
90	12	12
Total	84	84

Una vez, en el laboratorio, se realizó la determinación de la concentración de células viables, utilizando el método de diluciones seriadas y extensión en placa, para ello se tomaron 20 mL de cada cápsula y se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min a 4°C (Thermo Scientific, U.S.A), el sobrenadante se eliminó y se dejó aproximadamente 2 mL por cada cápsula, los cuales se mezclaron en un pool que se llevó a 10 mL y se resuspendió por agitación en vórtex por 20 s, para realizar la dilución se adicionaron 0.1 mL del pool a tubos con 9.9 mL de agua destilada estéril, para hacer diluciones desde  $1 \times 10^{-1}$  hasta  $1 \times 10^{-8}$ . Cada dilución se estrió por triplicado en placas de agar XLD (BD Bioxon, México), y se incubó a 37°C por 24 h; cumplidas las 24 h, se realizó el conteo de colonias. La extracción del material genético se realizó con el kit de extracción Dneasy blood and tissue (Qiagen, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante.

## 5.2. Secuenciación de Genomas

La secuenciación de las cepas de *Salmonella enterica* expuestas a agua de río se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Diagnóstico Molecular (CIAD, Unidad Mazatlán, Mazatlán, Sinaloa) por medio del secuenciador Illumina Miniseq, U.S.A, usando librerías Nextera de 150pb con una cobertura de 30x. Con lo que se obtuvo el genoma completo de las diferentes variantes recuperadas del río y se siguió el flujo de trabajo propuesto por Altmann et al (2012) con algunas modificaciones, para el procesamiento de las secuencias y realizar los análisis subsecuentes.

### **5.2.1. Preprocesamiento de las Secuencias**

Los productos de secuenciación (reads) fueron preprocesados para descartar los fragmentos de baja calidad, contaminantes y vectores. Para ello se realizó la remoción de secuencias por debajo del valor 30 en la escala de calidad Phred, mediante la herramienta Trimmomatic v 0.36 (Bolger et al., 2014). Adicionalmente, se eliminaron secuencias de adaptadores que pudieron quedar como residuos del proceso de secuenciación, mediante el mismo programa.

### **5.2.2. Anotación del Genoma**

Las secuencias fueron anotadas utilizando la herramienta servidor PATRIC v 3.6.8. (Davis JJ et al., 2015), el cual realiza la anotación utilizando las bases de datos RASTtk, Genbank, ARDB, CARD, NDARO, VFDB, Victors, Drugbank, TTD y PATRIC AMR genes. Esto con el fin de generar el genoma de referencia contra el cual se realizó la búsqueda de variantes y poder realizar la búsqueda de genes de interés.

### **5.2.3. Búsqueda de Variantes en el Genoma**

Cada genoma pretratado se alineó contra un genoma de referencia de cada cepa (S347 y S76) utilizando BWA-MEM (Li y Durbin, 2010), esto con la finalidad de mapear los reads contra el genoma de referencia. Una vez obtenidas las secuencias en el formato de salida (BAM) de BWA-MEM, se realizó el flujo de trabajo para llevar a cabo el análisis de las variantes. Este se realizó utilizando las herramientas samtools v1.9 (Li *et al* 2009) y bcftools v1.9 (Narisamhan *et al.* 2016), partiendo de los reads generados por el secuenciador. Para generar y analizar los archivos VCF (Variant Call File), se llevó a cabo un proceso de filtración de falsos positivos y falsos negativos para acercarnos a la representación más fidedigna posible. Una vez obtenido el archivo de llamado

de variantes (variant calling), se utilizó como entrada, para las herramientas Snpeff v4.4 (Cingolani *et al.* 2012). El resultado obtenido de la búsqueda de variantes se utilizó para calcular la tasa de mutación en cada muestra, empleando la ecuación 1 reportada por Ford y colaboradores en 2011, donde  $\mu$  es la tasa de mutación;  $m$  son las mutaciones observadas en el genoma;  $N$  es el tamaño del genoma y  $t * g$  es el tiempo de duplicación, que se tomó de la estimación realizada por Gibson y colaboradores (2018), reportando un tiempo estimado de duplicación de 25 horas en el ambiente para *Salmonella enterica*.

$$\mu = \frac{m}{N * (t * g)} \quad (1)$$

#### 5.2.4. Búsqueda de Elementos Genéticos Móviles

Con la finalidad de encontrar elementos genéticos móviles, las secuencias fueron analizadas para identificar si ocurrió algún evento de Transferencia Horizontal Génica (THG). Para ello, se utilizó el servidor PHASTER para encontrar cambios en las secuencias de profagos en el genoma.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Supervivencia de *Salmonella* Oranienburg en Agua de Río.

Los resultados obtenidos de la exposición directamente en el río se pueden observar en la figura 6. En esta se observa que ambas cepas al ser expuestas, reducen drásticamente más de 3 logaritmos en la cuenta viable durante los primeros 3 días, pero se observa un crecimiento importante de aproximadamente 2 órdenes de magnitud en los cultivos para ambas cepas, en las muestras del día 5. Posterior a este punto, la cepa clínica S347 comienza un descenso gradual en su crecimiento hasta el día 60, dado que en la muestra del día 90, los niveles de esta cepa no fueron detectables. Por su parte la cepa ambiental S76 registra una fase estacionaria desde el día 5 y hasta el día 15. Posteriormente se observa una caída importante de aproximadamente 3 órdenes de magnitud en los siguientes quince días (figura 6, día 30), seguida de un crecimiento aproximado de 1 orden de magnitud para el día 60, que es precedido por una última caída en la supervivencia de la cepa, de cerca de 2 órdenes de magnitud.

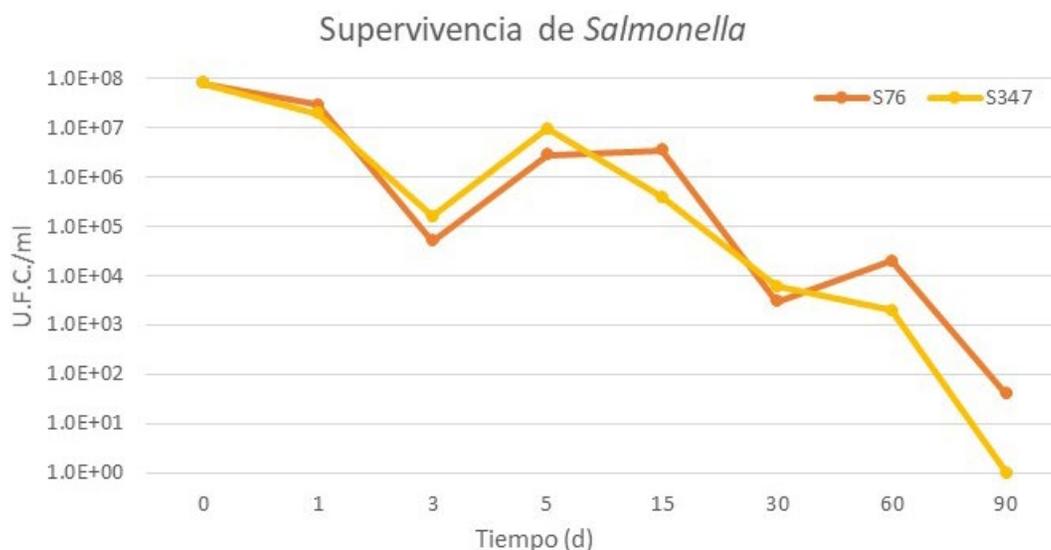


Figura 6. Cuenta viable de *Salmonella* durante el estudio de supervivencia en el río. Los resultados se expresan en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) en agar XLD y representan la media de placas por triplicado.

Con respecto a la exposición en laboratorio (figura 7) se observa el mismo patrón de supervivencia para ambas cepas mostrando esta vez un decaimiento durante los primeros 3 días, seguido de un ligero crecimiento estacionario del día 3 al 15 llegando a concentraciones no detectables en el día 60.

De acuerdo con Massey y Buckling (2002) los puntos previos a un crecimiento exponencial podrían ser un indicador de un aumento en la tasa de mutación ya que ésta se encuentra inversamente relacionada al tamaño de población efectiva y tiende a disminuir una vez que se generó la variabilidad genética suficiente para que las cepas puedan sobrevivir a condiciones estresantes, es decir, se genera diversidad poblacional por la necesidad de contar con la variabilidad genética necesaria para poder adaptarse a un ambiente estresante. Por ello, las muestras al ser expuestas al estímulo del agua de río, que se considera como un ambiente hostil para *Salmonella* deberían sufrir cambios fenotípicos o genotípicos para persistir en el ambiente.

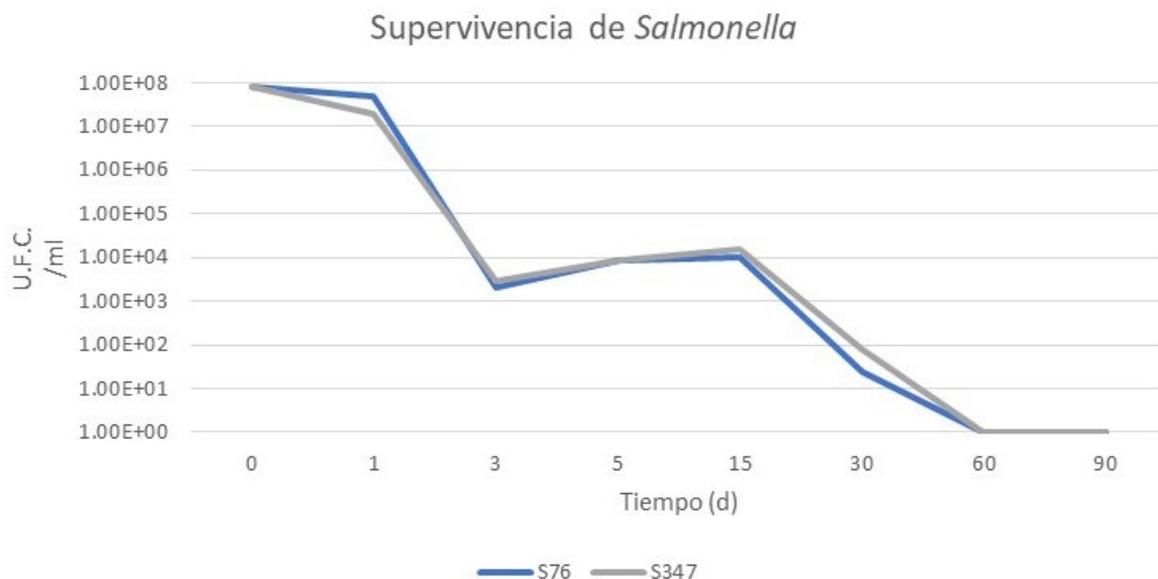


Figura 7. Cuenta viable de *Salmonella* durante el estudio de supervivencia en laboratorio. Los resultados se expresan en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) en agar XLD y representan la media de placas por triplicado.

El patrón de supervivencia para ambas cepas que se muestra en las figuras 6 y 7 es similar en condiciones de laboratorio, y directamente expuestas en el río, respectivamente, es decir ambas conllevan un decaimiento inicial y un crecimiento exponencial durante los primeros 5 días, pero se

diferencian en que la cepa clínica (S347) al ser expuesta directamente en agua de río se redujo hasta niveles indetectables en el día 60, en contraparte la cepa ambiental entró por un periodo en fase estacionaria y decayó en el tiempo de manera menos drástica lográndose detectar inclusive en el día 60, indicando que la cepa ambiental tuvo la capacidad de sobrevivir mayor tiempo al estrés inducido por el río, estos datos caen dentro del rango de diversos estudios científicos. Santo Domingo y colaboradores (2000) realizaron experimentos de supervivencia en agua de río estéril, en condiciones de laboratorio, con cepas de *Salmonella*, logrando recuperar valores de  $1 \times 10^6$  logaritmos, partiendo de concentraciones de  $1 \times 10^8$ , a lo largo de 45 días, es decir, se observó un decaimiento de 2 logaritmos para la mayoría de las cepas en estudio; sin embargo, una de las 4 cepas analizadas (*Salmonella* MUD37) se encontraba por debajo del umbral de detección desde los 30 días, resultado que concuerda con nuestro estudio.

En otro estudio, publicado por Moore y colaboradores (2003) reportaron la supervivencia de *Salmonella* Typhimurium durante 20 días en agua dulce en condiciones de laboratorio. En esos experimentos, *Salmonella* presentó un patrón de supervivencia que concuerda con los resultados obtenidos en nuestro estudio, con una fase de decaimiento durante los primeros 4 días del estudio, seguido de un crecimiento exponencial durante los días 5 hasta los 12 a partir del que empieza a bajar la concentración hasta el día 20 donde ya no fue detectable. Esta diferencia en el tiempo de supervivencia entre estudios podría deberse a las variaciones que existen entre las diferentes cepas analizadas, así mismo, que las bacterias entran en estado viable pero no cultivable (VBNC), por lo que, aunque se encuentran todavía en concentraciones altas dentro del agua, no son capaces de reproducirse y por ende la metodología dependiente del crecimiento del organismo es inadecuada para detectarlos.

