Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

Caracterización de bacterias halotolerantes aisladas del proceso de salado madurado de *Engraulis ringens* "Anchoveta" en el periodo de marzo a octubre 2017

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Microbiología

AUTOR

Roxana Esther CÉSPEDES CHOMBO

ASESOR

Dra. Amparo Iris ZAVALETA PESANTES

Lima, Perú

2022

Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Céspedes R. Caracterización de bacterias halotolerantes aisladas del proceso de salado madurado de *Engraulis ringens* "Anchoveta" en el periodo de marzo a octubre 2017 [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2022.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Roxana Esther Cespedes Chombo
Tipo de documento de identidad	DNI
Numero de documento de identidad	43150727
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-5898-9128
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Amparo Iris Zavaleta Pesantes
Tipo de documento de identidad	DNI
Numero de documento de identidad	17880045
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-3844-7185
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	María Elena Salazar Salvatierra
Tipo documento de identidad	DNI
Numero de documento de identidad	08675623
Miembro del jurado I	
Nombres y apellidos	Nelson Bautista Cruz
Tipo documento de identidad	DNI
Numero de documento de identidad	10260086
Miembro del jurado II	
Nombres y apellidos	Jorge Luis López Bulnes
Tipo documento de identidad	DNI
Numero de documento de identidad	08153969
Datos de Investigación	
Línea de investigación	6.Microorganismos de interés sanitario, industrial, ambiental y bioprocesos. Enzimas y fermentaciones.

	ODS 12: Producción Y Consumos Responsables
Grupo de investigación	Biomias
Agencia de financiamiento	Perú. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (Fondecyt). CONVENIO DE SUBVENCIÓN N°226-2015-FONDECYT
Ubicación geográfica de lainvestigación	Instituto Tecnológico de la Producción País: Perú Departamento: Callao Provincia: Callao Distrito: Ventanilla Latitud: -11.8967006 Longitud: -77.1263371
Año o rango de años en que serealizó la investigación	Marzo 2017- Marzo 2020
URL de disciplinas OCDE	Biología celular, Microbiología http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01

ACTA DE SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN MICROBIOLOGÍA

Siendo las **17:00 hrs. Del 13 de junio de 2022** se reunieron mediante la plataforma de Google Meet de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Evaluador de tesis, presidido por la Dra. María Elena Salazar Salvatierra e integrado por los siguientes miembros: Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes (Asesora), Dr. Jorge Luis López Bulnes y Mg. Nelson Bautista Cruz; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada **"Caracterización de bacterias halotolerantes aisladas del proceso de salado madurado de *Engraulis ringens* "Anchoveta" en el periodo de marzo a octubre 2017"**, presentado por la Bachiller en Biología **Roxana Esther Céspedes Chombo.**

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Microbiología**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduanda.

A continuación, el Jurado Evaluador de tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

……**DIECISIETE (17) MUY BUENO** ……

Luego, la Presidenta del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue a la Bachiller en Biología **Roxana Esther Céspedes Chombo,** el Grado Académico de Magister en **Microbiología**.

Siendo las 18:45 hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las 18:50 hrs. del 13 de junio de 2022.

……
Dra. María Elena Salazar Salvatierra (P.P., T.C.)
Presidenta

……
Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes (P. P, T.C.)
Miembro - Asesora

……
Mg. Nelson Bautista Cruz (P. Asoc. T.C.)
Miembro

……
Dr. Jorge Luis López Bulnes (P. Asoc, T.C.)
Miembro

Observaciones:
……

A mi hija Camila, quien es mi motor de vida,
a quien amo con todas mis fuerzas.
A mis padres, quienes me apoyan en toda
mi carrera profesional y vida personal.
A José Carlos Silva Aburto, el amor de mi vida,
quien me apoya en todo lo que emprenda
y está a mi lado siendo mi soporte.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Amparo Zavaleta Pesantes, asesora de la presente investigación, por su apoyo constante en el desarrollo de la tesis, aclarándome mis ideas y por confiar en mí en todo momento. Gracias por haberme brindado su tiempo.

Al Mg. Sc. Miguel Albrecht, por haber aceptado mi participación en el proyecto de investigación N° 226-2015-FONDECYT, por incentivarme a crecer profesionalmente y por su gran amistad.

Al Instituto Tecnológico de la Producción (ITP), en especial al Laboratorio de Microbiología, por haberme dado las facilidades para el desarrollo de la tesis en marco del proyecto N° 226-2015-FONDECYT.

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), en especial al Laboratorio de Biología Molecular - Facultad de Farmacia y Bioquímica, por haberme brindado las facilidades para el desarrollo de la parte experimental molecular.

INDICE

INDICE .....
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS .....
RESUMEN .....
ABSTRACT .....
CAPITULO I. INTRODUCCION 1
CAPITULO II. MARCO TEORICO 3
2.1. Antecedentes de la investigación 3
2.1.1. Proceso de elaboración de anchoa salada madurada 3
2.1.2. Microbiota presente durante el proceso salado-madurado 4
2.1.3. Identificación molecular de bacterias 6
2.2. Aspectos teóricos 7
2.2.1. Características biológicas de *Engraulis ringens* "Anchoveta" 7
2.2.2. Distribución de la anchoveta 8
2.2.3. Alimentación de la anchoveta 8
2.2.4. Edad, crecimiento y reproducción de la anchoveta 8
2.2.5. Elaboración de anchoas salada madurada 10
2.2.6. Exportación de anchoas 10
2.2.7. Inocuidad 11
2.2.8. Microorganismos halotolerantes 12
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA 13
3.1. Lugar de ejecución 13
3.2. Recolección de materia prima 13
3.3. Metodología experimental 13
3.3.1. Procesamiento de la muestra para la enumeración de bacterias: ligeramente halófilas, halófilas moderadas y extremas 13
3.3.2. Aislamiento de las bacterias halotolerantes 14
3.3.3. Morfología celular 15
3.3.4. Pruebas bioquímicas 15
3.3.5. Prueba de tolerancia salina 18
3.3.6. Rango de temperatura de crecimiento 18
3.3.7. Pruebas de hidrólisis de sustratos 18
3.3.8. Prueba de sensibilidad antimicrobiana 19
3.3.9. Caracterización molecular 19

CAPITULO IV. RESULTADOS 21
4.1. Enumeración de bacterias halotolerantes, halófilas ligeras, moderadas y extremas 21
4.2. Pruebas fisiológicas e identificación bioquímica 22
4.3. Prueba de tolerancia salina y rango de temperatura de crecimiento 25
4.4. Pruebas de hidrólisis de sustratos 26
4.5. Prueba de sensibilidad antimicrobiana 26
4.6. Caracterización molecular 29
CAPITULO V. DISCUSIÓN 30
CAPITULO VI. CONCLUSIONES 36
CAPITULO VII.- RECOMENDACONES 37
CAPITULO VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 38

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Anchoveta (*Engraulis ringens*)

Figura 2. Tolerancia salina (a) y térmica (b) de bacterias halotolerantes aisladas del proceso salado madurado de anchovetas provenientes de Chimbote.

Figura 3. Recuento de bacterias halotolerantes con sensibilidad antimicrobiana aisladas del proceso salado madurado de anchovetas procedentes de Chimbote.

Tabla 1. Recuento de bacterias halotolerantes en anchoveta en salazón durante el año 2017, Chimbote, Perú.

Tabla 2. Identificación fenotípica y bioquímica de las bacterias halotolerantes aisladas de anchoveta en salazón durante el año 2017, Chimbote, Perú

Tabla 3. Sensibilidad antimicrobiana de bacterias halotolerantes aisladas de anchoveta en salazón durante el año 2017, Chimbote, Perú.

Tabla 4. Perfiles de sensibilidad de bacterias halotolerantes aisladas de anchovetas en salazón durante el año 2017, Chimbote, Perú.

Tabla 5. Porcentaje de similitud de la secuenciación parcial de los genes ribosómicos 16S de bacterias halotolerantes aisladas de anchovetas en salazón.

RESUMEN

En Perú, *Engraulis ringens* "Anchoveta" es utilizada para la producción de "anchoas", las cuales se comercializan en barriles o como semiconservas. Un factor determinante para la calidad de la materia prima y del producto final es la manipulación del pescado después de la captura y la exposición a temperaturas inadecuadas, lo cual promueve el incremento de la actividad microbiana, siendo éste un riesgo para el consumidor ya que puede presentar enfermedades transmitidas por alimentos contaminados. El objetivo del presente estudio fue identificar las bacterias halotolerantes aisladas del proceso salado madurado de *Engraulis ringens* "Anchoveta" de Chimbote, Perú en el periodo marzo - octubre del 2017. De dos barrilles del proceso de salado madurado se aislaron 14 bacterias, utilizando el medio Tripticasa Soya, que presentaron diferencias en la formación de la colonia tanto en color, tamaño, forma y consistencia. Después, a cada bacteria se determinó la capacidad de crecimiento a concentraciones de NaCl al 2,5%, 5%, 10%, 15% y 20% y diferentes temperaturas; además se realizaron las pruebas de oxidasa, ureasa, indol, utilización de citrato, descarboxilación de lisina, ornitina y arginina; y fermentación de arabinosa, manitol, esculina, glucosa, sacarosa, salicina, lactosa y manosa; hidrólisis de almidón, caseína y gelatina; asimismo, pruebas de sensibilidad frente a 9 antibióticos comerciales, siendo la cepa más resistente BH14 . La caracterización genotípica se realizó amplificando los genes ribosómicos bacterianos 16S, los que se secuenciaron y analizaron mediante los programas Bioedit y BlastN. De los análisis se determinó que las bacterias son halotolerantes, presentan diversos perfiles de fermentación de carbohidratos y se identificaron 8 perfiles de sensibilidad antimicrobiana. Las bacterias aisladas del proceso salado madurado de *E. ringens* pertenecen a los géneros: *Bacillus (2)*, *Staphylococcus (6)*, *Salinococcus* (1), *Oceanobacillus (1)*, *Psychrobacter (*2) y *Sporosarcina* (2). La presencia de cepas de estafilococos indica la necesidad de implementar medidas que garanticen la inocuidad de las anchoas.

Palabras clave: *Engraulis ringens*, anchoas, bacterias halotolerantes, pescado salado madurado

ABSTRACT

In Peru, *Engraulis ringens* "Anchoveta" is used for the production of "anchovies", which are marketed in barrels or as semi-preserves. A determining factor for the quality of the raw material and the final product is the handling of the fish after capture and exposure to inadequate temperatures, which promotes the increase in microbial activity, this being a risk for the consumer since it can disease transmitted by contaminated food. The objective of the present study was to identify halotolerant bacteria isolated from the matured salting process of *Engraulis ringens* "Anchoveta" from Chimbote, Peru in the period March - October 2017. From two barrels of the matured salting process, 14 bacteria were isolated, using the Trypticase Soya medium, which presented differences in the formation of the colony in color, size, shape and consistency. Then, each bacterium's growth capacity was determined at NaCl concentrations of 2.5%, 5%, 10%, 15% and 20% and different temperatures; In addition, oxidase, urease, indole, citrate utilization, lysine, ornithine and arginine decarboxylation tests were performed; and fermentation of arabinose, mannitol, esculin, glucose, sucrose, salicin, lactose and mannose; hydrolysis of starch, casein and gelatin; likewise, sensitivity tests against 9 commercial antibiotics, the most resistant strain being BH14. Genotypic characterization was performed by amplifying the 16S bacterial ribosomal genes, which were sequenced and analyzed using the Bioedit and BlastN programs. From the analyses, it was determined that the bacteria are halotolerant, present diverse carbohydrate fermentation profiles and 8 antimicrobial sensitivity profiles were identified. The bacteria isolated from the matured salt process of *E. ringens* belong to the genera: *Bacillus* (2), *Staphylococcus* (6), *Salinococcus* (1), *Oceanobacillus* (1), *Psychrobacter* (2) and *Sporosarcina* (2). The presence of staphylococci strains indicates the need to implement measures that guarantee the safety of anchovies.