Los resultados de exposición en laboratorio favorecen la teoría de que el agua de río, al ser un ambiente oligotrófico, es un ambiente estresante para las enterobacterias como *Salmonella*, capaz de provocar una respuesta adaptativa, al estrés y, en consecuencia, inducir mutagénesis en la bacteria, lo que podría alterar la tasa de mutación. Esto produciría variabilidad genética en la población bacteriana y promovería así la adaptación y persistencia del microorganismo en el agua de río (Massey y Buckling, 2002; Lynch, 2011; Lynch *et. al.*, 2016).

Con base en los resultados de los ensayos de supervivencia, se procedió a secuenciar el ADN de las cepas expuestas en el río de los tiempos donde la pendiente sufrió alguna alteración en la cuenta viable (Figura 6, días 3, 5, 15 y 30), ya que una estrategia para determinar la variabilidad genética

en la población, consiste en conocer la secuencia específica del genoma de las distintas cepas y compararlas.

## 6.2. Secuenciación de Genomas

Las secuencias obtenidas fueron 8 genomas en total, 5 pertenecientes a la cepa S347 y 3 pertenecientes a la cepa S76. Los datos del ensamblaje y contenido genético se muestran en el cuadro 2, donde se puede observar que todos presentan un porcentaje de Guanina-Citosina (G+C) de aproximadamente 52 %, lo que concuerda con lo reportado por múltiples análisis. Por ejemplo, el genoma de *Salmonella* Oranienburg publicado por Medrano-Félix y colaboradores (2013), en el cual reportaron un contenido de G+C de 52.2%, y que a su vez coincide con lo publicado por Castañeda-Ruelas (2018) con un promedio de G+C de 51-52% en el genoma de 18 cepas de *Salmonella* Oranienburg publicadas. En ambos estudios las muestras provenían de agua de río del estado de Sinaloa, por lo que la variación en el contenido de G+C de las cepas secuenciadas cae dentro del rango de valores reportados para *Salmonella* Oranienburg.

Por otro lado, el contenido de G+C, además de verse afectado por contaminación por ADN de otros organismos o artefactos en la técnica de secuenciación utilizada, puede reflejar la adaptación a un ambiente estresante, ya que en el contexto biológico-energético, es más demandante la síntesis de Guanosina trifosfato (GTP) o Citidina trifosfato (CTP) implicados en la síntesis de purinas y pirimidinas, por lo que, la mayoría de las mutaciones aleatorias que se generan bajo estrés son cambios de citosina (C) a timina (T) y de guanina (G) a adenina (A), es decir, eventos de transición genética donde las bases solamente cambian entre purinas (A por G) o entre Pirimidinas (T por C), generando un sesgo en mutaciones A/T que le confieren cierta ventaja adaptativa e impactan en la longitud de las secuencias codificantes (Bhagavan y Chung-Eun, 2015).

De igual manera la ausencia o mal funcionamiento de genes de reparación de ADN, por ejemplo, en la desaminación de citosina para formar uracilo (el cual subsecuentemente es replicado a timidina), limitan la capacidad de la bacteria para corregir errores en la secuencia, lo que promueve cambios en el contenido de G+C (Rocha y Danchin, 2002; Foerstner et al., 2005; Mitchel, 2007).

Cuadro 2. Estructura Genómica de las cepas en estudio.

Cepa	Contenido GC	Tamaño del genoma
S347ref	51.99	4,999,109 pb
S347-1	52.1	4,934,919 pb
S347-2	52.22	4,905,293 pb
S347-3	52.71	4,674,441 pb
S347-4	52.63	4,646,673 pb
S76ref	52.2	4,609,551 pb
S76-1	52.36	4,518,645 pb
S76-2	52.57	4,408,372 pb

En el contexto biológico-genético, la variación que se observa en el tamaño del genoma puede deberse a diferentes eventos genéticos, como son la duplicación de genes, la THG y la pérdida de genes específicos, lo que conlleva a la ganancia o pérdida de segmentos que alteran tanto el tamaño del genoma como el contenido de G+C. En los organismos de vida libre o facultativos, como *Salmonella*, la transducción (la infección y replicación del material genético de un bacteriófago en una bacteria) genera cambios en la longitud del genoma bacteriano dependiendo de la cantidad de profagos que se acumulen y el contenido del material genético del bacteriófago (Canchaya et al., 2004; Frost et al., 2005).

### 6.3. Anotación del Genoma de Referencia de *Salmonella* Oranienburg S347

Los resultados de la anotación de las cepas S347 se representan en el cuadro 3. En ellos se muestran cambios en las secuencias codificantes (CDS), el contenido de Ácido Ribonucleico de transferencia (ARNt) y el contenido de posibles proteínas con asignación funcional por genoma.

Cuadro 3. Características proteicas de *Salmonella* Oranienburg S347

Cepa	Tiempo (Día)	CDS	Proteínas Hipotéticas	Proteínas con asignación funcional	ARNt
S347ref	0	5,296	869	4,427	81
S347-1	3	5,037	713	4,324	78
S347-2	5	5,011	686	4,325	77
S347-3	15	4,799	587	4,212	73
S347-4	15	4,769	556	4,213	72

Los cambios que se muestran en las estadísticas de los genomas son un reflejo tanto del proceso de químico de secuenciación y la detección posterior de cada nucleótido para establecer el orden en la que se encuentran dispuestos en cada fragmento de ADN analizada, como de las herramientas bioinformáticas utilizadas para ensamblar dichos fragmentos y establecer el orden correcto de los mismos en una secuencia, lo más completa posible, que represente al genoma completo del microorganismo, ya que en la secuenciación por reads cortos no se recupera toda la información que compone un genoma.

Asimismo, la forma en la que se ensambla esta información afecta el orden de la secuencia nucleotídica y, por lo tanto, la identificación de las secuencias codificantes y de las proteínas resultantes que se identifican como variantes en el genoma, podría ser errónea. Esto toma particular relevancia, considerando que los cambios en las secuencias revelan un proceso de mutagénesis inducida por el ambiente estresante, en forma de variación en las proteínas con asignación funcional (Bush et al., 2020).

Con respecto a los cambios que se observan en las cepas en relación a los ARN de transferencia (ARNt), Ikemura en 1981 demostró que tienen un importante efecto en el porcentaje de G+C, puesto que, dependiendo del ARNt más abundante en el organismo, se dicta el patrón de uso de diferentes codones en genes altamente expresados, lo que moldea la eficiencia de la traducción y la efectividad de la transcripción (Ermolaeva, 2001).

Los resultados obtenidos de la anotación del genoma de referencia para la cepa de *Salmonella* Oranienburg S347 muestran un total de 81 ARNt englobados en secuencias no codificantes, que si se comparan con las cepas S347-1, S347-2, S347-3 y S347-4 se observa una disminución en la cantidad de ARNt anotados de 78 a 72 ARNt.

Esta diferencia de acuerdo con Thornlow y colaboradores (2018) se debe a que los genes de ARNt

son altamente transcritos, lo que ocasiona una mutagénesis inducida por transcripción, que conlleva a la acumulación de mutaciones en los genes de ARNt, las cuales sufren una eliminación por selección negativa, es decir, los genes de ARNt que no son biológicamente funcionales son eliminados del genoma, para mantener la integridad de la transcripción, lo que concuerda con nuestros resultados donde se observa una disminución en la cantidad de ARNt anotados, contrastando este resultado con la supervivencia de *Salmonella* en agua de río, se puede observar un patrón tanto de disminución en la supervivencia como en la cantidad de ARNt conservados en el genoma, evidenciando la necesidad del microorganismo de mantener la fidelidad del genoma ante la plasticidad necesaria para adaptarse al estrés.

En la figura 8, se muestra la visualización circular del genoma de referencia de la cepa de *Salmonella* Oranienburg (S347) que se utilizó para mapear las demás cepas en el flujo de trabajo para evaluar las variantes que se acumularon en el genoma, el cual consiste en 4,427 proteínas, 290 genes de virulencia, 692 proteínas de transporte y 66 genes de resistencia.

Castañeda-Ruelas y colaboradores (2018), reportaron la secuencia genómica de 18 cepas de *Salmonella* Oranienburg aislada de agua de río, en Sinaloa que presentaban entre 4,557 y 5,076 proteínas y entre 102 y 111 genes de virulencia; en comparación con nuestro estudio el número de proteínas con asignación funcional anotadas es menor, pero el número de genes de virulencia anotados es mayor. También se muestran los diferentes genes de interés en la anotación en el cuadro 4 y se esquematiza su localización en el genoma en la figura 8 y el perfil de profagos en la figura 9.

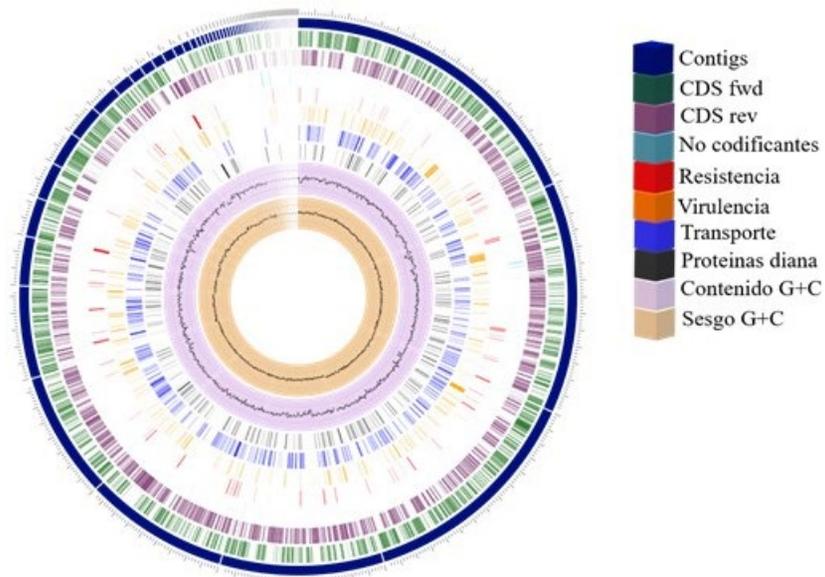


Figura 8. Visualización del genoma anotado de la cepa S347 utilizada como referencia generado por medio del servidor PATRIC. Dentro de los genes de interés se encontraron 4,427 proteínas con asignación funcional, 290 genes de virulencia, 692 de transporte, 340 dianas farmacológicas y 66 genes de resistencia.

Cuadro 4. Genes de relevancia biológica en el genoma de referencia (S347)

Resistencia a antibióticos	66
Factores de virulencia	290
Proteínas de Transporte	692
Dianas farmacológicas	340

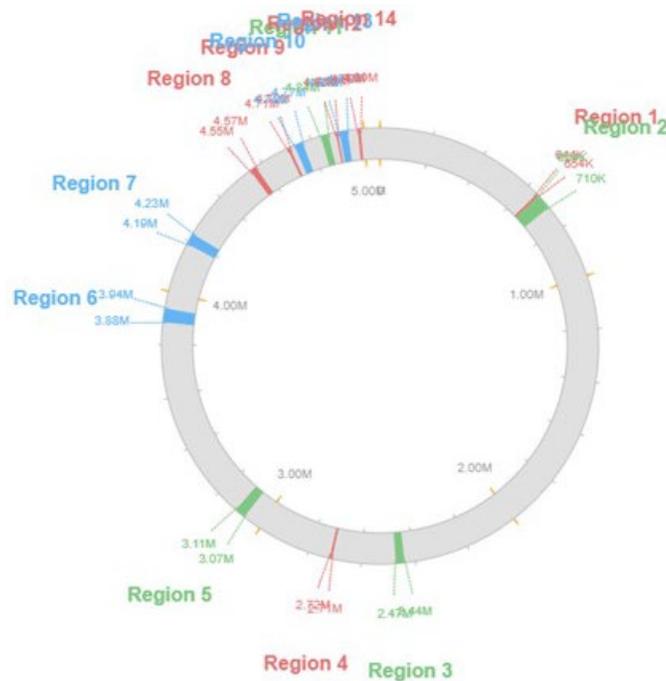


Figura 9. Perfil de profagos encontrado en el genoma de referencia de *Salmonella* Oranienburg S347 utilizando PHASTER. En él se muestran las 14 regiones identificadas pertenecientes a profagos y su localización en el genoma.

Se identificaron 14 regiones de profagos, de las cuales 4 regiones fueron consideradas intactas, esto debido a que se alinearon con el 100% de las CDS para un bacteriófago, estas regiones codifican para los bacteriófagos de *Salmonella* g341c-1, Gifsy 1, *Vibrio* X29 y el Bacteriófago de *Escherichia* Stx2.

Estos resultados coinciden con lo reportado por Mottawea y colaboradores en 2018 donde analizaron 1760 genomas de *Salmonella*, encontrando que 6 regiones que cumplen con al menos el 70% de Hits contra un bacteriófago y 4 regiones se encuentran incompletas con solo el 50% de Hits contra un bacteriófago. No se encontró diferencias en las regiones de profagos en los 5 genomas del presente estudio, todos presentaron las mismas 14 regiones de Profagos identificadas en el genoma de referencia que se muestran en el cuadro 5, esto indica que durante el tiempo de exposición al agua de río, no ocurrió contacto con ningún bacteriófago o en su caso, no se llevó a cabo el proceso lisogénico.

Cuadro 5. Regiones de Bacteriófagos identificadas en los genomas de *Salmonella* S347

Región	Tamaño	Posición	Integridad	Bacteriófago	Porcentaje G+C
1	9.4Kb	644302-653782	Incompleto	Geobac GBK2	45.91%
2	56.3 Kb	653932-710251	Intacto	Gifsy 1	50.77%
3	32.5Kb	2439281-2471783	Intacto	Vibrio X29	47.41%
4	8.4Kb	2709956-2718356	Incompleto	Escher 500465 2	53.30%
5	40.2Kb	3071311-3111566	Intacto	Salmon g341c 1	46.80%
6	50.8Kb	3884304-3935168	Intermedio	Escher 500465 1	49.08%
7	41.4Kb	4188452-4229877	Intermedio	Cronob ESSI 2	52.01%
8	23.3Kb	4548409-4571795	Incompleto	Mycoba Adler	51.55%
9	9.3Kb	4707670-4717001	Incompleto	Escher 500465 1	51.46%
10	31Kb	4736219-4767311	Intermedio	Salmon SJ46	51.37%
11	27.5Kb	4839334-4866859	Intacto	Stx2 C 1717	51.24%
12	6.9Kb	4895186-4902174	Incompleto	Escher SH2026Stx1	53.58%
13	30.2Kb	4909079-4939299	Intermedio	Escher P2	49.93%
14	9.7Kb	4978231-4988000	Incompleto	Mannhe vB Mhs	49.41%

### 6.1. Anotación del Genoma de Referencia de *Salmonella* Oranienburg S76

Con respecto a la anotación del genoma de referencia para la cepa de *Salmonella* Oranienburg S76, se obtuvieron como resultado 79 ARNt que disminuyen en la cepa S76-1 y S76-2 de igual manera que en la cepa S347 sugiriendo que el agua de río es capaz de generar mutaciones, inclusive en genes altamente conservados como son los genes de ARNt, llevándolos a sufrir una eliminación por selección negativa. De manera similar, las proteínas con asignación funcional y las secuencias codificantes sufren una disminución en el tiempo con respecto al genoma de referencia; la pérdida de genes codificantes sugiere, que suceden inserciones o deleciones que modifican el marco de lectura, generando un codón de paro repentino, truncando la proteína o generando una proteína disfuncional (Selligman y Pollock, 2001) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Características proteicas de *Salmonella* Oranienburg S76

Cepa	CDS	Proteínas Hipotéticas	Proteínas con asignación funcional	ARNt
S76ref	4750	618	4132	79
S76-1	4,469	458	4,011	72
S76-2	4,357	416	3,941	70

En la figura 10 se esquematiza el genoma de referencia utilizado en el estudio de mutaciones para *Salmonella* Oranienburg S76, donde se observan los diferentes genes de interés y su localización en el genoma.

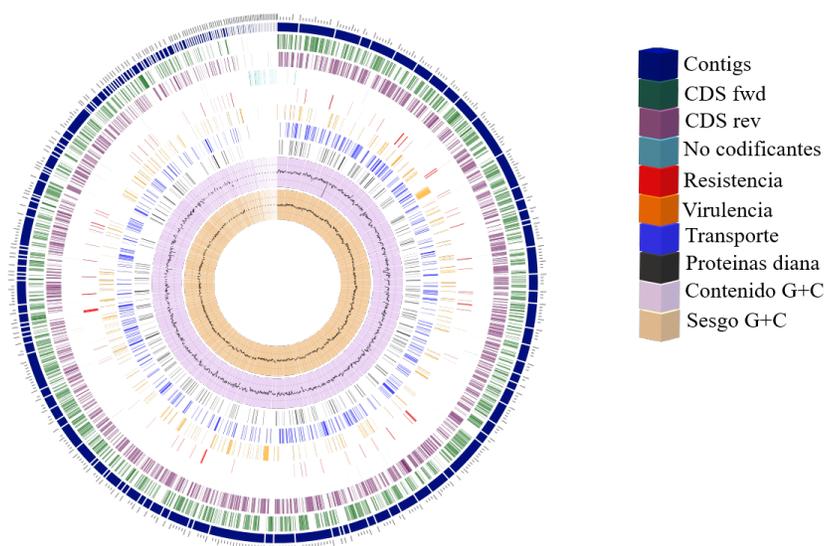


Figura 10. Genoma anotado de la cepa S76 utilizado como referencia.

Los resultados obtenidos de la anotación concuerdan con lo reportado por Medrano-Felix y colaboradores (2013), en el primer reporte del genoma de la cepa S76, también analizada en este estudio, donde ellos reportaron 103 ARNt y la anotación de 5020 secuencias codificantes.

Con respecto a la búsqueda de regiones de bacteriófagos en el genoma de la cepa S76, se encontraron 6 regiones, de las cuales 1 fue reconocida como intacta, 1 intermedia y 4 incompletas y se muestran en el cuadro 7, asimismo, se esquematiza su posición en el genoma en la figura 11.

La única región identificada como intacta, pertenece al bacteriófago de *Salmonella* Fels 2, que ha sido uno de los más identificados en cepas de *Salmonella*, el patrón de regiones no cambió en el tiempo, manteniéndose igual en las demás cepas de *Salmonella* S76, lo que indica que no tuvo reconocimiento por algún otro bacteriófago al estar expuesta en el río.

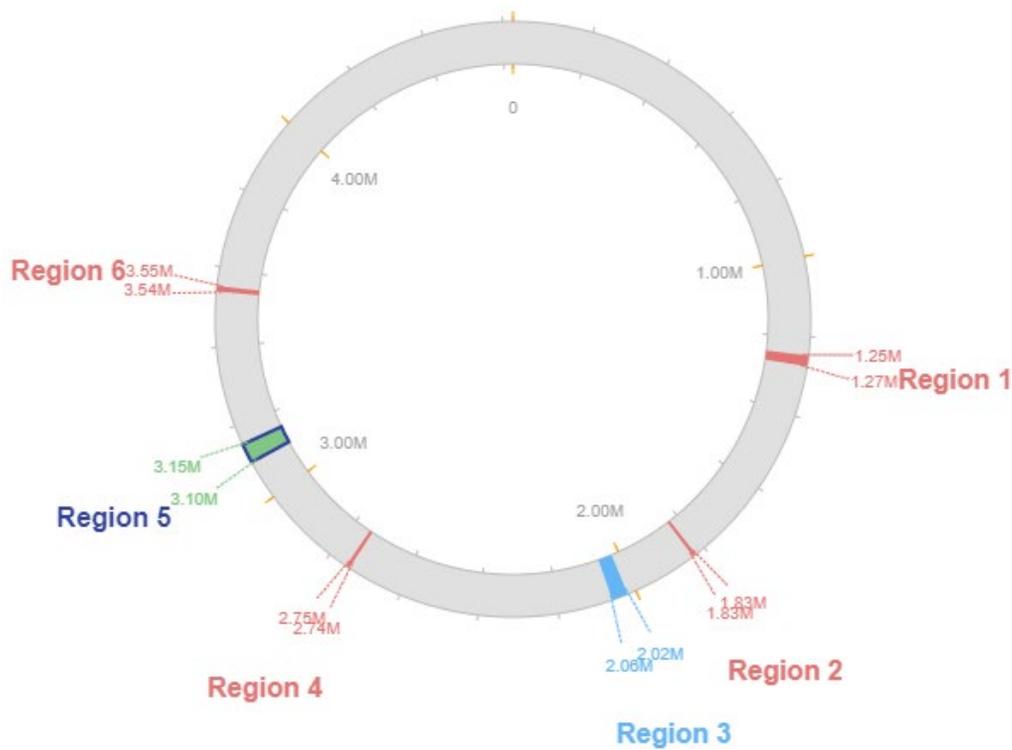


Figura 11. Perfil de profagos encontrado en el genoma de referencia de *Salmonella* Oranienburg S76 utilizando PHASTER. En él se muestran las 6 regiones identificadas pertenecientes a profagos y su localización en el genoma.

### 6.3. Tasa de Mutación de *Salmonella* Oranienburg expuesta a agua de río

El análisis de variantes arrojó un total de 351 mutaciones presentes en el genoma *Salmonella* Oranienburg S76 dentro de los primeros 5 días de exposición al medio ambiente. Referente a la cepa de *Salmonella* Oranienburg S347 la cepa acumuló un total de 215 mutaciones a lo largo de 30 días. Andersson y Lind (2008) reportaron un total de 943 mutaciones acumuladas en el genoma

de dos mutantes carentes de genes de reparación de ADN de *Salmonella typhimurium* LT2 durante un pasaje seriado de 200 días en caldo en laboratorio, por lo cual nuestros resultados de acumulación de mutaciones caen dentro de lo esperado, ya que en 30 días de exposición al medio ambiente acuático, se acumularon un total de 566 mutaciones (Cuadro 7); tomando en cuenta que en el experimento de Andersson y colaboradores se creaba un efecto de botella al realizar el paso seriado de una cepa a medio fresco, la acumulación y fijación de mutaciones se encuentra por arriba de lo que se encontraría en la naturaleza.

Cuadro 7. Mutaciones presentes en los genomas analizados

Cepa	Mutaciones	Mutaciones únicas	Inserciones	Deleciones
S347-1	189	2	186	3
S347-2	190	2	186	4
S347-3	187	10	184	3
S347-4	177	6	173	4
S76-1	326	57	305	21
S76-2	294	25	276	18

Los resultados obtenidos de la acumulación de mutaciones en las cepas de *Salmonella* Oranienburg S76 permitieron calcular una tasa de mutación de  $2.65 \times 10^{-8}$  mutaciones por sitio por generación al ser expuesta a agua de río. De igual manera, la tasa de mutación total de *Salmonella* Oranienburg S347 expuesta a agua de río fue de  $2.39 \times 10^{-8}$  mutaciones por sitio por generación.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Andersson y Lind (2008) donde reportaron una tasa de mutación promedio para *Salmonella* Typhimurium LT2 de  $3 \times 10^{-9}$  mutaciones por sitio en una cepa sin modificar, mientras que para las cepas que presentaban genes de reparación de ADN truncados se observó un aumento en la tasa de mutación de hasta 100 veces, dependiendo de la cantidad de genes que se vieron afectados.

Los resultados obtenidos con respecto a la tasa de mutación demuestran que esta varía con el tiempo de exposición al ambiente acuático, dado que la cepa de *Salmonella* S76-1 equivalente al tercer día de exposición al ambiente acuático presentó una tasa de mutación de  $4.10 \times 10^{-8}$  mutaciones por sitio por generación, mientras que la cepa perteneciente al día 5 (S76-2) presentó una tasa de  $2.22 \times 10^{-8}$  mutaciones por sitio por generación.

Esto si lo comparamos con las mutaciones presentes en cada cepa 305 (S76-1) y 276 (S76-2) mutaciones, se muestra una tendencia de disminución en el tiempo.

Con respecto a la cepa S347, se observó un efecto de modificación en el tiempo similar; en este sentido la cepa S347-1 que corresponde al día 3 presentó una tasa de mutación de  $2.10 \times 10^{-8}$  mutaciones por sitio por generación, la cepa S347-2 equivalente al día 5 de exposición presentó una tasa de mutación  $1.26 \times 10^{-8}$  mutaciones por sitio por generación, la cepa S347-3 tomada el día 15 presentó una tasa de mutación de  $4.15 \times 10^{-9}$  mutaciones por sitio por generación y la cepa S347-4 presentó una tasa de mutación de  $1.96 \times 10^{-9}$  mutaciones por sitio por generación, que se pueden observar en el Cuadro 8.

Tomando en cuenta el reporte de Ochman y Wilson en 1987, donde establecieron la tasa de mutación para organismos celulares en un rango de  $1.10 \times 10^{-9}$  a  $1.19 \times 10^{-10}$ , las cepas analizadas en este estudio presentaron una tasa de mutación elevada es decir cuentan con una tasa de mutación acelerada en los inicios del experimento que regresa a valores normales una vez se adaptó a las condiciones.