Key words: *Engraulis ringens*, anchovies, halotolerant bacteria, matured salted fish

CAPITULO I. INTRODUCCION

El proceso de salado madurado de anchoas es una práctica tradicional en muchos países, especialmente mediterráneos, cuya finalidad es proteger el pescado para una mayor duración. En Sudamérica, países como Perú, Argentina, Uruguay y Brasil utilizan especies como *Engraulis rigens* y *E. anchoíta* para realizar este proceso. (1).

El Programa Nacional de Innovación en Pesca y Acuicultura, señala que la "anchoveta" *Engraulis rigens* es una especie pelágica de gran importancia en la industria pesquera del Perú, principalmente utilizada para la producción de harina y aceite de pescado. Sin embargo, durante los últimos años se viene incrementando la producción de anchoas procesadas, las cuales son comercializadas en barriles o como semi conservas.

La microbiota del proceso de salado madurado de productos marinos está compuesta por bacterias, hongos y arqueas. Además, los pescados de aguas templadas presentan bacterias Gram negativas y bacilos psicrófilos, pertenecientes a los géneros *Pseudomonas, Alteromonas, Moraxella, Acinetobacter, Flavobacterium y Vibrio.* (2)

El aislamiento e identificación de las bacterias halotolerantes de *Engraulis ringens* "anchoveta" en el proceso salado madurado permite determinar su participación en la conservación o deterioro del producto, ya que su alto contenido de sal y baja actividad de agua son condiciones que alteran el desarrollo de bacterias patógenas y deteriorantes típicas del pescado fresco, siendo éste tipo de productos vulnerados, ya que generan pérdidas provocadas por problemas de deterioro y/o inocuidad. Cabe señalar que la presencia de bacterias es un indicador no solo del deterioro en éste tipo de productos, sino que modifica los caracteres sensoriales (color y olor), y de ésta forma disminuye el rendimiento y el tiempo de vida útil. (2) Es por ésta razón que, los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis serán de utilidad para conocer la microbiota de éste tipo de productos y servirán como indicadores para otros tipos de alimentos salados y madurados que tengan las mismas características de elaboración.

El objetivo principal del presente estudio fue caracterizar las bacterias halotolerantes de *Engraulis ringens* “anchoveta” aisladas del proceso de salado madurado entre marzo a octubre del 2017.

Los objetivos específicos son:

a.-Aislar bacterias de *Engraulis ringens* “anchoveta” durante el proceso de salado madurado entre marzo a octubre del 2017.

b.-Determinar las características fenotípicas de las bacterias aisladas de *Engraulis ringens* “anchoveta” durante el proceso de salado madurado entre marzo a octubre del 2017.

c.-Realizar la identificación genotípica de bacterias de *Engraulis ringens* “anchoveta” durante el proceso de salado madurado entre marzo a octubre del 2017.

CAPITULO II. MARCO TEORICO

2.1. Antecedentes de la investigación

2.1.1. Proceso de elaboración de anchoa salada madurada

Hernández-Herrero et al. (1) señalaron que el pescado salado madurado es uno de los productos con mayor disponibilidad en los mercados de todo el mundo. El arenque (*Clupea harengus*), anchoa (*Engraulis encrasicholus*) y espadín (*Clupea sprattus*) son especies utilizadas para producir estos productos en países europeos, mientras que en Latinoamérica se utilizan especies como la anchoa (*Engraulis anchoíta*) y la anchoveta (*Engraulis ringens*). Además, los autores indican que la salazón de pescados es un proceso que puede dividirse en dos etapas. La primera incluye la difusión de la sal en el pescado y el descarte del agua y la segunda es lenta e implica la maduración, que consiste en una serie de procesos bioquímicos complejos, los cuales podrían agruparse de manera general en proteólisis, lipólisis y oxidación de lípidos.

Pérez S. (2) manifestó que el proceso de salazón en el pescado es un método remoto de conservación usado, como alternativa para mantener este tipo de muestras de alimentos. La alta concentración de cloruro de sodio en el pescado sugiere una transferencia osmótica, lo cual conlleva a la deshidratación de la carne del pescado evitando que el producto se deteriore.

Pérez et al. (3) sostuvieron que la salazón y la maduración son prácticas utilizadas para la conservación de diferentes especies pelágicas pequeñas. Además, indican que este tipo de productos tienen una consistencia firme, coloración rojiza, textura jugosa y un olor y sabor característicos a consecuencia de los cambios fisicoquímicos y enzimáticos que se producen durante la maduración, la cual conlleva desde semanas hasta años, depende del tipo de producto.

Czerner y Yeannes (4) determinaron que el proceso de maduración está dominado por bacterias halófilas moderadas. A su vez señalan que estas bacterias desempeñan un rol importante en los cambios sensoriales típicos de estos productos. Asimismo, Kristín (5) sostuvo que la cantidad de sal en el proceso de salazón permite clasificar a los productos en altos en sal cuando contienen más de 20% del peso total, bajos del 6 a 8%, y sin sal.

Kristbergsson y Oliveira (6) señalaron que la sal común usada como agente preservante tiene la característica de impedir y suprimir algunos microorganismos, pero su textura es húmeda, conteniendo bacterias, hongos e impurezas; los cuales pueden contaminar al producto con apariencia de coloraciones rojizas, presencia de bacterias halófilas o halotolerantes, malos olores y presencia de mohos, acortando el tiempo de vida útil.

2.1.2. Microbiota presente durante el proceso salado-madurado

CODEX (7) señaló que la sal comercial puede contener bacterias, mohos o arqueas halófilas, los cuales permanecen viables, constituyendo un riesgo para la calidad e inocuidad de los pescados salados.

Escobar y Hernández (8) reportaron altos recuentos de *Escherichia coli, Staphylococcus aureus y Salmonella spp, en* sardina seca-salada procesada artesanalmente. Los resultados obtenidos fueron superiores al límite máximo permisible de la normativa correspondiente, concluyendo que estos productos no eran aptos para el consumo.

Mustafa (9) estudió un producto tradicional de pescado fermentado, natural de Arabia Saudita. Determinó las características microbiológicas de 24 muestras de pescado salado en diferentes épocas del año. Las principales especies aisladas e identificadas fueron *Bacillus subtilus, B. mycoides, B. licheniformis, B. pumilus, Staphylococcus aureus, S. epidermidis, S. hominis, S. xylosus* y *Staphylococus spp*. Además, el autor señaló que no detectaron bacterias patógenas tales como *Listeria monocytogenes, Vibrio spp., Campylobacter spp*. o *Yersinia*.

Pérez et al. (3) estudiaron las bacterias halófilas de anchoas (*Engraulis anchoíta*) del tipo salado madurado y fueron comparados con anchoas frescas. Además, realizaron recuentos microbianos durante el proceso, así determinaron variaciones en los resultados. Sin embargo, no encontraron bacterias halófilas en las muestras frescas.

Takashi et al. (10) evaluaron la presencia de bacterias halófilas en 17 tipos de productos pesqueros salados. El recuento de bacterias se realizó utilizando medios de cultivo con diferentes concentraciones de NaCl (entre 0 a 20%). El género predominante en los productos fermentados fue *Tetragenococcus*, considerado un lactococo moderadamente halófilo.

Tanasupawat et al. (11) aislaron 41 bacterias moderadamente halófilas a partir de muestras de pescado fermentado tailandés. De acuerdo con sus características fenotípicas, quimiotaxonómicas y a los ensayos de secuencias de genes ARN 16S, estos

microrganismos se dividieron en seis grupos. Las cepas identificadas fueron *Virgibacillus dokdonensis, V. halodenitrificans*, *V. marismortui, Virgibacillus sp*, *Bacillus vietnamnensis y Chromohalobacter salexigens*.

Wattimena et al. (12) evaluaron el efecto de la concentración de sal sobre el crecimiento de bacterias en "Ina sua", pescado salado típico de Tailandia. Se probaron concentraciones de NaCl de 0%, 20% y 30%. Los resultados indicaron que hubo un crecimiento menor a NaCl 30%, en comparación a las concentraciones de 20% y 10%. Además, señalan que las bacterias halotolerantes identificadas en este producto fueron *Bacillus sp*, *Leuconostoc sp.* y *Lactobacillus.*

Félix et al. (13) evaluaron la incidencia de *Halococcus morrhuae* en filetes de anchoas saladas maduradas. Las muestras utilizadas fueron recolectadas de barriles al final del proceso de maduración, a las cuales se realizaron recuentos microbianos y el aislamiento bacteriano. Así, los investigadores determinaron que algunas cepas fueron *H. morrhuae*, y otras podrían pertenecer al género *Halocuccus.* Las bacterias aisladas presentaron actividad proteolítica, lipolítica, descarboxilación de aminoácidos y producción de indol e H_2S.

Jung et al. (14) señalaron que se han identificado diversas bacterias halófilas o halotolerantes como *Lentibacillus, Alkalibacillus, Halomonas*, *Halobacterium, Staphylococcus, Halanaerobium* y *Tetragenococcus* en productos obtenidos a partir de la fermentación de la anchoveta (*Engraulis japonicus*) en Korea.

Czerner y Yeannes (4) caracterizaron las poblaciones bacterianas que se desarrollan durante el proceso de maduración del pescado. Además, evaluaron la posible implicancia de estas bacterias en los cambios sensoriales característicos de estos productos. Los resultados obtenidos indicaron una predominancia de bacterias halófilas moderadas durante el proceso de maduración. Así mismo, la mayoría de las cepas aisladas mostraron actividades proteolíticas, lipolíticas y oxidación de trimetilamina (TMAO) reductasa; estas actividades contribuyen al desarrollo del sabor típico de este producto.

Belfiore et al. (15) identificaron y caracterizaron *Lactobacillus* aislados de anchoas frescas (*Engraulis anchoíta*). Estas cepas exhibieron actividad catalasa, fermentaron melibiosa, aunque sólo 10 de las 14 cepas hidrolizaron arginina. Además, se aisló una cepa de *L. curvatus*, la cual mostró sensibilidad al cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina y a su vez presentó alta tolerancia al NaCl entre 10 % al 18%. Estas cepas de *Lactobacillus* identificadas en anchoas frescas podrían ser utilizadas como cultivo iniciador, con la

finalidad de controlar la fermentación de anchoas y garantizar productos con las mismas características organolépticas.

El Filali et al. (16) estudiaron la microbiota mesófila, halófila, láctica y enterobacteriana de anchoas semi conservadas en aceite y sal. La evaluación se realizó por un periodo de 12 meses y a las temperaturas de 4 y 30 °C. Las enterobacterias y los lactobacilos no soportaron las concentraciones salinas, después de un mes de almacenamiento no se lograron identificar. Además, las anchoas semi conservadas se deterioraron con facilidad durante el almacenamiento, ya que la fragilidad de las anchoas y la presencia de bacterias formadoras de histamina contribuyen a la alteración del producto

Hernández-Herrero et al. (1) identificaron bacterias halotolerantes y halófilas productoras de histamina en anchoas. Las especies identificadas en su mayoría pertenecen al género *Staphylococcus* (*S. epidermis* y *S. capitis).* Señalaron, además, que la presencia de estas especies podría ser consecuencia de la contaminación del pescado durante la captura y su posterior manipulación en condiciones no higiénicas.

2.1.3. Identificación molecular de bacterias

Estos microorganismos presentaron genes codificantes de proteínas estructurales que actúan como marcadores filogenéticos específicos. Entre estos marcadores, los genes de ARNr como el 5S, 16S, 23S se pueden utilizar para análisis filogenéticos. Sin embargo, el gen de ARNr 16S se ha convertido en el marcador más confiable y utilizado para la clasificación taxonómica y filogenética de microorganismos.

Pascual et al. (17) indicaron que la identificación de bacterias por métodos moleculares es importante pero costoso, por tal razón solo en algunos estudios se utiliza la técnica del gen ARNr 16S para identificar diversos géneros y especies.

Belfiore et al. (15) identificaron y caracterizaron *Lactobacillus* mediante la secuenciación parcial del gen ARNr 16S, aislado previamente de anchoveta (*Eugralis anchoíta*). Identificaron 15 bacterias del grupo *Lactobacillus sakei y Lactobacillus curvatus*, las cuales presentaron una similitud del 97% al 99% en comparación con el Genbank.

Pulache (18) determinaron mediante técnicas moleculares, utilizando el gen ARNr 16S, la presencia de bacterias en caballa. Estos resultados fueron cotejados en el Genbank, presentaron una similitud del 98% y 100% para las especies: *Halomonas sp, Staphylococcus sp., St. equorum, Salinivibrio sp., St. nepalensis*.

Oishi et al. (19) analizaron 105 muestras de pescados fermentados con sal (caballa, anchoas, entre otros) y se aislaron 1635 colonias, de las cuales 1198 fueron arqueas y 437 bacterias, estos resultados se obtuvieron utilizando la técnica del gen ARNr 16S.

2.2. Aspectos teóricos

2.2.1. Características biológicas de *Engraulis ringens* "Anchoveta"

La "Anchoveta" es pez pelágico, de 20 cm de longitud en promedio, además tiene el cuerpo alargado y estrecho. Cabeza alargada y con ojos voluminosos. El color de su piel es azul verdoso y plateado en su parte dorsal y ventral respectivamente. (Figura 1). Su habitad son aguas frías 16-23°C en estación de verano y 14-18°C en invierno (20).

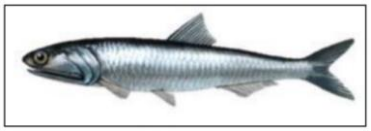

Figura 1: Anchoveta (*Engraulis ringens*). IMARPE (20)

De acuerdo a IMARPE (20), clasificación de la "Anchoveta":

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Clase: Actinopterygii

Orden: Clupeiformes

Familia: Engraulidae

Nombre científico: *Engraulis ringens* Jenyns (1842)

Nombre común: Anchoveta, Peladilla (juveniles)

Nombre en inglés: Peruvian anchovy

Nombre FAO: Anchoveta Peruana

La "Anchoveta" tiene sexos separados (hembra y macho), alcanza su madurez sexual a los 12 cm y se reproduce mediante huevos; el macho fertiliza el huevo en el agua, de esta

forma el embrión no crece en el vientre de la hembra. Durante las estaciones de invierno y verano existe mayor desove, en relación a todo el año (20).

La “Anchoveta” es rica en proteínas, es fuente de minerales, tales como potasio, hierro, fósforo y calcio. Contiene además vitaminas y ácidos grasos poliinsaturados, por estas características además de la composición lipídica es beneficiosa para la salud y debería ser incluido en la dieta frecuente (21).

2.2.2. Distribución de la anchoveta

Existen dos poblaciones de anchovetas en el mar del Perú; en el norte-centro (04°30´S-16°01´S) y entre Perú y Chile hasta 16°01´24°00´S. El primero la región norte-centro del litoral peruano, la amplitud de la plataforma continental y la variabilidad de las corrientes del frente ecuatorial, originan que la distribución de la anchoveta sea más amplia (20).

La distribución de la población de la anchoveta es muy variable, ya que está relacionada por la cantidad y calidad de su alimento disponible por las variaciones climáticas como por ejemplo el fenómeno del niño costero y por sus predadores (22).

2.2.3. Alimentación de la anchoveta

La “Anchoveta” como una especie filtradora que se alimenta principalmente de fitoplancton, pero que también consume zooplancton, calificándola como omnívora (23).

Las “Anchovetas” se alimentan de fitoplancton y zooplancton, representando este último entre el 80-95% de su dieta, siendo los eufásidos el alimento más importante seguido de los copépodos (24).

La “Anchoveta”, como un recurso marino muy importante, ya que es uno de los eslabones de la cadena trófica de Humboldt. Además, se alimenta de organismos planctónicos sirve de alimento de peces de mayor de tamaño, estos a su vez de mamíferos acuáticos y aves marinas (25).

2.2.4. Edad, crecimiento y reproducción de la anchoveta

La “Anchoveta” es una especie de crecimiento rápido y vida corta, con una longevidad entre 3 y 4 años, además es pelágica y desova todo el año, encontrándose en diferentes

estados gonadales, presentando dos periodos de máxima intensidad reproductiva, los cuales son en primavera y verano (20).

La “Anchoveta” desova a lo largo del litoral peruano, siendo las más notables en el sur desde Chicama a Chimbote y en el norte-centro desde Callao a Pisco (26).

El ambiente influye en el proceso de maduración y desove de la anchoveta. Siendo capaz de modificar su estrategia reproductiva e intensidad de desove dependiendo del entorno (27).

Las etapas tempranas de vida de esta especie están sujetas a las variaciones de las condiciones ambientales. Demostrando, que el tamaño del huevo, la longitud de las larvas al momento de la eclosión y el volumen del saco vitelino de las larvas recién nacidas, aumentan con la latitud y varían entre diferentes poblaciones (28).

El efecto de la temperatura fue reportado para dos poblaciones de anchoveta peruana. Evidenciando, una mayor fecundidad de los ovocitos para la población del Norte de Chile en comparación, con la del Sur (29).

La composición de los oligoelementos presentes en los otolitos se ha convertido en una herramienta común y eficaz para identificar la heterogeneidad de las poblaciones, patrones migratorios y diferenciar las poblaciones de peces. Esta técnica se basa en el hecho de que los otolitos se originan durante la etapa embrionaria y crecen continuamente a lo largo de la vida del pez. A medida que crecen, los otolitos muestran patrones característicos de composición morfológica y química. El crecimiento de otolitos que ocurrió durante la etapa larvaria pelágica se puede distinguir del crecimiento durante el período juvenil o adulto posterior (30).

Los micro incrementos en los otolitos de las larvas de peces están relacionados con la edad, crecimiento, mortalidad e historia de vida temprana, debido a que se depositan diariamente (31).

Las tasas de crecimiento diario de la “Anchoveta” oscila entre 1,2 y 1,3 mm para juveniles <12 cm de longitud total. Además, los especímenes de 8 a 12 cm cuyas edades eran entre 56 y 166 días y representaban a los sobrevivientes del desove que había ocurrido 3-4 meses antes. A partir de esta evidencia, es razonable inferir que algunas especies de anchoveta tienden a maximizar el crecimiento durante el primer año de vida (32).

2.2.5. Elaboración de anchoas salada madurada

Los procesos de elaboración de anchoas, en el proceso salado-madurado generó alteraciones en el perfil de ácidos grasos y composición proximal (33).

Los productos como las anchoas del salado madurado pueden considerarse como conservas. La estabilidad comercial está dada por los bajos valores de la actividad de agua y altos valores de cloruro de sodio, lo que crea un ambiente desfavorable para el desarrollo microbiano (33).

Las anchoas del proceso de salado madurado se preservan por las concentraciones de sal entre14 % a 20% p/p y actividad de agua de 0,75. Debido a estas condiciones se previene el incremento de microorganismos patógenos y de descomposición. A su vez este proceso permite el crecimiento de microbiotas autóctonas halófilas o halos tolerantes, las cuales crecen en ambientes hipersalinos (3).

2.2.6. Exportación de anchoas

PROMPERÚ, en el informe "*Desenvolvimiento del comercio exterior pesquero y acuícola en Perú*" (34) indicó que la anchoveta es la principal especie en las exportaciones pesqueras. La mayor parte de la extracción de anchoveta es utilizada principalmente para la producción de harina y aceite de pescado.
La "Anchoveta" en el Perú es la principal especie exportada, en forma de harina y aceite de pescado. Por otro lado, en los últimos años se incrementó la elaboración de "anchoas" en barriles o semiconservas (35).

El Perú se caracteriza por elaborar semiconservas de anchoas en salazón al mundo, pero los productos en barriles y filetes de anchoas ocupan el octavo lugar en producción. Las empresas que destacan en la elaboración de estos productos son PRISCO SAC, Anchoveta SAC y Compañía Americana de Conservas SAC (34).
En el 2018 el Perú exportó 22 millones de dólares en conservas de anchoas enteras o en trozos. Ubicándose así en el segundo lugar dentro del ranking de los 10 primeros exportadores de este producto (36).

2.2.7. Inocuidad

Los productos pesqueros con frecuencia están asociados a algunas enfermedades, por lo que resulta importante garantizar la inocuidad de estos productos, así como los ambientes en los que estos se elaboran (37).

El principal objetivo de la industria pesquera de alimentos es proporcionar productos sanos y aceptables para el consumidor. Consideran que el control de microorganismos ejercido a través de altos estándares de higiene, una limpieza eficiente y las prácticas de desinfección durante los procedimientos de procesamiento y conservación, son primordiales para el cumplimiento de este objetivo (38).

Los microorganismos juegan un papel importante en la inocuidad de los productos pesqueros. A su vez la presencia de patógenos humanos, así como bacterias productoras de histamina, hacen que el control de microorganismos sea un punto crítico para la inocuidad de los productos pesqueros (39).

El aumento de los estándares de higiene y el uso de nuevas tecnologías afectan la composición de la microflora que se desarrolla en el pescado. El conocimiento actual permite el uso de tecnologías que restringen drásticamente el desarrollo microbiano (40).

La contaminación de los productos pesqueros en la etapa de post captura está relacionada a prácticas de manejo antihigiénico, mala calidad del agua y hielo, los cuales son puntos críticos en la calidad del producto final. Por ello, la FAO (42) señala que el agua utilizada en los procesos de comercialización debe ser potable y protegida de toda contaminación (41).

La Norma Técnica Peruana 204.056.2013 describió los criterios máximos permisibles para el consumo y comercialización de anchoas en salazón y envasadas. Los parámetros considerados son: recuento de aerobios mesófilos ($1x10^5$ UFC/g); anaerobios sulfito-reductores ($1x10^4$ UFC/g); levaduras (10^2 UFC/g); histamina (>50 ppm), los cuales garantizan la higiene del producto (43).

2.2.8. Microorganismos halotolerantes

Los microorganismos halófilos son típicamente cocos o bacilos que no forman esporas. Los cocos se presentan de forma simple o en grupos, y en algunos casos son móviles ya que presentan flagelos. El tamaño y la forma de estas bacterias puede verse influido por la concentración de sal presente en el entorno (44).

El aislamiento y caracterización de bacterias halotolerantes y halófilas de ambientes hipersalinos es de importancia práctica, debido a que estas bacterias producen biomoléculas útiles para la industria (45).

Las bacterias halotolerantes son microorganismos que pueden crecer en diferentes concentraciones de sal y pueden aislarse de diferentes sustratos. Además, son importantes en la producción de sustancias antimicrobianas, en biotecnología alimentaria, en el tratamiento de residuos biológicos y en biorremediación. Estas bacterias están clasificadas en dos grupos Gram positivos y negativos tales como *Staphylococcus, Micrococcus, Bacillus*, *Pseudomonas,* entre otros (46).

Los microorganismos no halófilos capaces de crecer tanto en ausencia como en presencia de sal se denominan halotolerantes. Aquellos que pueden crecer por encima del 15% (p/v) de NaCl (2,5M) se consideran extremadamente halotolerantes (45).

Existe presencia de microorganismos procariotas halófilos autóctonos (bacterias y/o arqueas) en los alimentos salado madurado en anchoas (*Engraulis anchoíta*) (3). Además, existen bacterias halófilas y halotolerantes productoras de histamina. Sin embargo, hasta la fecha no se ha estudiado la presencia de microorganismos halotolerantes en anchoas saladas maduradas (*Engraulis rigens*) (47).