Estos resultados, apoyan la idea de que la tasa de mutación es dinámica, porque las cepas al ser expuestas al agua de río, presentaron una tasa de mutación los primeros días de la exposición y fue decayendo con el paso del tiempo, lo que concuerda con lo reportado por diversos autores, que proponen que una cepa al estar expuesta a un ambiente estresante aumenta su tasa de mutación con la finalidad de generar una mayor variabilidad genética y poder sobrevivir al ambiente estresante y una vez que se adaptó, la tasa de mutación regresa a la normalidad (Notley-McRobb et al. 2002; Wielgoss et al. 2013).

Cuadro 8. Tasa de Mutación de las cepas analizadas

Cepa	Tiempo (Días)	Mutaciones	Tasa de mutación (por sitio por generación)
S347-1	3	189	2.10037E-08
S347-2	5	186	1.26689E-08
S347-3	15	184	4.1563E-09
S347-4	30	173	1.96702E-09
S76-1	3	305	4.10834E-08
S76-2	5	276	2.22304E-08

De igual manera, la matriz de aislamiento podría ser un factor a tomar en cuenta para próximos estudios ya que la cepa S347 al ser un aislado de un brote de gastroenteritis, se encontró durante ese tiempo expuesta a un ambiente sumamente estresante como es el sistema inmune del hospedero, por lo que tendría la capacidad de sobrevivir en condiciones adversas. Este fenómeno lo estudiaron Tanner y Kingsley (2018), al analizar el genoma de *Salmonella* enteritidis en un caso de bacteriemia recurrente en un paciente inmunocomprometido durante 10 años, observaron que la cepa presentaba una tasa de mutación de  $1 \times 10^{-5}$  mutaciones por sitio por generación, lo que le confirió a la cepa la diversidad genética suficiente para crear estirpes que pudieran evadir el sistema inmune del hospedero, a su vez encontraron que la cepa presentaba mutaciones en el gen de reparación de ADN *mutS* lo cual dio surgimiento al fenotipo hipermutante de *Salmonella*.

La diversidad filogenética que se observa en las cepas de *Salmonella* Oranienburg S347, demuestra un proceso de generación de variantes que permite sugerir que las cepas al estar expuestas el agua río generaron variantes para poder sobrevivir y una vez que lograron establecerse las mutaciones disminuyeron y por lo tanto la tasa de mutación también se vio afectada (figura 12).

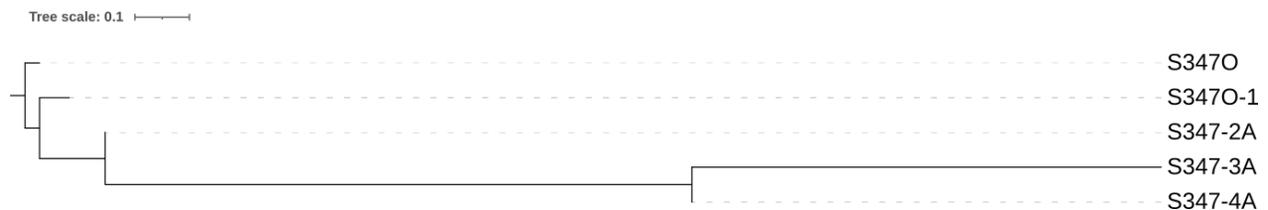


Figura 12. Árbol filogenético de la cepa de *Salmonella* Oranienburg S347

Con respecto a *Salmonella* Oranienburg S76 el árbol muestra el inicio de la diversificación genética a partir del día 5, pero por ser solamente tres cepas, no se puede observar un cambio notorio como en el caso de la cepa *Salmonella* S347, donde la reconstrucción de la diversificación genética permite observar cambios notorios desde el día 3. Sin embargo, para ambas cepas existen mutaciones observables en el tiempo de exposición al ambiente, dando una prueba más a que el agua de río es un ambiente estresante para *Salmonella* y que por ello genera la adaptabilidad suficiente generando diferentes estirpes.

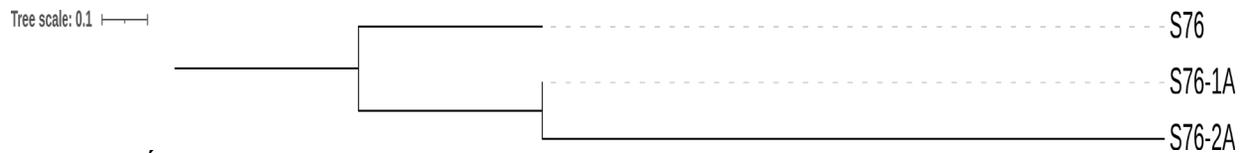


Figura 13. Árbol filogenético de la cepa de *Salmonella* Oranienburg S76

#### 6.4. Espectro de mutaciones de *Salmonella* Oranienburg expuesta a agua de Río

De los genomas analizados para la búsqueda de variantes en *Salmonella* Oranienburg, se encontraron un total de 566 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés), dentro de los que se encontraron 535 inserciones (94.52%) y 31 deleciones (5.47%); 363 de estos SNPs generan mutaciones de cambios en el marco de lectura abierto, es decir, que afectan la producción de la proteína funcional a la que codifican, ya que el nucleótido que se insertó o eliminó genera un cambio en la cadena de nucleótidos que no es divisible entre tres (afectación del código genético), por lo que se ven afectados los codones que codifican los 20 aminoácidos que se usan para producir la proteína, mientras que el resto de mutaciones (203), no generan cambios en el marco de lectura abierto ya que caen en regiones intergénicas.

Una representación del total de mutaciones acumuladas en ambos genomas, así como la función de la proteína que se ve afectada se muestran en el cuadro 9, donde se especifica si la mutación ocurrió en una sola cepa, o en ambas cepas, asimismo se especifica el gen que se ve afectado para *Salmonella* Oranienburg S76 y en el Cuadro 10 para *Salmonella* Oranienburg S347.

Cuadro 9. Mutaciones de interés presentes en el genoma de *Salmonella* Oranienburg S76 expuesta a agua de río

Cepa	Ref	Var	Tipo	Gen	Función
2:S76-1,S76-2	AGG	AGGG	Inserción	<i>TmcA</i>	ARNt citosina acetiltransferasa
2:S76-1,S76-2	CGGGGGGG	CGGGGGG	Delección	<i>TmcA</i>	ARNt citosina acetiltransferasa
2:S76-1,S76-2	CGG	CGGG	Inserción	<i>UraA</i>	Uracil permeasa(Metabolismo pirimidinas)
2:S76-1,S76-2	GC	GCC	Inserción	<i>YciC</i>	Proteína de Membrana YciC
2:S76-1,S76-2	GCC	GCCC	Inserción	<i>OppA</i>	Transportador ABC de Oligopeptidos
2:S76-1,S76-2	GCC	GCCC	Inserción	<i>YciO</i>	YciO protein, TsaC/YrdC paralog
1:S76-1	GCC	GCCC	Inserción	<i>OppA</i>	Transportador ABC de Oligopeptidos OppA
1:S76-1	GCC	GCCC	Inserción	<i>KdpD</i>	Histidina quinasa de canal de K + osmosensible
1:S76-1	AGG	AGGG	Inserción	<i>Malt</i>	Maltodextrina fosforilasa
2:S76-1,S76-2	AGG	AGGG	Inserción	<i>Malt</i>	Activador transcripcional del regulon maltosa
2:S76-1,S76-2	ACC	ACCC	Inserción	<i>GlpE</i>	Tiosulfato sulfurtransferasa
2:S76-1,S76-2	CG	CGG	Inserción	<i>SdaR</i>	Regulador de utilización de diácido de azúcar SdaR
2:S76-1,S76-2	GCC	GCCC	Inserción	<i>MdlA</i>	Transportador de eflujo ABC, Proteína de union a ATP MdlA
2:S76-1,S76-2	GCC	GCCC	Inserción	<i>ActP</i>	Acetato permeasa ActP
2:S76-1,S76-2	GCC	GCCC	Inserción	<i>VirK</i>	Proteína de virulencia VirK

Cuadro 9. Mutaciones de interés presentes en el genoma de *Salmonella* Oranienburg S76 expuesta a agua de río (continuación)

2:S76-1,S76-2	30158	TCC	TCCC	Inserción	<i>FtsH</i>	Metaloproteasa de zinc dependiente de ATP asociada a división celular FtsH
2:S76-1,S76-2	60197	GC	GCC	Inserción	<i>LpoA</i>	Activador de proteína de unión a penicilina LpoA
2:S76-1,S76-2	22436	GC	GCC	Inserción	<i>SbcC</i>	Exonucleasa SbcC
2:S76-1,S76-2	1619	CGGG	CGG	Delección	<i>CsgF</i>	Componente de ensamblaje y producción de la Proteína Curli CsgF
2:S76-1,S76-2	45287	CGG	CGGG	Inserción	<i>PlaP</i>	Importador de putrescina de baja afinidad PlaP
2:S76-1,S76-2	31133	AGG	AGGG	Inserción	<i>ruvC</i>	endodexirribonucleasa RuvC de union cruzada
2:S76-1,S76-2	43189	GC	GCC	Inserción	<i>MrdA</i>	Peptidoglicano D, D-transpeptidasa MrdA
2:S76-1,S76-2	47013	GCC	GC	Delección	<i>flhA</i>	Proteína de biosíntesis flagelar FlhA
2:S76-1,S76-2	49607	TCC	TCCC	Inserción	<i>CheZ</i>	Respuesta a la quimiotaxis: fosfatasa CheZ
2:S76-1,S76-2	36435	ACC	ACCC	Inserción	<i>thiK</i>	Tiamina quinasa
1:S76-1	42606	AGGGGG	AGGGGGG	Inserción	<i>PtsG</i>	Sistema PTS, componente IIC específico de glucosa
1:S76-1	53502	CTT	CTTT	Inserción	<i>FimG</i>	Subunidad de adaptador fimbrial FimG
1:S76-1	6783	TGGG	TGGGG	Inserción	<i>mnmA</i>	2-tiouridilasa MnmA específica de ARNt
2:S76-1,S76-2	76114	ACC	ACCC	Inserción	<i>FlgD</i>	Proteína de modificación de la barra del cuerpo basal flagelar FlgD
2:S76-1,S76-2	20726	AGG	AGGG	Inserción	<i>SrgB</i>	proteína de membrana externa regulada por <i>SdiA SrgB</i>

Cuadro 9. Mutaciones de interés presentes en el genoma de *Salmonella* Oranienburg S76 expuesta a agua de río (continuación)

2:S76-1,S76-2	34992	ACC	ACCC	Inserción	<i>MutY</i>	Adenina glicosilasa específica de A / G
2:S76-1,S76-2	35895	TGG	TGGG	Inserción	<i>FliT</i>	Proteína de biosíntesis flagelar FliT
2:S76-1,S76-2	47794	ACC	ACCC	Inserción	<i>FliL</i>	proteína asociada al cuerpo basal flagelar FliL
2:S76-1,S76-2	50266	TG	TGG	Inserción	<i>FliP</i>	Proteína de biosíntesis flagelar FliP
2:S76-1,S76-2	13499	GCCC	GCCCC	Inserción	<i>RecQ</i>	ADN helicasa RecQ dependiente de ATP
1:S76-1	26574	CGG	CGGG	Inserción	<i>bcsA</i>	Subunidad catalítica de celulosa sintasa
2:S76-1,S76-2	65582	A	AT	Inserción	<i>FtsI</i>	Proteína de división celular FtsI [peptidoglicano sintetasa]
2:S76-1,S76-2	68005	CGG	CGGG	Inserción	<i>MraZ</i>	Regulador transcripcional MraZ
2:S76-1,S76-2	10694	AGG	AGGG	Inserción	<i>ChiA</i>	Quitinasa
2:S76-1,S76-2	11654	TGG	TGGG	Inserción	<i>SseG</i>	Efactor de secreciones de tipo III SseG
2:S76-1,S76-2	14714	CTTTTTTTT	CTTTTTTTT	Delección	<i>SseC</i>	Efactor de secreciones de tipo III SseC
1:S76-1	16578	GCC	GCCC	Inserción	<i>SseB</i>	Efactor de secreciones de tipo III SseB
2:S76-1,S76-2	11447	GC	GCC	Inserción	<i>AsnC</i>	Regulador transcripcional AsnC
1:S76-1	9664	GCC	GCCC	Inserción	<i>ViaA</i>	Proteína ViaA
2:S76-1,S76-2	43768	CG	CGG	Inserción	<i>MglA</i>	Transportador ABC de galactosa

Cuadro 9. Mutaciones de interés presentes en el genoma de *Salmonella* Oranienburg S76 expuesta a agua de río (continuación)