Las bacterias halófilas producen el deterioro y perdida de inocuidad en productos salado madurados (Anchoita), ya que existe cambios enzimáticos que producen el deterioro; durante el proceso de elaboración de productos salado madurados, existe influencia de las bacterias específicamente en la maduración, ya que éstos tienen reacciones como producción de enzimas proteolíticas, lipolíticas o la actividad de enzimas descarboxilasas, además que tienen la capacidad de producir sulfuro de hidrógeno o indol (2).

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1. Lugar de ejecución

El desarrollo de la tesis se realizó en el Laboratorio de Microbiología y Biotecnología-Dirección de Investigación, Desarrollo, Innovación y Transferencia Tecnológica-DIDITT del Instituto Tecnológico de la Producción, situada en Carretera a Ventanilla Km 5,2, Ventanilla y en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Jirón Puno1002, Cercado de Lima.

3.2. Recolección de materia prima

Se recolectaron muestras de una empresa de Chimbote, que elaboran productos salado – madurado de la especie "Anchoveta" y los análisis microbiológicos se desarrollaron en el Laboratorio de Microbiología y Biotecnología del Instituto Tecnológico de la Producción, durante el periodo marzo - octubre del 2017.

Las muestras se tomaron en recipientes estériles, con ayuda de guantes y bolsas de primer uso, luego fueron selladas herméticamente y embaladas, las mismas que fueron acondicionadas en una caja térmica que contenía hielo para mantener las condiciones de refrigeración optimas requeridas para los ensayos correspondientes (el hielo no estuvo en contacto directo con las muestras), cumpliendo con la normativa vigente de toma y envío de muestras pesqueras según lo estipula SANIPES (Resolución Directoral N°002-2017-SANIPES-DSNPA)(49), hasta el laboratorio del ITP en condiciones de refrigeración y debidamente conservadas, las cuales fueron analizadas antes de las 24 h.

3.3. Metodología

3.3.1. Procesamiento de la muestra para la enumeración de bacterias: ligeramente halófilas, halófilas moderadas y extremas

El método utilizado fue según APHA (49), el cual se realizó de la siguiente manera:

Se tomaron muestras de carne que están justo debajo de la piel y se peló la piel con fórceps estériles y se cortó la carne.

Para la cuantificación de bacterias ligeramente halófilas y halófilas moderadas, se pesó 50 g del producto y se agregaron 450 ml de diluyente (buffer fosfato con NaCl 5% (Merck, Alemania) y buffer fosfato con NaCl 10%), el cual fue esterilizado a 121 ºC por 15 min (Yamato, Alemania) y se homogenizó la muestra en un blender (Oster, USA) durante 2 min a 1500 RPM, a continuación, se realizó diluciones hasta 10^{-6} con el mismo diluyente, utilizando tubos de vidrio de 15 x 150 mm.

Luego se inoculó 0,1 ml de la muestra inicial hasta la dilución 10^{-6} en placas estériles conteniendo TSA (Merck, Alemania) con NaCl 5% y 10%. La técnica utilizada fue la extensión en placa con asa de drigalsky de acero inoxidable estéril. Se incubó a 7 °C por 10 días, en la incubadora refrigerada (Binder, USA).

Para la enumeración cuantitativa de las bacterias halófilas extremas se procedió a licuar 50 g de la muestra con 450 ml de caldo halófilas (casamino ácido 10 g (Merck, Alemania), extracto de levadura 10 g (Merck, Alemania), proteosa peptona 5 g (Merck, Alemania), citrato trisódico 3 g (Merck, Alemania), KCl 2 g (Merck, Alemania), $MgS0_4$. $7H_20$ 25 g (Merck, Alemania), NaCl 250 g, agua destilada 1L y se mezcló por 2 min en un blender. Seguido se esparció 0,1 ml de la muestra inicial en placas estériles de agar halófila hasta la dilución 10^{-6}, fue incubada a 35°C. La técnica utilizada fue la extensión en placa con asa de Drigalsky de acero inoxidable estéril.

3.3.2. Aislamiento de las bacterias halotolerantes

Luego de la incubación de las muestras de anchoas en los medios de cultivo correspondientes y en tiempo según APHA (49), se procedió a realizar los recuentos bacterianos, utilizando el contador de colonias (Orbeco Hellige, USA) y se aisló las colonias; los criterios utilizados fueron las diferencias morfológicas (tamaño, color, consistencia, bordes); las bacterias aisladas fueron inoculadas en TSA conteniendo NaCl 5% para las bacterias ligeramente halófilas y NaCl 10% para bacterias halófilas

moderadas. Finalmente, a las bacterias se les realizó tres pasajes sucesivos para estabilizar los cultivos y fueron conservadas en refrigeración hasta los análisis bioquímicos y moleculares.

3.3.3. Morfología celular

La morfología celular se analizó por medio de la técnica de coloración Gram, de acuerdo con la metodología NTP 204.009 (50); a cada bacteria aislada, se procedió a realizar un frotis en una lámina porta objeto y con ayuda del mechero se fijó la muestra. En seguida, se tiñó la lámina durante 1 min con solución cristal violeta (Merck, Alemania) y se lavó con agua de grifo, a continuación se añadió la solución yodada de Gram (Merck, Alemania) durante 1 min y se lavó en agua de grifo, luego se procedió a la decoloración de la lámina con etanol al 95% (Merck, Alemania) por aproximadamente 30 s, finalmente se aplicó la solución de contraste de safranina (Merck, Alemania) por 30 s y fue lavada y secada a temperatura ambiente, para luego ser examinadas al microscopio (Motic, China).

3.3.4. Pruebas bioquímicas

A partir de las bacterias aisladas en agar TSA conteniendo NaCl 5% y NaCl 10% para las bacterias halófilas ligeramente y moderadas respectivamente, se realizaron las pruebas bioquímicas.

3.3.4.1.Prueba de Oxidasa

Se sembró una colonia aislada del agar TSA utilizando un palito (mordadiente estéril), el cual es colocado sobre la tira del reactivo oxidasa (Merck, Alemania) y se observó el cambio de color. El oxalato de tetrametil-p-fenilendiamina (indicador redox) indica reacción positiva cuando vira de azul a púrpura, y cuando no se percibe cambio de coloración, es un resultado negativo, de acuerdo con la metodología descrita en la ISO 9308-1 (51).

3.3.4.2.Prueba de Ureasa

Se seleccionó una colonia del agar TSA y se realizó el estriado sobre la superficie inclinada y picadura profunda en el agar urea de Christensen (Merck, Alemania) con ayuda de un asa de siembra y fue incubada por 48 h a 35 ºC, posterior a ello se verifico el cambio de coloración, siendo la reacción positiva por la degradación de la urea, el cambio de color de rojo a rosa y luego a cereza, el cual aparece entre las 2 a 4 h. La reacción fue negativa cuando la urea no se hidrolizo; de acuerdo con la metodología descrita en la ISO 6579-1 (52).

3.3.4.3.Prueba de Indol

Se inoculó una colonia aislada a un tubo conteniendo 5 ml del medio triptona/triptófano (Merck, Alemania), previamente esterilizado y fue incubada a 37 ºC por 24 h, tras la incubación se agregó 1 ml de reactivo de Kovacs (Merck, Alemania) a cada tubo inoculado de acuerdo a lo descrito en la ISO 6579-1 (53); a continuación se procedió a verificar el cambio de coloración por el complejo del indol y el p-dimetilamino benzaldehído (53), siendo la reacción positiva cuando se observó un halo de color rojo y negativa, el color amarillo a marrón.

3.3.4.4.Utilización de citrato

Se estrió en la superficie inclinada y por picadura profunda, la colonia aislada al agar citrato de Simmons (Merck, Alemania) e incubó a 35 ºC por 48 h, de acuerdo con el método descrito por la FDA (54), tras la incubación se verifico el cambio de coloración del indicador de verde a azul; esto se debe a la acción de la alcalinización del medio de cultivo y la utilización del citrato (53).

3.3.4.5.Fermentación de hidratos de carbono

Cada colonia aislada fue inoculada a los tubos de ensayo que contenían caldo carbohidrato de Andrade previamente esterilizado (extracto de carne 3 g, peptona o gelisato 10 g, NaCl 10 g, agua destilada 1 L y para el indicador de Andrade (fucsina ácida 0,2 g, agua destilada

100 ml, NaOH 1 N 16 ml), cabe señalar que el caldo de cultivo estuvo suplementado con los siguientes azucares, para cada cepa analizada, glucosa, lactosa, sacarosa, manosa y manitol como soluciones al 10% y salicina, arabinosa, esculina e inositol como soluciones al 5% de acuerdo a lo descrito por la FAO (42), finalmente fueron incubados a 35 ºC por 48 h, luego de la incubación se verifico el cambio de coloración de morado a amarillo, indicando la reacción positiva.

3.3.4.6. Descarboxilación de aminoácidos (lisina, ornitina, arginina)

Las cepas aisladas fueron inoculados a los medios de descarboxilación suplementado con lisina, ornitina y arginina (peptona 5 g, extracto de levadura 3 g, azúcar glucosa 1 g, colorante púrpura de bromocresol 0,02 g, agua destilada 1 L, lisina 5 g/L, ornitina 5 g/L y arginina 5 g/L) y se añadió una capa de 10 mm de espesor de aceite mineral (Merck, Alemania) estéril a cada tubo, después se incubó a 35 °C por 24 h, según la FAO (42); posterior a ello, se evidenció el cambio de coloración a purpura siendo la reacción positiva, de lo contrario se tornará a amarillo indicando reacción negativa.

3.3.4.7.Pruebas con agar hierro triple azúcar y producción de ácido sulfhídrico

Las colonias aisladas fueron sembradas en agar inclinado hierro triple azúcar (Merck, Alemania) por picadura en profundidad, se incubó a 37 ºC por 24 h de acuerdo con el protocolo descrito por la FAO (42), después se evidenció las siguientes reacciones: en la profundidad del tubo, se verificó el color amarillo, el cual indicó glucosa positiva, rojo o sin cambio de color indico glucosa negativa. Asimismo, el color negro indicó la formación de sulfuro de hidrogeno y finalmente la aparición de burbujas o grietas significó la formación de gas a partir de glucosa. En la superficie inclinada del tubo, se identificó el color amarillo, el cual indica la fermentación de la lactosa, el color rojo o sin cambio de color, indica que la lactosa y sacarosa son negativas. Finalmente, si el medio se ha ennegrecido indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico.

3.3.5. Prueba de tolerancia salina

Las colonias aisladas fueron inoculadas en el medio halófilo (casamino ácido 10 g, extracto de levadura 10 g, proteosa peptona 5 g, trisodio citrato 3 g, KCl 2 g, $MgS0_4$. $7H_20$ 25 g, agua destilada 1L y se esterilizó a 121 ºC x 15 min) en concentraciones de NaCl 0%, 2,5%, 5%, 10%, 15% y 20%, e incubó a 35 ºC por 24 h (70).

3.3.6. Rango de temperatura de crecimiento

Cada bacteria aislada fue inoculada en placas con TSA, mediante la técnica del estriado con la finalidad de visualizar su crecimiento entre las 24 a 48 h. La prueba de rango de temperaturas fue determinada a 4 °C, 25 °C, 35 °C, 44 °C, 50 °C, 60 °C en incubadora (Binder, USA; Memmert, Alemania; y ELOS BREED, Alemania).

3.3.7. Pruebas de hidrólisis de sustratos

3.3.7.1. Almidón

La actividad amilolítica fue realizada según Cowan y Steel's (55), cada cepa aislada fue sembrada en agar almidón e incubada a 35 ºC por 24 h, luego de la incubación cada placa fue cubierta con una solución de yodo, verificándose el cambio de color azul oscuro en los lugares donde no hidrolizó el almidón y las zonas claras donde hubo hidrolisis.
Para la verificación de hidrólisis de almidón, se cubrió la placa con Lugol, la reacción positiva se verificó la ausencia de coloración azul oscuro.

3.3.7.2. Caseína

Fue determinado mediante la metodología de Collins y col. (56), las cepas se sembraron mediante una estría central gruesa en agar caseína (Merck, Alemania) y se incubó a 35 ºC por 24 h, posterior a ello, se evidenció la presencia de un halo transparente alrededor de la colonia bacteriana, comprobando que el microrganismo hidroliza la caseína.

3.3.7.3. Gelatina

Se determinó mediante la técnica de Cowan y Steel's (55), las cepas bacterianas fueron inoculadas en el agar gelatina (Merck, Alemania) mediante la técnica de estriado y se incubó a 35 ºC por 24 h, al finalizar se verificó la licuefacción de la gelatina.

3.3.8. Prueba de sensibilidad antimicrobiana

Las colonias bacterianas no deben sobrepasar las 18–24 horas de aislamiento, luego se suspendió las colonias en solución salina al 0.85% y se ajustó el inóculo a una turbidez equivalente al estándar 0,5 de McFarland.

Las cepas fueron inoculadas en el agar Mueller- Hinton (Merck, Alemania), de acuerdo con el método descrito por Kirby-Bauer (57). De forma aséptica se adicionaron los discos antimicrobianos a ensayar sobre las placas de agar y se incubó a 35 °C por 24 h, los antibióticos comerciales son: penicilina 10 µg, cloranfenicol 30 µg, gentamicina 10 µg, tetraciclina 30 µg, penicilina 10 µg, Rifampicina 5 µg, Sulfametoxazol/Trimetoprima 25 µg; estreptomicina 10 µg, Acido Nalidíxico 30 µg, Novobiocina 5 µg, ya que éstos antimicrobianaos son esecificos para bacterias gram positivas y gram negativas (1).

3.3.9. Caracterización molecular

Se utilizó el protocolo descrito por Chávez-Hidalgo (58), para determinar la extracción de ADN genómico, sobre la base en solventes orgánicos.

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando los cebadores 16SF: 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' y 16SR: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'., se amplificaron los genes 16S ribosómicos.

Se utilizó 25 µL de la reacción, el cual está compuesto por: KCl 50 mM, Tris/HCl 10 mM, tritón X-100 0.1% (v/v), $MgCl_2$ 1,5 mM, dNTPs 200 µM, los cebadores 20 pmoles de c/u y *Taq* ADN-polimerasa 1U y ADN genómico 50 ng.

Mediante la electroforesis fueron separados los genes ribosómicos amplificados, donde se utilizo agarosa al 1% con buffer TBE 1X., además utilizando los cebadores 16SF: 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3', 16SR: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' y 1100R: 5´-AGGGTTGCGCTCGTTG-3´fueron secuenciados. A través de los programas Bioedit y Blastn se alinearon las secuencias y se buscaron la similitud en GenBAnk.

CAPITULO IV. RESULTADOS

Desde el punto de vista sanitario, las anchoas saladas maduradas, por la concentración de sal que presentan en su composición no debería permitir el crecimiento de bacterias, sin embargo, en este estudio se verifico la prevalencia de *Staphylococcos sp*, el cual es un patógeno asociado con la inadecuada manipulación de los alimentos; y el resto de las bacterias aisladas, es parte de la biota autóctona de las anchovetas.

4.1. Enumeración de bacterias halotolerantes, halófilas ligeras, moderadas y extremas

Se utilizó el método APHA (49) para cuantificar las bacterias halotolerantes, halófilas ligeras, halófilas moderadas y halófilas extremas, cuyos resultados fueron expresados en UFC (Unidades Formadoras de Colonias).

Para las anchoas analizadas del barril 1 en el mes de marzo, el recuento de las bacterias ligeramente halófilas (5%) fue 220 UFC/g, para las bacterias halófilas moderadas (10%) se obtuvo 28 UFC/g.

En las anchoas del barril 2 del mes de marzo, el recuento de las bacterias ligeramente halófilas (5%) fue 360 UFC/g y para el mes de octubre 970 UFC/g. De igual forma, para las bacterias halófilas moderadas (10%) en el mes de marzo fue 31 UFC/g y en octubre 85 UFC/g. Por lo tanto, se observa que, el conteo de los microorganismos ligeramente halófilas se evidenció mayor por el tiempo de maduración de las anchoas y se incrementó en el medio con NaCl 5%, mientras que a NaCl 10% el número disminuyó.

Los productos analizados de los dos barriles, resultaron con recuentros > 10UFC/g (Tabla 1). Sin embargo, en el recuento de bacterias halófilas extremas fue <10 UFC/g en medio con NaCl 20%.

Tabla 1. Recuento de bacterias halotolerantes (UFC/g) en anchoveta en salazón proveniente de una empresa pesquera de Chimbote, de marzo a octubre de 2017

Barril N°	Marzo		Mayo		Julio		Octubre	
	Microorganismos halotolerantes (UFC/g)							
	A	B	A	B	A	B	A	B
1	220	28	420	39	720	65	920	72
2	360	31	470	39	770	80	970	85

Concentración salina: A, NaCl 5%; B, NaCl 10%

Las colonias fueron codificadas según la concentración de sal del medio del cual fueron aisladas, es así como se hicieron dos codificaciones BH, colonias aisladas de las anchoas a NaCl 5%; y BHE, colonias aisladas de las anchoas a NaCl 10%.

Para el aislamiento de los microorganismos de las muestras ensayadas, se tomó en cuenta las diferencias morfológicas de las colonias (Tabla 2), siendo un total de 14 colonias seleccionadas, cuya denominación es BH1, BH2, BH6, BH11, BH12, BH12.2, BH14, BH16, BH17, BH18, BH19 y BH20 (5%NaCl) y BHE11 y BHE12 (10%NaCl). En marzo del 2017 se aislaron a BH1, BH2, BH6, BH11, BH12, BH12.2, BH14, BH16, BH17, BH18, BHE11 y BHE12 y en octubre del 2017 a BH19 y BH20.

Estas 14 cepas seleccionadas fueron sujetas a tinción Gram, las cuales presentaron diferente morfología.

4.2. Pruebas fisiológicas e identificación bioquímica

En relación a la morfología celular fue variable, nuevo cocos Gram positivos, tres bacilos Gram positivos y dos cocos Gram negativos. Se evidenció que las colonias aisladas fueron de color crema, forma circular, borde definido y superficie lisa. Otro grupo de bacterias aisladas tuvieron bordes irregulares. Con relación a las pruebas bioquímicas, fueron variables para las pruebas de oxidasa, ureasa, indol, citrato y fermentación de carbohidratos fueron variables (Tabla 2).

Cabe resaltar que el 78% (11 cepas) de las bacterias aisladas fueron indol positivo, las cuales están relacionadas con el desarrollo de sabores desagradables. Ocho de las bacterias aisladas fueron proteolíticas, de las cuales siete son cocos Gram positivos y un bacilo Gram positivo.

Tabla 2. Caracterización de las bacterias halotolerantes aisladas del proceso de salado madurado de anchovetas provenientes de Chimbote, año 2017.

CEPA	MORFOLOGÍA	TINCIÓN GRAM	COLOR COLONIA	OXIDASA	UREASA	INDOL	CITRATO	FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS				TOLERANCIA SALINA (NaCl %)						TEMPERATURA (°C)					HIDROLISIS DE SUSTRATO		
								GLUCOSA	SACAROSA	SALICINA	LACTOSA	0,0	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5	4	25	35	44	50	ALMIDON	CASEINA	GELATINA
BH1	Coco	+	Crema	-	+	+	-	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
BH2	Bacilo	+	Crema	+/-	+/-	-	-	+-	+-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-
BH6	Coco	+	Crema	-	+/-	+	-	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
BH11	Bacilo	+	Rojizo	+/-	-	-	+-	+	+	nd	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
BHE11	Coco	+	Blanco	+	+	+	-	-	nd	nd	nd	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
BH12	coco	+	Crema	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
BH12.2	Coco	-	Crema	+	-	+	+	+	+-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
BHE12	Coco	+	Crema	+	+	+	+	+	+	nd	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
BH14	Coco	+	Crema	-	-	+	-	+	+	-	+/-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
BH16	Bacilo	+	Crema	+/-	+/-	-	+	+	nd	+	nd	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
BH17	Coco	-	Crema	+/-	-	+	+-	nd	nd	nd	nd	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
BH18	Coco	+	Blanco	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
BH19	Coco	+	Crema	-	+/-	+	-	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
BH20	Coco	+	Crema	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+

Pruebas: +, positiva; -, negativa; +/-, variable, nd, no determinado. Tamaño de halo de hidrólisis (mm): -, 0; +, ≤ 5; ++, > 6; +++, >

4.3. Prueba de tolerancia salina y rango de temperatura de crecimiento

Las bacterias aisladas fueron inoculadas a diferentes concentraciones de NaCl entre 0,0 a NaCl 12,5 %, en esta prueba, tres crecieron en el rango salino estudiado, once entre 0% a 10%. Cabe destacar, las 14 cepas crecieron en medio sin NaCl, lo cual indica que las bacterias aisladas no son halófilas sino halotolerantes, estas últimas crecen con o sin NaCl (Tabla 2 y Figura 2). Con respecto a la temperatura, dos cepas crecieron de 25 °C y 50 °C-(BH6 y BH16) y la cepa BHE11 a 4 °C y 44 °C. (Tabla 2 y Figura 2).

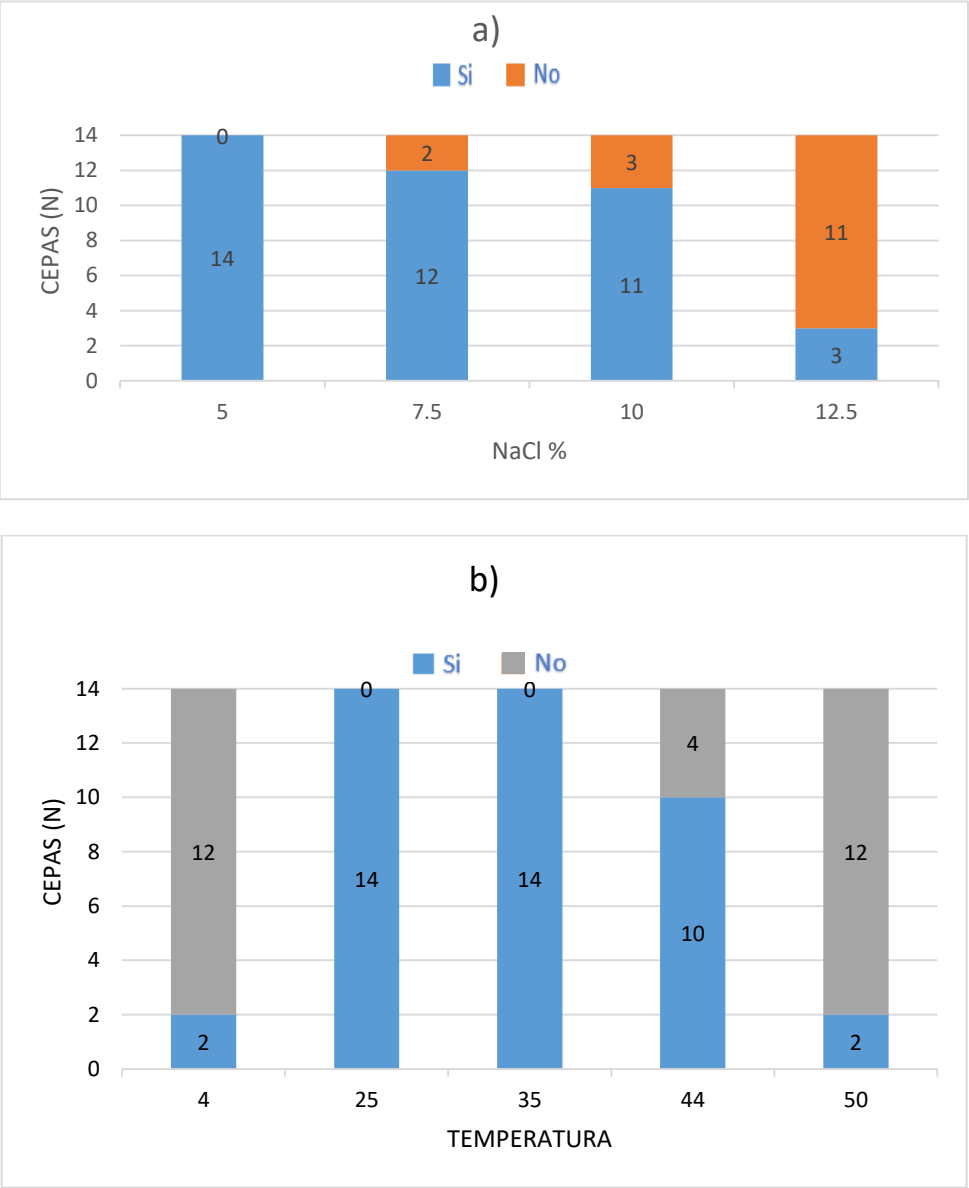

Figura 2. Tolerancia salina (a) y térmica (b) de bacterias halotolerantes aisladas del proceso salado madurado de anchovetas provenientes de Chimbote.