2:S76-1,S76-2	4719	ACCC	ACCCC	Inserción	<i>NarU</i>	Transportadora de nitrato / nitrito NarU
2:S76-1,S76-2	1132	AGG	AGGG	Inserción	<i>OmpA</i>	Porina de membrana externa, familia OmpA
2:S76-1,S76-2	24187	TAAAAAA A	TAAAAAA A	Inserción	<i>FieF</i>	Bomba de eflujo de hierro ferroso FieF
2:S76-1,S76-2	39319	CGGG	CGGGG	Inserción	<i>YchF</i>	Proteína de unión a GTP y unión de ácidos nucleicos YchF
2:S76-1,S76-2	48097	TGG	TGGG	Inserción	<i>HyaE</i>	Captación [NiFe] factor de maduración de hidrogenasa HyaE
2:S76-1,S76-2	64786	ACC	ACCC	Inserción	<i>FadR</i>	Regulador transcripcional para la degradación de ácidos grasos FadR
2:S76-1,S76-2	1264	TG	TGG	Inserción	<i>MdtB</i>	Sistema de eflujo de múltiples fármacos MdtABC-TolC MdtB
2:S76-1,S76-2	4283	TGG	TGGG	Inserción	<i>MdtC</i>	Sistema de eflujo de múltiples fármacos MdtABC-TolC MdtC
2:S76-1,S76-2	12709	AC	A	Delección	<i>TctE</i>	Proteína del sensor de transporte de tricarboxilato TctE
2:S76-1,S76-2	47471	AG	AGG	Inserción	<i>BcfC</i>	Proteína usher de la membrana externa BcfC
2:S76-1,S76-2	61707	CGG	CGGG	Inserción	<i>DnaJ</i>	Proteína chaperona DnaJ
2:S76-1,S76-2	2779	TG	TGG	Inserción	<i>ArcD</i>	Antiportador de arginina / ornitina ArcD
2:S76-1,S76-2	947	CG	CGG	Inserción	<i>RstA</i>	Regulador de respuesta transcripcional de dos componentes RstA

Cuadro 9. Mutaciones de interés presentes en el genoma de *Salmonella* Oranienburg S76 expuesta a agua de río (continuación)

2:S76-1,S76-2	3220	GCC	GCCC	Inserción	<i>MdtH</i>	Proteína de resistencia a múltiples fármacos MdtH
2:S76-1,S76-2	3798	CGG	CGGG	Inserción	<i>MdtH</i>	Proteína de resistencia a múltiples fármacos MdtH
2:S76-1,S76-2	12773	TCC	TCCC	Inserción	<i>EmrD</i>	Bomba de salida de múltiples fármacos EmrD
2:S76-1,S76-2	16560	GTTTTTTT T	GTTTTTTT	Delección	<i>PduM</i>	Proteína de utilización de propanodiol PduM
2:S76-1,S76-2	18213	GCC	GCCC	Inserción	<i>PduJ</i>	Proteína de utilización de propanodiol PduJ
2:S76-1,S76-2	4387	GCC	GCCC	Inserción	<i>lamB</i>	Maltoporina (receptor de alta afinidad de maltosa)
2:S76-1,S76-2	43166	GCC	GCCC	Inserción	<i>bdcA</i>	Proteína mediadora de dispersión de biopelícula de unión a di-GMP cíclico
2:S76-1,S76-2	43468	AC	ACC	Inserción	<i>bdcA</i>	Proteína mediadora de dispersión de biopelícula de unión a di-GMP cíclico
2:S76-1,S76-2	52292	TGG	TGGG	Inserción	<i>TyrR</i>	Proteína represora transcripcional TyrR
2:S76-1,S76-2	773	AGG	AGGG	Inserción	<i>rpoB</i>	Subunidad beta de la ARN polimerasa dirigida por ADN
1:S76-1	774	G	GT	Inserción	<i>rpoB</i>	Subunidad beta de la ARN polimerasa dirigida por ADN
2:S76-1,S76-2	1968	TCCCCC	TCCCCC	Inserción	<i>AcfR</i>	Sistema de salida de fármacos

Cuadro 9. Mutaciones de interés presentes en el genoma de *Salmonella* Oranienburg S76 expuesta a agua de río (continuación)

1:S76-2	20988	GC	GCC	Inserción	<i>SdaR</i>	Regulador de utilización de diácido de azúcar SdaR
1:S76-2	39681	CG	CGG	Inserción	<i>HrpB</i>	Helicasa HrpB dependiente de ATP
1:S76-2	31134	G	GT	Inserción	<i>ruvC</i>	endodexirribonucleas a RuvC de union cruzada
1:S76-2	76115	C	CG	Inserción	<i>FlgD</i>	Proteína de modificación de la barra del cuerpo basal flagelar FlgD
1:S76-2	13500	C	CG	Inserción	<i>RecQ</i>	ADN helicasa RecQ dependiente de ATP
1:S76-2	3138	GCC	GCCC	Inserción	<i>PgtB</i>	Proteína del sensor del sistema de transporte de fosfoglicerato PgtB
1:S76-2	138113	GCCCC	GCCCCC	Inserción	<i>MsrB</i>	Péptido-metionina (R) -S-óxido reductasa MsrB
1:S76-2	3308	ATTTTT	ATTTTTT	Inserción	<i>hofQ</i>	Proteína de utilización de ADN
1:S76-2	3799	G	GC	Inserción	<i>MdtH</i>	Proteína de resistencia a múltiples fármacos MdtH
1:S76-2	68105	G	GT	Inserción	<i>UraA</i>	Permeasa de uracilo

Cuadro 10. Mutaciones de interés presentes en el genoma de *Salmonella* Oranienburg S347 expuesta a agua de río.

Cepas	Ref	Var	Tipo	Gen	Función
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	C	T	Inserción	<i>dbpa</i>	ATP-dependent 23S rRNA helicase DbpA
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	A	G	Inserción	<i>adhi</i>	S- (hidroximetil) glutatión deshidrogenasa
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	C	T	Inserción	<i>ydgd</i>	Uncharacterized serine protease YdgD
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	G	A	Inserción	<i>arcd</i>	Arginine/ornithine antiporter ArcD
3:S347-1,S347-	A	G	Inserción	<i>ydga</i>	Proteína putativa de

2,S347-4					union a GTP YdgA
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	G	A	Inserción	<i>ykba</i>	Permeasa hipotetica de aminoácidos
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	T	C	Inserción	<i>ydjm</i>	Hidrolasa dependiente de metales unida a membrana
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	A	G	Inserción	<i>flgm</i>	Regulador negativo de la síntesis de flagelina FlgM (anti-sigma28)
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	A	G	Inserción	<i>murj</i>	Peptidoglicano lípido II flippasa MurJ
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	C	T	Inserción	<i>murj</i>	Peptidoglicano lípido II flippasa MurJ
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	C	T	Inserción	<i>mutl</i>	Proteína de reparación de la falta de coincidencia de ADN
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	C	T	Inserción	<i>ulaa</i>	Sistema PTS, componente IIC específico de ascorbato
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	C	T	Inserción	<i>dnaj</i>	Proteína chaperona DnaJ

Cuadro 10. Mutaciones de interés presentes en el genoma de *Salmonella* Oranienburg S347 expuesta a agua de río (Continuación)

4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	C	T	Inserción	<i>nrfa</i>	Precursor del citocromo c552
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	C	A	Inserción	<i>gcd</i>	Glucosa deshidrogenasa, dependiente de PQQ
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	A	G	Inserción	<i>gcd</i>	Glucosa deshidrogenasa, dependiente de PQQ
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	T	C	Inserción	<i>pand</i>	Aspartato 1-d Descarboxilasa
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	G	A	Inserción	<i>panb</i>	3-metil-2-oxobutanoato hidroximetiltransferasa
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	C	T	Inserción	<i>hrpb</i>	Helicasa dependiente de ATP HrpB
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	T	C	Inserción	<i>yads</i>	UPF0126 Proteína de membrana interna

					YadS
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	T	C	Inserción	<i>kgtp</i>	Permeasa alfa-cetoglutarato
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	C	T	Inserción	<i>csie</i>	Proteína inducible en fase estacionaria
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	T	C	Inserción	<i>iscu</i>	Proteína de anclaje a complejo Hierro-Azufre IscU
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	C	T	Inserción	<i>nme1</i>	Nucleósido difosfato quinasa
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	G	A	Inserción	<i>cysz</i>	Transportador de sulfato, tipo CysZ
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	A	G	Inserción	<i>cher</i>	Proteína de quimiotaxis metiltransferasa
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	C	T	Inserción	<i>znua</i>	Transportador ABC de zinc, proteína de unión al sustrato

Cuadro 10. Mutaciones de interés presentes en el genoma de *Salmonella* Oranienburg S347 expuesta a agua de río (Continuación)

2:S347-1,S347-2	T	A	Inserción	<i>weca</i>	Undecaprenil-fosfato alfa-N-acetilglucosaminil 1-fosfato transferasa
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	C	T	Inserción	<i>udp</i>	Uridina fosforilasa
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	C	T	Inserción	<i>ppha</i>	Proteína fosfatasa Serina/Treonina 1
1:S347-3	CAGT	CAGG	Inserción	<i>int</i>	Integrasa de fagos
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	A	G	Inserción	<i>yebs</i>	Proteína de membrana interna YebS
1:S347-3	A	G	Inserción	<i>int</i>	Integrasa de fagos
3:S347-1,S347-2,S347-3	T	G	Inserción	<i>csp</i>	Proteína de choque térmico de la familia CSP
1:S347-3	G	A	Inserción	<i>int</i>	Integrasa de fagos
3:S347-1,S347-2,S347-3	A	G	Inserción	<i>tnpa</i>	Proteína de elemento móvil
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	A	G	Inserción	<i>gidb</i>	16S rRNA (guanine(527)-N(7))-methyltransferase
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	C	G	Inserción	<i>nirb</i>	Nitrato reductasa

4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	G	A	Inserción	<i>tyrb</i>	Aminotransferasa alfa
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	G	A	Inserción	<i>alr</i>	Alanina racemasa
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	TTTC	ATTT	Inserción	<i>pmm</i>	Fosfomanomutasa

Cuadro 10. Mutaciones de interés presentes en el genoma de *Salmonella* Oranienburg S347 expuesta a agua de río (Continuación)

4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	C	A	Inserción	<i>tuf</i>	Translation elongation factor Tu
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	C	T	Inserción	<i>lpxk</i>	Tetraacilisacárido 4'-quinasa
1:S347-3	AAACT	AAACG	Inserción	<i>nane</i>	N-acetilmanosamina-6-fosfato 2-epimerasa
3:S347-1,S347-2,S347-4	T	G	Inserción	<i>nane</i>	N-acetilmanosamina-6-fosfato 2-epimerasa
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	G	A	Inserción	<i>lyso</i>	Exportador de lisina
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	T	C	Inserción	<i>puta</i>	Represor transcripcional de PutA y PutP deshidrogenasa
1:S347-3	C	T	Inserción	<i>tdca</i>	Activador transcripcional del operón catabólico de treonina
1:S347-3	T	G	Inserción	<i>tdca</i>	Activador transcripcional del operón catabólico de treonina
1:S347-3	G	A	Inserción	<i>tdca</i>	Activador transcripcional del operón catabólico de treonina
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	T	C	Inserción	<i>hybe</i>	Proteína del operón hidrogenasa-2 HybE
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	C	T	Inserción	<i>yggS</i>	Proteína que contiene piridoxal fosfato YggS
1:S347-2	GTC	ATG	Inserción	<i>rcna</i>	Transportador de eflujo de níquel / cobalto RcnA
4:S347-1,S347-	G	C	Inserción	<i>xni</i>	Flap endonucleasa

2,S347-3,S347-4					Xni
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	C	T	Inserción	<i>rpos</i>	ARN polimerasa factor sigma RpoS

Cuadro 10. Mutaciones de interés presentes en el genoma de *Salmonella* Oranienburg S347 expuesta a agua de río (Continuación)

4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	T	C	Inserción	<i>hycc</i>	Subunidad 3 de formiato hidrogenasa
2:S347-2,S347-4	GCGTGA AGCCGC T GAAAAA GCGAAA C	GC	Delección	<i>rbfa</i>	Factor de unión a ribosoma A
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	C	T	Inserción	<i>nlpi</i>	Lipoproteína NlpI
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	G	A	Inserción	<i>gatc</i>	Sistema PTS, componente IIC específico de galactitol
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	T	C	Inserción	<i>tgt</i>	Queuine ARNt-ribosiltransferasa
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	G	A	Inserción	<i>dxs</i>	1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	T	G	Inserción	<i>safb</i>	fimbria chaperona periplasmática SafB
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	C	T	Inserción	<i>alla</i>	Ureidoglicolato liasa
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	C	T	Inserción	<i>oprM</i>	Sistema de eflujo de múltiples fármacos OprM
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	TGCCGC CACAAC C	TC	Delección	<i>mglc</i>	Transportador ABC de galactosa
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	C	T	Inserción	<i>yeja</i>	Transportador ABC, proteína de unión al sustrato YejA
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	G	A	Inserción	<i>yeje</i>	Transportador ABC, proteína permeasa YejE
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	A	G	Inserción	<i>yejh</i>	ARN helicasa dependiente de ATP YejH

Cuadro 10. Mutaciones de interés presentes en el genoma de *Salmonella* Oranienburg S347 expuesta a agua de río (Continuación)

4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	G	A	Inserción	<i>psra</i>	Polisulfuro reductasa PsrA, subunidad de unión a molibdopterina
3:S347-1,S347-2,S347-4	T	C	Inserción	<i>pmm</i>	Fosfomanomutasa
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	T	C	Inserción	<i>yfca</i>	Transmembrane protein YfcA
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	G	A	Inserción	<i>btub</i>	Receptor de vitamina B12 de membrana externa BtuB
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	T	C	Inserción	<i>citx</i>	Citrato liasa holo-[acil-proteína transportadora] sintasa
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	C	T	Inserción	<i>pagp</i>	Lípido A palmitoiltransferasa PagP
4:S347-1,S347-2,S347-3,S347-4	A	G	Inserción	<i>daca</i>	D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa.