4.4. Pruebas de hidrólisis de sustratos

A las bacterias, se le realizaron pruebas de hidrolisis de sustratos, de las cuales, siete degradaron almidón, caseína y gelatina, cuatro no degradaron ninguno de estos sustratos y las cepas BH12.2, BH17 degradaron almidón (Tabla 2).

4.5. Prueba de sensibilidad antimicrobiana

Para la realización de esta prueba de sensibilidad antimicrobiana, se utilizaron nueve antimicrobianos; del análisis se identificaron 8 perfiles de sensibilidad. El BH14 fue resistente a los antimicrobianos analizados y el BH1 solo a ácido nalidíxico. (Perfil I). Asimismo, BH12.2 y BH17 fueron sensibles a diversos antimicrobianos (Perfil VI) (Tablas 3 y 4).

En las figuras 2 y 3, se especifica la sensibilidad a ácido nalidíxico y resistencia al antimicrobiano novobiocina. Pese a las semejanzas morfológicas, se evidencia la sensibilidad antimicrobiana de las bacterias estudiadas.

Tabla 3. Sensibilidad antimicrobiana de bacterias halotolerantes aisladas de anchoveta en salazón durante el año 2017, Chimbote - Perú

CEPA	PEN 10 µg	CLOR 30 µg	GEN 10 µg	TET 30 µg	RIF 5 µg	SMX-TMP 25 µg	STR 10 µg	NAL 30 µg	NOV 5 µg
BH1	I	R	R	R	R	I	R	S	R
BH2	I	S	I	S	S	S	S	S	S
BH6	R	I	I	R	R	S	S	S	I
BHE11	R	S	R	S	S	S	R	S	R
BH11	R	S	R	S	S	S	R	S	I
BH12	I	S	I	S	S	S	S	S	R
BH12.2	S	S	S	S	S	S	S	S	S
BH14	R	R	R	R	R	R	I	R	R
BH16	S	S	I	S	S	S	S	S	S
BH17	S	S	S	S	S	S	S	S	S
BH18	I	S	I	S	S	S	S	S	R
BH19	R	S	I	R	R	S	I	S	I
BH20	I	S	R	R	R	S	I	S	R
BHE12	R	S	R	R	R	S	I	S	R

Nomenclatura NCCLS: Pen, penicilina; Clor, cloranfenicol; Gen, gentamicina; Tet, tetraciclina; Rif, Rifampicina; Smx-Tmp, Sulfametoxazol/Trimetoprima; Str, estreptomicina; Nal, Acido Nalidíxico; Nov, Novobiocina; R, 6 -16 mm; I,17 - 20 mm; S, 21-34 mm

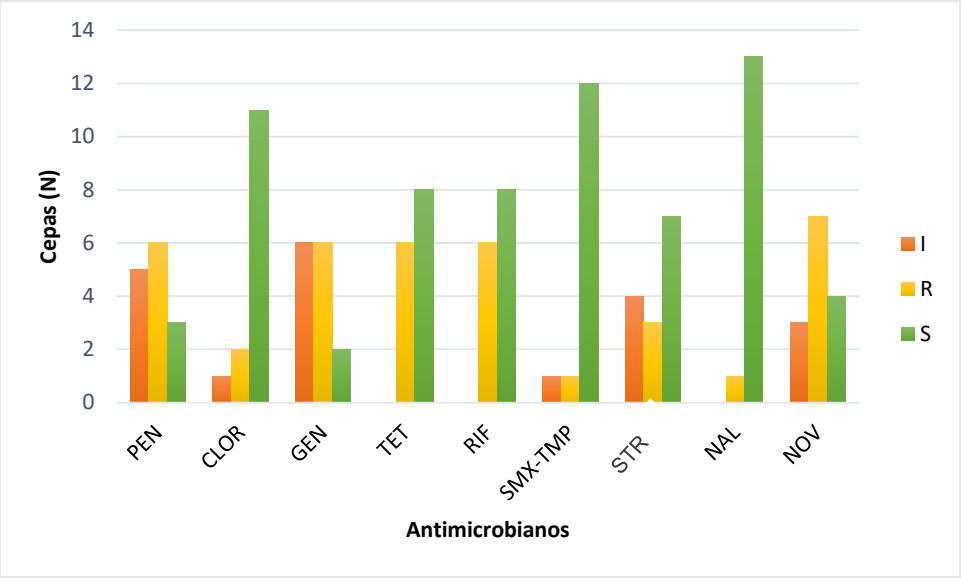

Figura 3. Número de bacterias halotolerantes con sensibilidad antimicrobiana aisladas del proceso salado madurado de anchovetas procedentes de Chimbote. Leyenda: Pen, penicilina; Clor, cloranfenicol; Gen, gentamicina; Tet, tetraciclina; Rif, Rifampicina; Smx-Tmp, Sulfametoxazol/Trimetoprima; Str, estreptomicina; Nal, Acido Nalidíxico; Nov, Novobiocina; Diámetro del halo: S, 21 -34 mm; I,17-20 mm; R, 6 -16 mm

Tabla 4. Perfiles de sensibilidad de bacterias halotolerantes aisladas de anchovetas en salazón durante el año 2017, Chimbote, Perú.

Perfil	Antimicrobianos	Cepa*
I	Nal	BH1
II	Smx-Tmp, Str, Nal	BH6
III	Clor, Smx-Tmp, Nal	BH 19, BH 20, BHE 12
IV	Clor, Tet, Rif, Smx-Tmp, Nal	BHE 11, BH11
V	Clor, Tet, Rf, Smx-Tmp, Nal, Str	BH12, BH18
VI	Clor, Tet, Smx-Tmp, Nal, Str, Nov	BH2
VII	Pen, Clor, Tet, Rif, Smx-Tmp, Str, Nal, Nov	BH 16
VIII	Pen, Clor, Gen, Tet, Rif, Smx-Tmp, Str, Nal, Nov	BH12.2, BH 17

*, cepa BH14 fue resistente a todos los antimicrobianos analizados

4.6. Caracterización molecular

Los resultados del análisis molecular de los genes ribosómicos 16S, señalan la presencia de los géneros *Oceanobacillus, Staphylococcus*, *Psychrobacter, Salinicoccus*, *Bacillus* y *Sporosarcina* (Tabla 5).

Tabla 5. Similitud de la secuenciación parcial de los genes ribosómicos 16S de bacterias aisladas.

Cepa	Género	Similitud (%)
BH1	*Staphylococcus*	98
BH2	*Bacillus*	94
BH6	*Staphylococcus*	99
BH11	*Oceanobacillus*	98
BHE11	*Salinicoccus*	97
BH12	*Staphylococcus*	97
BH12.2	*Psychrobacter*	98
BHE12	*Sporosarcina*	94
BH14	*Staphylococcus*	99
BH16	*Bacillus*	97
BH17	*Psychrobacter*	98
BH18	*Sporosarcina*	94
BH19*	*Staphylococcus*	94
BH20*	*Staphylococcus*	98

*, cepas bacterianas aisladas en octubre, las restantes en marzo del 2017.

CAPITULO V. DISCUSIÓN

Los pescados salados y madurados de forma tradicional no solo contribuyen a la ingesta de proteínas de un gran número de personas alrededor del mundo, sino también son una fuente de minerales y vitaminas del grupo B. Durante el proceso de maduración, la actividad enzimática de la materia prima y la actividad metabólica de los microorganismos autóctonos puede cambiar las características nutritivas y bioactivas del pescado conllevando a efectos beneficiosos o perjudiciales para la salud.

Las muestras de anchoas de Chimbote analizadas de los barriles 1 y 2 en marzo 2017, presentaron recuentos de 220 UFC/g y 360 UFC/g en medio NaCl 5% y 28 UFC/g y 31 UFC/g en medio conteniendo NaCl 10%. En octubre 2017 se obtuvieron 72 UFC/g (barril 1) y 85 UFC/g (barril 2) en medio conteniendo NaCl 10%. Estos datos coinciden con los reportados por Czenner y Yeannes (4), quienes estudiaron a bacterias halófilas extremas y moderadas concluyendo que éstas se adecúan al medio de cultivo progresivamente, esto se debe al aumento de nutrientes producto del proceso proteolítico en las anchoas. Esta adaptación que sufre las bacterias explica el incremento del recuento bacteriano de 220 UFC/g hasta 920 UFC/g en marzo y octubre respectivamente en muestras con 5% de NaCl. Además, Sumitha (59), en su estudio realizado sobre el aislamiento y caracterización de bacterias halófilas en anchoas fermentadas obtuvo un recuento promedio de $32x10^4$ UFC/g de bacterias halófilas al NaCl 5%, siendo mayor a lo reportado en el presente estudio.

Es importante señalar, que el menor número de bacterias al inicio del salado madurado se debe a la incorporación de sal y al prensado, los cuales reducen la biota bacteriana. Además, Czerner y Yeannes (4), señalan bajos conteos bacterianos en el primer mes de maduración, los cuales se incrementan cuando las bacterias se adaptan paulatinamente a su nueva condición física.

Por otro lado, Mustafa (9) realizo el estudio de la biota del pescado salado fermentado naturalmente, donde aisló diferentes especies, teniendo un promedio de $21x10^3$ UFC / g de bacterias halófilas; además, no hubo presencia de coliformes, esto se explica por la adición de sal durante la fermentación. Sin embargo, se encontró presencia de *Staphylococcus*, un indicador de malas prácticas de manipulación. Asimismo, demostró

que las especies de los géneros *Bacillus* y *Staphylococcus* fueron predominantes, sin embargo, en el presente estudio el predominante fue *Staphylococcus*.

Con relación a la morfología de las colonias fue variada, coincidiendo con Pérez (60), quien aisló colonias de colores beige-cremosas y rojizas-anaranjadas de muestras del proceso de maduración de *Engraulis anchoíta* "anchoíta", cuya muestra fue de algunos saladeros de Mar de Plata, Argentina (38° S, 5° 33´ W). Asimismo, fueron variables, las pruebas bioquímicas como ureasa, citrato, fermentación de carbohidratos, oxidasa e indol, siendo en su mayoría indol positivo, y con capacidad proteolíticas. Además, Pérez (60) señala que hubo producción de indol y H_2S, siendo de gran importancia ya que participa en el "off-flavors" y daños microbiológicos del pescado salado, asimismo este autor en las pruebas bioquímicas realizadas determina que la mayoría de las bacterias aisladas presentaron actividad de citocromo oxidasa, siendo esta ración contribuyente a bajar los niveles de oxígeno que se encuentra en el interior del barril y de ésta forma evita el ranciamiento ya que contiene exceso de aldehídos debido a la oxidación de ácidos grasos, esto también es señalado por Talon y Leroy (61).

Por otro lado, en el presente estudio se determinó la asimilación de los azucares y en lo realizado por Pérez (3) señala que las bacterias aisladas, en su mayor parte no asimilaron glucosa, lactosa y sacarosa, pero las bacterias consumieron mayor azúcar en el agar TSI, esto puede ser atribuido al tipo de composición de los medios de cultivo. Por el contrario, Tanasupawat et al. (11) en la identificación de bacterias halófilas de salsa de pescado en Tailandia, señala que el grupo de halófilas aisladas fueron catalasa, oxidasa, ureasa positiva, indol negativo. Además, indicó la ausencia de hidrolisis de gelatina, caseína y crecimiento de 10 a 45 °C en NaCl 3 a 25%, siendo su crecimiento optimo en NaCl 10%, además produjeron ácido a partir de arabinosa, glucosa, fructosa, galactosa, pero no de celobiosa, lactosa, maltosa, manosa, rafinosa, ramnosa, salicina, sacarosa, sorbitol y trehalosa.

Czerner y Yeannes (4) reportan que en las anchoas saladas (*E. anchoita*) predominan las bacterias halófilas moderadas; y al término del proceso las bacterias halófilas extremas, siendo una posibilidad para el desarrollo de características sensoriales, qué podrían afectar el producto final, como el cambio de color a rojizo y olor a descomposición.

De las 14 cepas bacterianas aisladas del presente estudio; todas degradaron almidón, caseína o gelatina, y cuatro no degradaron ninguno de estos sustratos. Sin embargo, Cojoc et al. (63), describen cepas de la mina salina en Slanic Prahova en Rumania, donde el 46% y el 32% presentan actividades caseinasa y amilolítica respectivamente. Asimismo, se observan perfiles de sensibilidad similares entre las cepas BH1 y BH6, lo cual indica que presentan enzimas con similares actividades. Por otro lado, las cepas restantes exhiben perfiles morfológicos, fisiológicos y bioquímicos disímiles, lo cual está acorde con Margesin et. al. (45), quienes reportan la variabilidad de los perfiles hidrolíticos de las bacterias halófilas que les otorga aplicabilidad en procesos industriales. Por otro lado, Xin Li y Ying Hui (65) aislaron bacterias halófilas productoras de amilasas del lago salado de Yuncheng, China, las cuales mostraron morfología microscópica diversa y gran actividad antimicrobiana. De igual forma, Czenner y Yeannes (4) señalaron en el estudio relazado, del total de microrganismos asilados de la muestras saladas maduradas de *E. anchoita* solo el 5% son bacterias proteolíticas, de la misma forma Pérez (60) reportó que el 25% de bacterias aisladas fueron proteolíticas del mismo tipo de muestra estudiada por Czenner y Yeannes. El resultado obtenido en el presente estudio de la identificación bioquímica de las bacterias aisladas, estas al ser halotolerantes, tuvieron perfiles hidrolíticos y acidificaron diferentes azucares, siendo diferentes entre ellos, siendo esto descrito anteriormente por Tanasupawat et al. (11).
En relación con el desarrollo de las bacterias a diversas concentraciones de NaCl, 3 crecieron en el rango salino de 0.0 a NaCl 12.5 %, 11 entre 0% a 10% y 14 cepas crecieron en medio sin NaCl. Sin embargo, el estudio realizado por Czerner y Yeannes (4) a anchovetas en salazón se evidencio el crecimiento bacteriano al 5, 7%, 10%, 15 y 20% de NaCl después de la etapa de maduración.

Staphylococcus y *Bacillus* se desarrollaron entre 25 °C y 50 °C y *Salinococcus* entre 4 °C y 44 °C, sin embargo, Jae-Hyung et al. (65), señalan que *Paenibacillus tyraminigenes sp. Nov*, asilado de anchoveta fermentada en Corea, crece a una temperatura óptima de 35 ° C; la máxima de 45 ° C; y la mínima de 15 °C, a pesar que crece en el rango de temperatura que se ha evaluado la anchoveta en estudio, no ha crecido está en las muestra analizadas.

Con referencia a la sensibilidad antimicrobiana, Singh et al. (66), señalan que las bacterias halófilas son resistentes a diferentes antimicrobianos. Así, en el presente estudio se

determinó que la bacteria BH14 es resistente a ocho antimicrobianos y sólo la bacteria BH1 es resistente a ácido Nalidíxico. Sin embargo, las bacterias BH12.2 y BH17 son sensibles a la mayoría de antimicrobianos analizados. De igual forma, Sumitha et al. (59) encontraron que las bacterias aisladas de anchoas fermentadas son sensibles a la mayoría de antimicrobianos estudiados, con excepción de cuatro cepas fueron resistentes a kanamicina y dos a vancomicina. Nashwa et al. (67) en el aislamiento de bacterias de pescado salado en Egipto, señala que la sensibilidad antimicrobiana para la cepa *S. aureus* coagulasa positivos fueron sensible a ciprofloxacina, gentamicina, estreptomicina, neomicina, amikacina, vancomicina, meticilina, eritromicina, aminopenicilina y tetraciclina con un porcentaje de 100,0; 98,0; 98,0; 96,6; 94,9; 91,5; 84,7; 74,6; 69,5 y 59,3% respectivamente.

Asimismo, Elyasifar et al. (68) identificaron que las bacterias *Halobacillus, Bacillus* y *Virgibacillus* tienen poca sensibilidad a gentamicina y son resistentes a rifampicina y tetraciclina, pero para la presente investigación, se evidencio multirresistencia en las cepas BH1 BH6, BH12, BH14, BH19 y BH20. Puig et al. (69) encontraron un estándar en *Staphylococcus* aislados de pescado, de los antimicrobianos tetraciclina, eritromicina y cloranfenicol, siendo motivo del daño en la producción e inocuidad alimentaria.

Al realizar la caracterización molecular se identificaron a los géneros *Sporosarcina, Salinicoccus, Bacillus, Staphylococcus, Psychrobacter* y *Oceanobacillus* de las colonias aisladas de las muestras anchovetas saladas maduradas. Asimismo, Pulache (18) reportó que, las bacterias aisladas de caballa salada fueron *Salinivibrio* sp*, Staphylococcus nepalensis, Halomonas* sp*, Staphylococcus* sp. y *Staphylococcus equorum.* En China, Guan, Cho y Lee (71) describieron la presencia de *S. equorum, Staphylococcus nepalensis* y *Staphylococcus* sp. en corvina salada.

Asimismo, López (72) ha descrito a *Salinivibrio* sp. como biota bacteriana de pescado salado, de igual forma, López-Hermoso et al. (73) señalan que *Salinivibrio* es una bacteria halófila que crece en concentraciones de NaCl entre 0,5 a 20 % (p/v). Sin embargo, en el estudio realizado por Spergser et al. (74) no se reportó crecimiento de *Staphylococcus nepalensis* a concentraciones de NaCl 15%.

El género *Sporosarcina,* en su mayoría las especies han sido aisladas de ambientes salinos, como el mar, además presenta óptimo desarrollo bacteriano a las temeperaturas

de 20 a 30 °C y a valores menores a 15% de sal coincidiendo con las cepas BHE12 y BH18 (75). Las 24 especies del género Oceanobacillus, son tolerantes a altas concentraciones de sal (llegan hasta 21%) y su crecimiento adecuado es de 6 a 8% como la cepa BH11(76) y *Salinococcus* presenta un adecuado crecimiento a 10% de sal como la bacteria BHE 11(99-101) ya que presenta alrededor de 70 genes de osmorregulación. *Psycrobacter* crece en diferentes ecosistemas, tolerando hasta 12% de sal y 40 °C, coincidiendo con las cepas BH17 y BH12.2 (77). *Staphylococcus*, es halotolerante, la cual crece a bajas temperaturas y se reporta alrededor de 90 genes con mecanismos reguladores del estrés salino, como el engrosamiento de la pared celular y el osmoprotector prolina. Estos reportes contribuyen a veririfcar el diverso comportamiento de las bacterias BH1, BH6, BH12, BH14, BH19 y BH20 en relación a las diferentes concentraciones de sal y crecimiento a bajas temperaturas. Las bacterias BH2 y BH16 (*Bacillus sp*), fueron tolerantes a 50 °C la cual está relacionada a un mecanismo de adaptación de éste género como la esporulación que ocasionan.

El control microbiológico a los productos como anchoas en salazón y envasados son señalados en la NTP 204.056:2006 (44) y reportados por INDECOPI (44) y SANIPES (62) siendo los microrganismos mesófilos y hongos, empero no mencionan los criterios para las halotolerantes; a pesar que éste tipo de bacterias causan deterioro al producto, como por ejemplo de *Staphylococcus,* que fue aislado de las muestras estudiadas a lo largo de la investigación. La FAO señala que el *Staphylococcus* puede contaminar a partir de una inadecuada manipulación de alimentos o en el ambiente de trabajo, en consecuencia, es de suma importancia incorporar el análisis de las bacterias halotolerantes en el proceso de la obtención del producto anchoas en salazón.

El proceso tecnológico de salado madurado para la producción de productos pesqueros se realiza en diversas regiones a nivel nacional e internacional. Mediante este proceso se conservan las proteínas y mejoran las características organolépticas del pescado. Sin embargo, el proceso de salado madurado tradicional se basa en utilizar la microbiota autóctona y añadir sal. En este contexto, el estudio de los microorganismos que están al inició y al final del proceso de salados madurados de forma tradicional es esencial para mejorar las propiedades organolépticas y la seguridad. La estructura y función de las comunidades microbianas durante el proceso de salado madurado del pescado, así como su relación con el desarrollo de la calidad del pescado salado todavía necesita mayor estudio. Así, se debería ampliar la investigación relacionado con los ensayos

microbiológicos, teniendo en cuenta las estaciones del año, ya que la temperatura es un factor en el crecimiento de los microorganismos y conservación del pescado. Asimismo, se debería realizar estudios sobre muestreos de ambientes donde se realizan los procesos tecnológicos como superficies vivas y muertas según lo estipula DIGESA, a fin de comparar los resultados del producto; y así determinar y explicar la presencia de algunos patógenos en los productos finales, a fin de contribuir con la industria pesquera para que puedan tomar decisiones certeras y no tener pérdidas económicas con productos que no son inocuos, siendo un riesgo para el comercio nacional y las exportaciones.

Por otro lado, el estudio de los microorganismos que proporcionan el sabor, la textura y la seguridad del pescado salado madurado como producto final se ésta incrementando en otros países. La información sobre las diferentes cepas dentro de una especie, así como las proteínas producidas es importante para comprender mejor las funciones del microbiota en pescado fermentado. Por ejemplo, en China, el pescado *Siniperca chuatsi* encontraron que *Streptococcus sp., Bacillus sp., Escherichia sp. y Pseudoalteromonas sp*., producen diversas enzimas que intervienen en el metabolismo de los aminoácidos (81). En este aspecto, sería importante estudiar la influencia de cepas de los géneros *Salinococcus, Oceanobacillus, Psychrobacter y Sporosarcina* en el proceso de salado madurado de las anchoas.

CAPITULO VI. CONCLUSIONES

1.- Del análisis microbiológico se identificaron 14 bacterias aisladas de *Engraulis ringens* "Anchoveta" del proceso de anchoas saladas maduradas de marzo a octubre del 2017

2.- Las bacterias aisladas son halotolerantes moderadas y crecen a 35 °C, presentaron ocho perfiles de sensibilidad a nueve antimicrobianos, con excepción de cepa BH14 que mostró resistencia a todos los antimicrobianos.