Un ejemplo, de una mutación presente hasta el día 30 en la cepa S347-4, en el gen *rpoS*, que presentó una mutación C-T lo que ocasiona una mutación no sinónima en el aminoácido 248 de Prolina a Serina , como se esquematiza en la figura 14. Algunas mutaciones en el gen *rpoS* se han reportado estar relacionadas al catabolismo de aminoácidos, confiriendo un fenotipo con ventaja de crecimiento en fase estacionaria (GASP) (Zisner et. al, 1999). Por lo que la mutación que se encuentra en las cepas S347 al contrastarlas con los resultados de cuenta viable al ser expuesta al agua de río podría tener un efecto negativo en la capacidad de crecimiento en la fase estacionaria a la cepa, lo cual lleva al rápido declive dentro de los días de exposición, en contra parte, la cepa S76, no presenta dicha mutación.

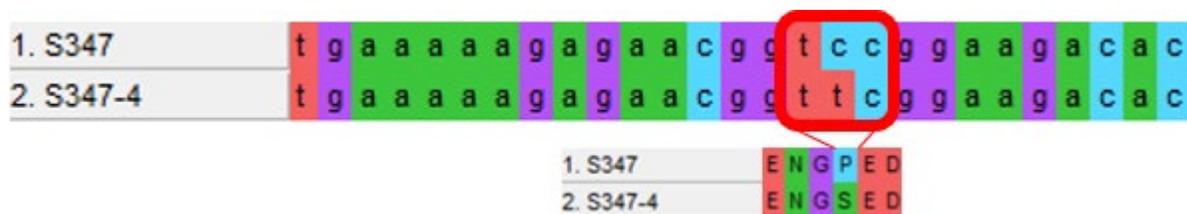


Figura 14. Mutación no sinónima dentro del gen *rpoS* en *S. Oranienburg* S347.

Los genes afectados por mutaciones en *Salmonella* Oranienburg, después de ser expuesta a condiciones ambientales en agua de río se engloban en diferentes categorías, las principales son: respuesta a estrés, donde a su vez se incluyen genes de virulencia y resistencia; genes de motilidad, metabolismo, formación de biofilms y reparación de ADN. Dentro de los genes afectados en la categoría de respuesta a estrés se encuentran el gen *ptlA*, el cual codifica para la subunidad A del sistema de secreción tipo 4, que es esencial para la formación y excreción de la proteína parecida a tosferina PTX. Ésta pertenece a los factores de virulencia AB5, los cuales se unen a las glicoproteínas en la membrana celular del hospedero para provocar el proceso de internalización. La proteína PTX es reconocida por la mayoría de las células presentes en los mamíferos (Mylus y Weiss, 1999; Bogdan et al., 2003; Burns, 2003), por lo que una mutación que trunque dicha expresión de la proteína, podría disminuir la capacidad de invasión de *Salmonella*. La aparición de una mutación como esta, a causa de la permanencia de *Salmonella* en agua de río, podría surgir como resultado de una baja dependencia en sus capacidades infecciosas para su supervivencia; dicho proceso favorecería otras estrategias que representen ventajas para resistir las condiciones altamente fluctuantes que predominan el medio en cuestión. Por lo que mantener la expresión de genes del proceso de invasión, significaría un gasto energético innecesario para la célula en estas condiciones.

De igual manera, se encontraron mutaciones en los genes de resistencia a antibióticos, *mdtH*, *mdtB*, *mdtC*, pertenecientes a la superfamilia facilitadora principal (MFS), que son un grupo de proteínas transportadoras de membrana que cumplen con la función de transportar compuestos antimicrobianos a través de la membrana celular mediante interacción con diferentes proteínas, incluso de la misma familia. Estos genes, se encuentran en la mayoría de las bacterias resistentes a múltiples antibióticos (Kumar et. al, 2013; Pasqua et. al, 2019). Nishino y colaboradores en el 2006 reportaron a los genes *mdtA-L* como un mecanismo de resistencia prevalente en la mayoría de las cepas de *Salmonella*. Asimismo, demostraron que las deleciones de los genes *mdtA-L* contribuyen

al aumento en la susceptibilidad ante antibióticos de *Salmonella*.

Por otro lado, se encontraron mutaciones en genes tanto de transporte, como de resistencia a metales pesados, como son *cbiQ*, *ydjM*, *zntR*, *ycfH*, *hypF*. La contaminación del agua por metales pesados puede actuar como agente de presión selectiva, por lo que encontrar mutaciones en genes pertenecientes a transporte, tanto de antibióticos como de metales pesados, a través de la membrana, podría resultar de la necesidad de limitar o eliminar de manera más efectiva los compuestos tóxicos con los que interactúa en el agua de río. Cesare y colaboradores (2016) analizaron el efluente de plantas tratadoras de agua en Italia y encontraron una correlación entre la resistencia a antibióticos mediada por el gen *int1*, la resistencia a sulfonamidas por el gen *sulII* y los genes *czcA* que brinda resistencia a cadmio, cobalto y zinc, y el gen *arsB*, que brinda resistencia a arsénico.

Otro ejemplo de co-selección de resistencia a metales pesados y antibióticos, es el estudio publicado por Garner y colaboradores (2016), en el que realizaron análisis metagenómico en muestras de agua del río Cache La poudre, en Fort Collins, Colorado. En dicho estudio obtuvieron el perfil de resistencia a antibióticos presentes en el agua de río y encontraron una correlación positiva entre el gen de resistencia *sul1* y concentraciones de plata. Asimismo, los genes *sul2*, *tet(O)*, *tet(w)* y *ermF* exhibieron una correlación positiva con concentraciones de uranio y estroncio, lo cual sugiere un mecanismo de co-selección entre la resistencia a antibióticos y la resistencia a metales pesados. Este podría ser el caso por el que se presentan mutaciones en genes de transporte y resistencia a metales pesados y antibióticos, en las cepas de *Salmonella* Oranienburg analizadas tras su exposición a las aguas del río Humaya. La contaminación por metales pesados ha sido reportada anteriormente en ríos de Sinaloa, como los hallazgos de Ruiz-Fernández y colaboradores en 2003, quienes analizaron la contaminación del río Culiacán (que nace a partir de la unión de los ríos Tamazula y Humaya); reportaron la contaminación por diferentes concentraciones de Cadmio, Cobre, Cobalto, Níquel, Plomo y Zinc, mismos que tienen la capacidad de generar una presión selectiva en los microorganismos que se encuentran expuestos a ellos.

Con respecto a las mutaciones observadas en genes de metabolismo, se encontraron mutaciones relacionadas al metabolismo de carbohidratos, glucógeno, y pentosa fosfato principalmente; se observó una mutación en el gen *pstG*, el cual codifica para la proteína EIICB que tiene como función ser una permeasa de membrana específica para glucosa, y se encuentra relacionado con la

supervivencia de *Salmonella* en condiciones de crecimiento selectivo con glucosa ya que funciona como un quimiorreceptor para monitorear la concentración de azúcares en el medio externo y se ha demostrado que las mutaciones deletéreas del gen *pstG* generan un aumento en la producción de succinato en la fermentación de glicerol y de glucosa (Nam et al., 2008; Ohta et al., 2012; Mienda y Samsir, 2015). De igual manera se encontraron mutaciones en los genes *maltT* y el represor del regulon de maltosa y del operon *manXYZ* (metabolismo de manosa) *mlc*, estos resultados apoyan lo reportado por Medrano-Felix y colaboradores (2017) donde demostraron que *Salmonella* Oranienburg y Saintpaul tienen la capacidad de utilizar fuentes alternas de carbono ya que, se presentan mutaciones en las principales rutas metabólicas durante la exposición al río que podrían tener como finalidad bloquear la captación de diferentes fuentes de carbono ya que no se encuentran en altas concentraciones en el agua, por lo que se activa la utilización de fuentes biodisponibles en el río como manitol, ácido D-Galáctico, entre otras.

Con respecto a los genes que codifican para motilidad y producción de biofilms de las cepas, de los más de 40 genes encargados para la biosíntesis flagelar, se observaron mutaciones en los genes *fliT*, *fliM*, *fliP*, *fliQ*, *fliL*, *fimG*, *bcbB*, *flgD*, *flgM*, *flgC*, *csgF* y *bdcA*. Dado que se presentan mutaciones en diversos genes necesarios tanto para la motilidad como virulencia de la cepa, se puede inferir que la capacidad de invasión de las cepas podría verse disminuida con la exposición de *Salmonella* Oranienburg al agua de río. Lo anterior concuerda con lo reportado por Estrada-Acosta y colaboradores en 2018 donde al exponer a *Salmonella* Oranienburg al agua de río se observó una disminución en la invasión de *Salmonella* Oranienburg en células epiteliales HEP-2 mientras que *Salmonella* Saintpaul, solo presentó disminución en la adhesión a las células epiteliales. Los resultados de mutación obtenidos apoyan la conclusión del estudio, respaldando la idea basándonos en cambios a nivel genético. Por otro lado las mutaciones presentes en la biosíntesis de biofilms se dieron en el gen *CsgF* que pertenece al operon de ensamblaje de la proteína curli *csgDEFG*, es una proteína periplásmica y se ha reportado en *Escherichia coli*, que cepas mutantes para el gen *csgF*, presentan diferencias fenotípicas al crecerlas en medio selectivo Congo-Red utilizado para identificar diferencias entre cepas; las cepas de *E. coli* deficientes de *csgF* presentan una coloración rosada, ya que por la falta de la misma se excreta *csgA* sin polimerizar al espacio extracelular (Chapman et al., 2002). Por lo que las mutaciones en este gen ocasionarían cambios en la caracterización fenotípica de las cepas expuestas en agua de río utilizando el medio selectivo Congo-Red.

En cuanto a los genes de resistencia a estrés, se encontraron mutaciones en el gen *rpoS*, que codifica para el factor sigma de la ARN polimerasa y tiene como función promover la unión de la ARN polimerasa a sitios de iniciación específicos, además es un regulador clave de la fase estacionaria ya que controla la expresión de genes involucrados en el metabolismo, transporte y regulación de estrés, además de proteger contra la muerte en fase estacionaria inducida por la endoribonucleasa *mazF* (Weber, et al., 2005; Rahman, et al., 2006; Kolodkin y Engelberg-Kulka, 2009). También se observaron mutaciones en los genes *rnb*, que codifican para la exoribonucleasa 2, que degrada el ARNm y ARNr en condiciones de inanición (Basturea, et al., 2010). Sulthana y colaboradores (2017) demostraron que la exoribonucleasa 2 en *E. coli* regula la exoribonucleasa RNase PH, que tiene como funcionalidad biológica el controlar los niveles de pH e iniciar el proceso de degradación ribosomal en células en inanición, por lo que la ausencia de la exoribonucleasa 2, provoca un aumento en la muerte celular por inanición durante la fase estacionaria. Esto sugiere que al llegar a la fase estacionaria comenzó un proceso de inanición en la célula provocando presión selectiva para generar variabilidad dentro de estos genes con la finalidad de sobrevivir al estrés producido por inanición.

En cuanto a los genes de reparación de ADN que contaron con mutaciones en el genoma de *Salmonella* Oranienburg, se encuentran mutaciones en los genes *mutY*, *mutL*, *recQ*, *ruvC* y *hofQ*. Los genes *mutY* y *mutL* pertenecen al sistema de reparación de errores en el ADN (MMR) y participan en la conservación de la fidelidad del ADN y se ha reportado la asociación de fenotipos hipermutantes con la generación de mutaciones espontáneas reversibles en dichos genes, Gong y colaboradores (2007) reportaron una delección de 6 pares de bases en el gen *mutL*, que solo se mantenía durante algunas generaciones, cuando se generaba de nuevo una variable que no presentaba esta delección se volvía al genotipo silvestre y recobraba la funcionalidad, proponiendo que las mutaciones en los genes MMR, presentan mutaciones transitorias para afectar la diversidad genética sólo durante condiciones apremiantes. De manera similar se encontraron mutaciones en el gen *hofQ* que codifica para una porina de ADN extracelular y se ve relacionada en el metabolismo de ADN exógeno como nutriente (Palcheyskiy y Finkel, 2006; Sun, et al., 2009) lo cual sugiere que *Salmonella* presenta un mecanismo de utilización de ADN exógeno como nutriente en condiciones de inanición.

## 7. CONCLUSIONES

El análisis de mutaciones reveló la acumulación de 566 mutaciones en el genoma de *Salmonella* Oranienburg expuesta a un ambiente en agua de río, 351 pertenecientes al genoma de la cepa S76 y 215 al de la cepa S347, lo que dio como resultado una tasa de mutación dinámica de  $4.10 \times 10^{-8}$  a  $2.22 \times 10^{-8}$  mutaciones por sitio por generación, para la cepa de *Salmonella* Oranienburg S76 durante el tiempo de exposición. De igual manera la cepa de *Salmonella* Oranienburg S347 presentó una tasa de mutación dinámica de  $2.10 \times 10^{-8}$  a  $1.19 \times 10^{-9}$  mutaciones por sitio por generación. Lo anterior respalda que, ante el escenario del río como un ambiente estresante, *Salmonella* cuenta con los mecanismos genéticos necesarios para incrementar la adaptabilidad a condiciones adversas, mediante mutaciones específicas dirigidas a modificar el metabolismo de carbohidratos, respuesta a estrés y reparación de ADN. Además, la plasticidad que presenta en la tasa de mutación, permite la generación de una mayor variabilidad en la deriva génica de la población, por lo que las mutaciones brindan un indicio de ser generadas por la presión selectiva que impone el río sobre las cepas, lo cual sugiere que *Salmonella* Oranienburg tiene la plasticidad y capacidad genética de adaptarse y persistir en el agua de río.

## 8. RECOMENDACIONES

Con base en los resultados obtenidos se sugiere generar cepas mutantes para los genes de reparación de ADN y de respuesta a estrés con el fin de evaluar su rol fisiológico en la persistencia de *Salmonella* en un ambiente acuático, de igual manera, se recomienda evaluar los niveles de expresión de genes de resistencia a factores específicos, tales como resistencia a metales pesados para establecer si la exposición al río aporta cambios necesarios para la supervivencia de la bacteria. Asimismo, sería de interés completar el genoma de *Salmonella* S76 y S347 para utilizarlos como modelos en la evaluación de investigaciones posteriores.

## 9. REFERENCIAS

- Andersson, D. I., y Koskiniemi, S. 2009. Translesion DNA Polymerases are required for spontaneous deletion formation in *Salmonella typhimurium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 10248-10253.
- Álvarez-Ordóñez, A., Begley, M., Prieto, M., Messens, W., López, M., Bernardo, A., & Hill, C. (2011). *Salmonella* spp. survival strategies within the host gastrointestinal tract. *Microbiology*, 157(12), 3268-3281.
- Audia, J. P., Webb, C. C., & Foster, J. W. (2001). Breaking through the acid barrier: an orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. *International journal of medical microbiology*, 291(2), 97-106.
- Awadi, A., Ben Slimen, H., Smith, S., Knauer, F., Makni, M., y Suchentrunk, F. 2018. Positive selection and climatic effects on MHC class II gene diversity in hares (*Lepus capensis*) from a steep ecological gradient. *Sci Rep*, 8(1), 11514. doi:10.1038/s41598-018-29657-3
- Baker, S., y Dougan, G. 2007. The genome of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Clin Infect Dis*, 45 Suppl 1, S29-33. doi:10.1086/518143
- Bang, I. S., Kim, B. H., Foster, J. W., & Park, Y. K. (2000). OmpR regulates the stationary-phase acid tolerance response of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of bacteriology*, 182(8), 2245-2252.
- Basturea GN, Zundel MA, Deutscher MP. 2011. Degradation of ribosomal RNA during starvation: comparison to quality control during steady-state growth and a role for RNase PH. *RNA*.17(2):338-45. doi: 10.1261/rna.2448911.
- Bogdan JA, Yuan W, Long-Rowe KO, Sarwar J, Brucker EA & Blake MS 2003. Identification of peptides that mimic the pertussis toxin binding site on bovine fetuin.
- Bolger, A. M., Lohse, M., y Usadel, B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(15), 2114–2120. Baker-Austin, C., Wright, M. S., Stepanauskas, R. & McArthur, J. V. 2006. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology* 14, 176-182
- Bonadonna, L., Filetici, E., Nusca, A., & Paradiso, R. (2006). Controlli ambientali sulla diffusione di sierotipi di *Salmonella* spp in acque fluviali. *Microbiologia Medica*, 21(4).
- Brichta-Harhay, D. M., Arthur, T. M., Bosilevac, J. M., Kalchayanand, N., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L., y Koochmaraie, M. 2011. Diversity of multidrug-resistant *Salmonella enterica* strains associated with cattle at harvest in the United States. *Appl Environ Microbiol*, 77(5), 1783-1796. doi:10.1128/AEM.01885-10
- Burns DL. 2003. Type IV transporters of pathogenic bacteria. *Curr Opin Microbiol*.6:29–34
- Bush, S. J., Foster, D., Eyre, D. W., Clark, E. L., De Maio, N., Shaw, L. P., ... & Walker, A. S. 2020. Genomic diversity affects the accuracy of bacterial single-nucleotide polymorphism-calling pipelines. *GigaScience*, 9(2), giaa007.

- Canchaya, C., Fournous, G., & Brüssow, H. 2004. The impact of prophages on bacterial chromosomes. *Molecular microbiology*, 53(1), 9-18.
- Casteñeda-Ruelas GM, Carreón-Gaxiola C, Castelán-Sánchez HG, Acatzi-Silva A, Romero-Martínez S, García-Molina A, Jiménez-Edeza M. 2017. Draft genome sequences of 18 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Oranienburg strains isolated from rivers in northwestern Mexico. *Genome Announc* 5:e01585-16.
- Centro para la Prevencion y Control de Enfermedades. (2019). National Salmonella Surveillance. <https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/salmonella-surveillance.html>
- Chatterjee, N., & Walker, G. C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and molecular mutagenesis*, 58(5), 235-263.
- Coburn, B., Grassl, G. A., & Finlay, B. B. (2007). Salmonella, the host and disease: a brief review. *Immunology and cell biology*, 85(2), 112-118.
- Contreras-Soto, M. B., Medrano-Félix, J. A., Ibarra-Rodríguez, J. R., Martínez-Urtaza, J., Chaidez, Q. C., & Castro-del Campo, N. (2019). Los últimos 50 años de Salmonella en México: Fuentes de aislamiento y factores que influyen en su prevalencia y diversidad. *Revista bio ciencias*, 6(SPE).
- Craig-Mylius KA & Weiss A 1999. Mutants in the *ptlA-H* genes of *Bordetella pertussis* are deficient for pertussis toxin secretion. *FEMS Microbiol Lett* 179, 479–484.
- Davis, R. K., Hamilton, S., y Brahana, J. V. 2005. *Escherichia coli* Survival in Mantled Karst Springs and Streams, Northwest Arkansas Ozarks, USA. *Journal of the american water resources association*, 41, 1279-1287.
- Delmas, S., y Matic, I. 2006. Interplay between replication and recombination in *Escherichia coli* Impact of the alternative DNA polymerases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 4564-4569.
- Deng, W., Liou, S. R., Plunkett, G., 3rd, Mayhew, G. F., Rose, D. J., Burland, V., . . . Blattner, F. R. 2003. Comparative genomics of *Salmonella enterica* serovar Typhi strains Ty2 and CT18. *J Bacteriol*, 185(7), 2330-2337. doi:10.1128/jb.185.7.2330-2337.2003
- Denamur, E., Tenaillon, O., Deschamps, C., Skurnik, D., Ronco, E., Gaillard, J. L., ... & Matic, I. (2005). Intermediate mutation frequencies favor evolution of multidrug resistance in *Escherichia coli*. *Genetics*, 171(2), 825-827.
- Desai, M. M., y Fisher, D. S. 2007. Beneficial mutation selection balance and the effect of linkage on positive selection. *Genetics*, 176(3), 1759-1798. doi:10.1534/genetics.106.067678
- Dolejska, M., Bierosova, B., Kohoutova, L., Literak, I., y Cizek, A. 2009. Antibiotic-resistant *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates with integrons and extended-spectrum beta-lactamases in surface water and sympatric black-headed gulls. *J Appl Microbiol*, 106(6), 1941-1950. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04155.x
- Ermolaeva, M. D. 2001. Synonymous codon usage in bacteria. *Current issues in molecular biology*, 3(4), 91-97.
- Estrada-Acosta, M. D., Ramirez, K., Medrano-Félix, J. A., Castro-Del Campo, N., López-Moreno, H. S., Jimenez Edeza, M., ... & Chaidez, C. 2018. Effect of river water exposition on adhesion and invasion abilities of *Salmonella* Oranienburg and Saintpaul. *International Journal of*

*Environmental Health Research*, 28(1), 43-54.

- European Centre for Disease Prevention and Control. Salmonellosis. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC; 2020.
- Eyre-Walker, A., y Keightley, P. D. 2007. The distribution of fitness effects of new mutations. *Nat Rev Genet*, 8(8), 610-618. doi:10.1038/nrg2146
- Foerstner, K. U., Von Mering, C., Hooper, S. D., & Bork, P. 2005. Environments shape the nucleotide composition of genomes. *EMBO reports*, 6(12), 1208-1213.
- Foster, P. L. (2005). Stress responses and genetic variation in bacteria. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 569(1-2), 3-11.
- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., & Toussaint, A. 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 722-732.
- Fu, S., Octavia, S., Tanaka, M. M., Sintchenko, V., y Lan, R. 2015. Defining the Core Genome of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium for Genomic Surveillance and Epidemiological Typing. *J Clin Microbiol*, 53(8), 2530-2538. doi:10.1128/JCM.03407-14
- Gal-Mor, O., Boyle, E. C., & Grassl, G. A. (2014). Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Frontiers in microbiology*, 5, 391.
- Garner, E. et al. 2016. Metagenomic profiling of historic Colorado Front Range flood impact on distribution of riverine antibiotic resistance genes. *Scientific Reports* 6, 38432, doi:10.1038/srep38432
- Gawande, P. V., & Bhagwat, A. A. (2002). Inoculation onto solid surfaces protects *Salmonella* spp. during acid challenge: a model study using polyethersulfone membranes. *Applied and environmental microbiology*, 68(1), 86-92.
- Gibson, J. L., Lombardo, M. J., Thornton, P. C., Hu, K. H., Galhardo, R. S., Beadle, B., Rosenberg, S. M. 2010. The sigma(E) stress response is required for stress-induced mutation and amplification in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 77(2), 415-430. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07213.x
- Gong, J., & Liu, S. (2006). WITHDRAWN: mutL as a switch for genetic variation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.
- Gong, J., Liu, W. Q., Liu, G. R., Chen, F., Li, J. Q., Xu, G. M., ... & Liu, S. L. 2007. Spontaneous conversion between mutL and 6 bp $\Delta$ mutL in *Salmonella typhimurium* LT7: Association with genome diversification and possible roles in bacterial adaptation. *Genomics*, 90(4), 542-549.
- González López Irvin. (2017). REGULACIÓN METABÓLICA DE *Salmonella* spp. COMO ESTRATEGIA DE ADAPTACIÓN EN AGUA DE RÍO. (Tesis de maestría). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Sinaloa, México.
- Grimont, P. A., y Weill, F. X. 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. *WHO collaborating centre for reference and research on Salmonella*, 9, 1-166.
- Gutiérrez-Cogco, L., Montiel-Vázquez, E., Aguilera-Pérez, P., & González-Andrade, M. D. C. (2000). Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. *salud pública de méxico*, 42, 490-495.

- Hale, C. R., Scallan, E., Cronquist, A. B., Dunn, J., Smith, K., Robinson, T., ... & Clogher, P. (2012). Estimates of enteric illness attributable to contact with animals and their environments in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 54(suppl\_5), S472-S479.
- Haley, B. J., Cole, D. J., & Lipp, E. K. (2009). Distribution, diversity, and seasonality of waterborne salmonellae in a rural watershed. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(5), 1248-1255.
- Hata, H., Natori, T., Mizuno, T., Kanazawa, I., Eldesouky, I., Hayashi, M., ... & Ezaki, T. (2016). Phylogenetics of family Enterobacteriaceae and proposal to reclassify *Escherichia hermannii* and *Salmonella subterranea* as *Atlantibacter hermannii* and *Atlantibacter subterranea* gen. nov., comb. nov. *Microbiology and immunology*, 60(5), 303-311.
- Hoelzer, K., Switt, A. I. M., & Wiedmann, M. (2011). Animal contact as a source of human nontyphoidal salmonellosis. *Veterinary research*, 42(1), 1-28.
- Hohmann, E. L. 2001. Nontyphoidal Salmonellosis. *Clinical Infectious Diseases*, 32, 263-269.
- Ibarra, J. A., y Steele-Mortimer, O. 2009. *Salmonella*--the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. *Cell Microbiol*, 11(11), 1579-1586. doi:10.1111/j.1462-5822.2009.01368.x
- Itoh, T., Martin, W., y Nei, M. 2002. Acceleration of genomic evolution caused by enhanced mutation rate in endocellular symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 12944-12948.
- Jacobsen, A., Hendriksen, R. S., Aaresturp, F. M., Ussery, D. W., y Friis, C. 2011. The *Salmonella enterica* pan-genome. *Microb Ecol*, 62(3), 487-504. doi:10.1007/s00248-011-9880-1
- Jiménez, M., Martínez-Urtaza, J. and Chaidez, C. (2011). Geographical and Temporal Dissemination of Salmonellae Iso-lated from Domestic Animal Hosts in the Culiacan Valley, Mexico. *Microbial Ecology*, 61: 811-820.
- Jiménez, M., Martínez-Urtaza, J., Rodríguez-Alvarez, M.X., Leon-Felix, J. and Chaidez, C. (2014). Prevalence and genetic diversity of *Salmonella* spp. in a river in a tropical environment in Mexico. *Journal Of Water And Health*, 12(4):874-884.
- Kisiela, D. I., Chattopadhyay, S., Libby, S. J., Karlinsey, J. E., Fang, F. C., Tchesnokova, V., . . . Sokurenko, E. V. 2012. Evolution of *Salmonella enterica* virulence via point mutations in the fimbrial adhesin. *PLoS Pathog*, 8(6), e1002733. doi:10.1371/journal.ppat.1002733
- Kolodkin-Gal I, Engelberg-Kulka H. 2009. The stationary-phase sigma factor sigma(S) is responsible for the resistance of *Escherichia coli* stationary-phase cells to mazEF-mediated cell death. *J Bacteriol*. 191(9):3177-82. doi: 10.1128/JB.00011-09. Epub 2009 Feb 27. PMID: 19251848; PMCID: PMC2681799.
- Kuban, W., Banach-Orlowska, M., Schaaper, R. M., Jonczyk, P., y Fijalkowska, I. J. 2006. Role of DNA polymerase IV in *Escherichia coli* SOS mutator activity. *J Bacteriol*, 188(22), 7977-7980. doi:10.1128/JB.01088-06
- Kumar, S., Mukherjee, M. M., & Varela, M. F. (2013). Modulation of bacterial multidrug resistance efflux pumps of the major facilitator superfamily. *International journal of bacteriology*, 2013
- Laing, C. R., Whiteside, M. D., & Gannon, V. P. (2017). Pan-genome analyses of the species

*Salmonella enterica*, and identification of genomic markers predictive for species, subspecies, and serovar. *Frontiers in microbiology*, 8, 1345.

- Laufer, A. S., Grass, J., Holt, K., Whichard, J. M., Griffin, P. M., y Gould, L. H. 2015. Outbreaks of *Salmonella* infections attributed to beef --United States, 1973-2011. *Epidemiol Infect*, 143(9), 2003-2013. doi:10.1017/S0950268814003112
- Layton, J. C., y Foster, P. L. 2003. Error-prone DNA polymerase IV is controlled by the stress-response sigma factor, RpoS, in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 50(2), 549-561. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03704.x
- Levantesi, C., Bonadonna, L., Briancesco, R., Grohmann, E., Toze, S., y Tandoi, V. (2012). *Salmonella* in surface and drinking water: Occurrence and water-mediated transmission. *Food Research International*, 45(2), 587-602. doi:10.1016/j.foodres.2011.06.037
- Lin, M. T., y Beal, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443(7113), 787-795. doi:10.1038/nature05292
- Loewe, L. (2008). Genetic mutation. *Nature education*, 1, 1.
- Lopez Cuevas, O., Lepon Felix, J., Jiménez Edeza, M., y Chaidez, C. (2009). Detección y resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y *Salmonella* en agua y suelo agrícola. *Revista fitotecnica mexicana*, 32, 119-126.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000). Mutations affecting genome stability. In *Molecular Cell Biology*. 4th edition. WH Freeman.
- Lynch, M., Sung, W., Morris, K., Coffey, N., Landry, C. R., Dopman, E. B., ... & Thomas, W. K. (2008). A genome-wide view of the spectrum of spontaneous mutations in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(27), 9272-9277.
- Lynch, M. (2011). The lower bound to the evolution of mutation rates. *Genome Biol Evol*, 3, 1107-1118. doi:10.1093/gbe/evr066
- Lynch, M., Ackerman, M. S., Gout, J. F., Long, H., Sung, W., Thomas, W. K., y Foster, P. L. (2016). Genetic drift, selection and the evolution of the mutation rate. *Nat Rev Genet*, 17(11), 704-714. doi:10.1038/nrg.2016.104
- Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'Brien, S. J., . . . International Collaboration on Enteric Disease 'Burden of Illness, S. (2010). The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis*, 50(6), 882-889. doi:10.1086/650733
- Massey, R. C., & Buckling, A. (2002). Environmental regulation of mutation rates at specific sites. *Trends in microbiology*, 10(12), 580-584.
- Mastroeni, P., Morgan, F. J., McKinley, T. J., Shawcroft, E., Clare, S., Maskell, D. J., & Grant, A. J. (2011). Enhanced virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium after passage through mice. *Infection and immunity*, 79(2), 636-643.
- Medini, D., Donati, C., Tettelin, H., Massignani, V., & Rappuoli, R. (2005). The microbial pan-genome. *Current opinion in genetics & development*, 15(6), 589-594.
- Medrano-Félix, J. A., Castro-del Campo, N., Peraza Garay, F. D. J., Martínez-Rodríguez, C. I., & Chaidez, C. (2018). Carbon source utilization-based metabolic activity of *Salmonella*

Oranienburg and *Salmonella* Saintpaul in river water. *Water and Environment Journal*, 32(1), 118-124.

- Mienda BS, Shamsir MS. In silico deletion of PtsG gene in Escherichia coli genome-scale model predicts increased succinate production from glycerol. *J Biomol Struct Dyn*. 2015;33(11):2380-9. doi: 10.1080/07391102.2015.1036461. Epub 2015 Jun 8. PMID: 25921851.
- Moore, B. C., Martinez, E., Gay, J. M., y Rice, D. H. (2003). Survival of *Salmonella* enterica in freshwater and sediments and transmission by the aquatic midge Chironomus tentans (Chironomidae: Diptera). *Appl Environ Microbiol*, 69(8), 4556-4560. doi:10.1128/aem.69.8.4556-4560.2003
- Mower, J. P., Touzet, P., Gummow, J. S., Delph, L. F., y Palmer, J. D. (2007). Extensive variation in synonymous substitution rates in mitochondrial genes of seed plants. *BMC Evol Biol*, 7, 135. doi:10.1186/1471-2148-7-135
- Nakano, M., Yamasaki, E., Ichinose, A., Shimohata, T., Takahashi, A., Akada, J. K., . . . Kurazono, H. (2012). *Salmonella* enterotoxin (Stn) regulates membrane composition and integrity. *Dis Model Mech*, 5(4), 515-521. doi:10.1242/dmm.009324
- Nam, T. W., Jung, H. I., An, Y. J., Park, Y. H., Lee, S. H., Seok, Y. J., & Cha, S. S. (2008). Analyses of Mlc-IIBGlc interaction and a plausible molecular mechanism of Mlc inactivation by membrane sequestration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(10), 3751–3756. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709295105>
- Nohmi, T. (2006). Environmental stress and lesion-bypass DNA polymerases. *Annu Rev Microbiol*, 60, 231-253. doi:10.1146/annurev.micro.60.080805.142238
- Ohta K, Hamasuna H, Tsukamoto J, Wakiyama M, Izumi Y, Harada K. 2012. Disruption of ptsG gene and manXYZ operon of ethanol-producing Escherichia coli KO11: Effects on glucose and xylose utilization and ethanol production. *J Biosci Bioeng*. May;113(5):608-10. doi: 10.1016/j.jbiosc.2011.12.020. Epub 2012 Jan 30. PMID: 22284966.
- Organización Mundial de la Salud. (2018). *Salmonella* (no tifoidea). [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)).
- Palchevskiy, V., & Finkel, S. E. (2006). Escherichia coli competence gene homologs are essential for competitive fitness and the use of DNA as a nutrient. *Journal of bacteriology*, 188(11), 3902–3910.
- Pal, C., Maciá, M. D., Oliver, A., Schachar, I., & Buckling, A. (2007). Coevolution with viruses drives the evolution of bacterial mutation rates. *Nature*, 450(7172), 1079-1081.
- Pasqua, M., Grossi, M., Zennaro, A., Fanelli, G., Micheli, G., Barras, F., ... & Prosseda, G. (2019). The varied role of efflux pumps of the MFS family in the interplay of bacteria with animal and plant cells. *Microorganisms*, 7(9), 285.
- Popoff, M. Y., & Le Minor, L. (1997). Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars.
- Popoff, M. Y., & Le Minor, L. E. (2015). *Salmonella*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-1.
- Rahman M, Hasan MR, Oba T, Shimizu K. Effect of rpoS gene knockout on the metabolism of Escherichia coli during exponential growth phase and early stationary phase based on gene

- expressions, enzyme activities and intracellular metabolite concentrations. *Biotechnol Bioeng.* 2006 Jun 20;94(3):585-95. doi: 10.1002/bit.20858. PMID: 16511888.
- Reva, B., Antipin, Y., y Sander, C. (2011). Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics. *Nucleic Acids Res*, 39(17), e118. doi:10.1093/nar/gkr407
- Sánchez-Vargas, F. M., Abu-El-Haija, M. A., y Gomez-Duarte, O. G. (2011). *Salmonella* infections: an update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Med Infect Dis*, 9(6), 263-277. doi:10.1016/j.tmaid.2011.11.001
- Seligmann, H. and D.D. Pollock, The ambush hypothesis: hidden stop codons prevent off-frame gene reading. *DNA Cell Biol*, 2004. 23(10): p. 701–5.
- Shelobolina, E. S., Sullivan, S. A., O'Neill, K. R., Nevin, K. P., & Lovley, D. R. (2004). Isolation, characterization, and U (VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant Bacterium from Low-pH, nitrate-and U (VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. *Applied and environmental microbiology*, 70(5), 2959-2965.
- Simental, L., y Martinez-Urtaza, J. (2008). Climate patterns governing the presence and permanence of *Salmonellae* in coastal areas of Bahia de Todos Santos, Mexico. *Appl Environ Microbiol*, 74(19), 5918-5924. doi:10.1128/AEM.01139-08
- Sloan, D. B., Oxelman, B., Rautenberg, A., & Taylor, D. R. (2010). Erratum to: Phylogenetic analysis of mitochondrial substitution rate variation in the angiosperm tribe Sileneae. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 1-1.
- Söderberg, R. J., & Berg, O. G. (2011). Kick-starting the ratchet: the fate of mutators in an asexual population. *Genetics*, 187(4), 1129-1137.
- Spector, M. P., & Kenyon, W. J. (2012). Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Research International*, 45(2), 455-481.
- Sugumar, G., y Mariappan, S. (2003). Survival of *Salmonella* sp. in Freshwater and Seawater Microcosms Under Starvation.pdf. *Asian Fisheries Science*, 16, 247-256.
- Sun, D., Zhang, X., Wang, L., Prudhomme, M., Xie, Z., Martin, B., et al. (2009). Transforming DNA uptake gene orthologs do not mediate spontaneous plasmid transformation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 191, 713–719. doi: 10.1128/JB.01130-08
- Sung, W., Ackerman, M. S., Miller, S. F., Doak, T. G., y Lynch, M. (2012). Drift-barrier hypothesis and mutation-rate evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(45), 18488-18492. doi:10.1073/pnas.1216223109
- Tanner, J. R., & Kingsley, R. A. (2018). Evolution of *Salmonella* within Hosts. *Trends in microbiology*, 26(12), 986–998. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.06.001>
- Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V. F., y Hengge, R. (2005). Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J Bacteriol*, 187(5), 1591-1603. doi:10.1128/JB.187.5.1591-1603.2005
- Winfield, M. D., y Groisman, E. A. (2003). Role of Nonhost Environments in the Lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 3687-3694. doi:10.1128/aem.69.7.3687-3694.2003

Wolfe, K. H., Li, W., y Sharp, P. M. (1987). Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84, 9054-9058.

Zinser, E. R., & Kolter, R. (1999). Mutations enhancing amino acid catabolism confer a growth advantage in stationary phase. *Journal of bacteriology*, 181(18), 5800–5807. <https://doi.org/10.1128/JB.181.18.5800-5807.1999>