3.- De las 14 bacterias halotolerantes, dos pertenecen al género *Bacillus*, seis a *Staphylococcus*, una a *Salinococcus*, una a *Oceanobacillus,* dos a *Psychrobacter,* y dos a *Sporosarcina.*

4.- La presencia del 43% de cepas de *Staphylococcus* en el proceso de salado madurado de las anchoas indica contaminación bacteriana según la regulación de la Unión Europea y FDA.

CAPITULO VII.- RECOMENDACONES

- ✓ Se sugiere revisar e incluir en la Norma técnica peruana 204.056, la evaluación de las bacterias halófilas y halotolerantes en los productos como las anchoas, siendo un producto salado madurado, ya que éstos microrganismos son indicadores de deterioro del producto.
- ✓ Se recomienda seguir estudiando el potencial de las bacterias nativas de este tipo de productos y el rol que desempeñan en el proceso de elaboración de este tipo de productos.
- ✓ Por la presencia de *Staphylococcus* se debería hacer más estudios a los productos salado madurados de anchoveta a fin de robustecer el presente estudio y de acuerdo a los resultados obtenidos, poder informar al INACAL para que puedan elaborar una Norma Técnica peruana para productos salado-madurado y definir nuevos parámetros microbiológicos que sean específicos para este tipo de productos.

CAPITULO VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Hernández-Herrero M, Roig-Sagués A, Rodríguez-Jerez J, Mora-Ventura M. Halotolerant and halophilic histamine-forming bacteria isolated during the ripening of salted anchovies (*Engraulis encrasicholus*). Journal Food Prot. 1999c; 62 (5): 509-514. DOI: 10.4315/0362-028x-62.5.509

2. Pérez Silvina. Estudio de la cinética de bacterias halófilas presentes en la maduración de *Engraulis anchoita* involucradas en la transformación de histidina/histamina. (Tesis para optar al Grado de Doctor): Universidad Mayor de la Plata; 2018.

3. Pérez S., Czerner M., Patat M.L., Zaritzky N.E., Murialdo S.E. & Yeannes M.I. 2018. Monitoring the characteristics of cultivable halophilic microbial community during salted-ripened anchovy (*Engraulis anchoita*) production. International Journal of Food Microbiology, 286(2): 179-189. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.013

4. Czerner M, Yeannes M. Bacterial Contribution to Salted Anchovy (*Engraulis anchoíta*) (Hubbs & Marinni, 1935) Ripening Process. Journal of Aquatic Food Product Technology. 2014; 23(2): 102–114. DOI: https://doi.org/10.1080/10498850.2012.697537

5. Kristín A. The influence of salting procedures, on the characteristics of heavy salted (Tesis para optar al Grado de Doctor): Lund University Department of Food Technology; 2010.

6. Kristbergsson K, Oliveira J. Traditional Foods: General and Consumer Aspects. New York, USA. 2016.

7. CODEX ALIMENTARIUS. Programa Conjunto FAO/OMS Sobre Normas Alimentarias Comité Del Codex Sobre Pescado Y Productos Pesqueros". 2012; Disponible en: inesma.org/inesma//basicdocs/docs14/20060911185538.pdf

8. Escobar K, Hernández C. Análisis de bacterias patógenas en Sardina Salada-Seca (Orden Clupeiformes) procesada artesanalmente en la Bahía de Jiquilísco (Tesis para optar al grado de Licenciatura en Biología); Universidad de El Salvador Facultad de Ciencias Naturales y Matemática Escuela de Biología. 2012.

9. Mustafa A. Microbiological and chemical quality of a traditional salted-fermented fish (Hout-Kasef) product of Jazan Region, Saudi Arabia. Saudi Journal of Biological Sciences. 2019; 26: 137–140. DOI: https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.04.003

10. Takashi K, Okamoto K, Toshihiro Y. Population of halophilic bacteria in salted fish products made in the Loochoo Islands, Okinawa and the Noto Peninsula, Ishikawa, Japan. Japan fisheries science. 2002; 68: 1265–1273. DOI: https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2002.00564.x

11. Tanasupawat S, Chamroensaksri N, Kudo T, Itoh T. Identification of moderately halophilic bacteria from Thai fermented fish (pla-ra) and proposal of *Virgibacillus* siamensis sp. nov. Journal of General and Applied Microbiology. 2010; 56: 369-379. DOI: 10.2323/jgam.56.369

12. Wattimena C, Felsdian I, Belegur Monica Kailola, Edwin T. The Effect of Salt Concentration and Incubation Time on Protein Content and Bacteria Number of Cakalang Fish (*Katsuwonus pelamis*) Ina sua Synodalia. The Pharmaceutical and Chemical Journal. 2017; 4(6):99-106.

13. Felix M, Czerner M, Ameztoy I, Ramírez E, Yeannes M. Investigation of *Halococcus morrhuae* in salted-ripened anchovy products. International Food Research Journal. 2016; 23(6): 2668-2674.

14. Jung J, Lee H, Chun B, Jeon C. Effects of temperature on bacterial communities and metabolites during fermentation of myeolchi-aekjeot, a traditional korean

fermented anchovy sauce. Plos one. 2016; 11(3). DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151351

15. Belfiore C, Raya R, Graciela M. Identification, technological and safety characterization of *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* isolated from Argentinean anchovies (*Engraulis anchoita*). Springer Plus Journal. 2013; 2:257. DOI: https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-257

16. El Filali F, Hanoune S, Moukrim A, Kaaya A, Bou'mhandi N. Histamine, and microbiological changes during storage of semi-preserved anchovies. African Journal of microbiology research. 2016; 10(35): 1455-1459. DOI: https://doi.org/10.5897/AJMR2014.6972.

17. Pascual J, Maciá M, Arahal D, Garay E, Pujalte M. Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, recA, pyrH, rpoD, gyrB, rctB and toxR genes Int. Journal System Evolution Microbiology. 2010; 60:154-165. DOI: 10.1099/ijs.0.010702-0

18. Pulache Roque, Isabeli. Identificación de cepas bacterianas cultivables presentes en *Scomber japonicus peruanus* salada utilizando un fragmento del gen 16S ARNr. (Tesis para optar al grado de Ingeniera Pesquera); Universidad de Tumbes. 2018.

19. Oishi Das, Sanath H. Kumar, Binaya Bhusan Nayak. Relative abundance of halophilic archaea and bacteria in diverse salt-fermented fish products. 2019. DOI: https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108688

20. IMARPE. Crucero de evaluación de biomasa desovante de la anchoveta por el método de producción de huevos (MPH). Invierno 2003, 2004, 2005. Informe Instituto Mar Perú. 2007; 35(3): 280.

21. Ordóñez L, Hernández E. Efecto del proceso de elaboración de la conserva "desmenuzado de anchoveta" (*Engraulis ringens*) sobre los ácidos grasos poliinsaturados omega 3. Ciencia e Investigación. 2014; 17(1): 27-32.

22. Gutiérrez-Estrada J, Silva C, Yáñez E, Rodríguez N, Pulido-Calvo I. Monthly catch forecasting of anchovy *Engraulis ringens* in the north area of Chile: nonlinear univariate approach. Fisheries Research. 2007; 86, 2-3: 188-200. DOI: https://doi.org/10.1016/j.fishres.2007.06.004.

23. Medina M, Herrera L, Castillo J, Jaque J, Pizarro N. Alimentación de la anchoveta en el norte de Chile. Lat. Am. Journal Aquatic 2015; Res., 43(1): 46-58. DOI: http://dx.doi.org/10.3856/vol43-issue1-fulltext-5.

24. Espinoza, P. y Bertrand, A. Revisiting Peruvian anchovy (*Engraulis rongens*) trophodynamics provides a new vision on the Humboldt current system. Progress in Oceanography. 2008; 79, 215-227. DOI: DOI:10.1016/J.POCEAN.2008.10.022

25. SUBPESCA. Plan de manejo para la pesquería de sardina común y anchoveta V a la X regiones. Gobierno de Chile, Subsecretaría de Pesca y Acuicultura. 2016.

26. Bouchon M, Ayón P, Mori J, Peña C, Espinoza P, Hutchings L, Buitrón B, Perea A, Goicochea C, Messie M. Biología de la anchoveta peruana (*Engraulis ringens* Jenyns), Boletín Instituto del Mar del Perú. 2010; 25(1-2): 23-30.

27. Mori J, Buitrón B, Perea A, Peña C, Espinoza C. Variabilidad interanual en la estrategia reproductiva de la anchoveta peruana en la región norte-centro del litoral del Perú, Ciencias Marinas. 2011; 37(4B): 513–525.

28. Claramunt G, Castro L, Cubillos L, Hirche H, Pérez G, Braun M. Variaciones interanuales en aspectos reproductivos y preferencias por el sitio de desove en *Engraulis ringens* del norte de Chile. Revista de Biología Marina y Oceanografía. 2012; 47(2): 227-243.

29. Hernández-Santoro C, Pérez G, Díaz E, Bohm G. Analysis of macro and microscopic indicators to establish the period of maximum intensity of spawning

of anchovy Engraulis ringens of northern Chile. Revista de Biología Marina Y Oceanografía. 2013; 48(3):451-457.

30. Cuevas M, Górski K, Castro L 2, Vivancos A, Reid M. Otolith elemental composition reveals separate spawning áreas of anchoveta, Engraulis ringens, off central Chile and northern Patagonia. 2019; Scientia Marina 83(4): 317-326. DOI: https://doi.org/10.3989/scimar.04918.28A

31. Contreras JE, Rodriguez-Valentino C, Landaeta MF, Plaza G, Castillo MI, Alvarado-Niño M. Growth and mortality of larval anchoveta Engraulis ringens, in northern Chile during winter and their relationship with coastal hydrographic conditions. Fisheries Oceanography. 2017 nov.; 26(6):603-614. DOI: https://doi.org/10.1111/fog.12219

32. Plaza, G., Honda, H., Sakaji, H. & Nashida, K. Preparing fish sagittae for examination of daily growth increments of young-of-the-year fishes: a modification of the embed method. 2005; Journal of Fish Biology. 66, 592– 597.

33. Czerner M, María Isabel. Bacterial Contribution to Salted Anchovy (Engraulis Anchoita Hubbs & Marinni 1935. Journal of Aquatic Food Product Technology. 2014; 23 (2). DOI: https://doi.org/10.1080/10498850.2012.697537

34. PROMPERÚ (Promoción del Perú para la Exportación y el Turismo). Desenvolvimiento del comercio exterior pesquero en el Perú. Lima, Perú. Informe final 2018;1-86.

35. Mendoza R, Berger C. Informe anual 2018: Desenvolvimiento del comercio exterior pesquero y acuícola en el Perú. Departamento de Productos Pesqueros de la Sub Dirección de Promoción Internacional de la Oferta Exportable, PROMPERÚ. 2018.

36. SIICEX (Sistema Integrado de Información de Comercio Exterior). Estadísticas de exportaciones. 2018

37. Novoslavskij A, Terentjeva M, Eizenberga I, Valciņa O, Bartkevičs V, Bērziņš A. Major foodborne pathogens in fish and fish products: a review. Annals of Microbiology. 2016; 66, 1:15. DOI:10.1007/s13213-015-1102-5

38. Pal M, Ayele Y, Patel A, Dulo F. Microbiological and hygienic quality of Meat and Meat Products Mahendra. Beverage & food world. 2018; 45,21:23.

39. Sheng L y Wan L. The microbial safety of fish and fish products: Recent advances in understanding its significance, contamination sources, and control strategies. Comprehensive reviews in food science and food safety. 2020; 20: 738-786. DOI: https://doi.org/10.1111/1541-4337.12671

40. Comi G. The Microbiological Quality of Food. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. 2017; 179-210.

41. Saritha K, Immaculate J, Jamila P. Quality of tomato hind fish (Cephalopholis sonnerati) at different stages of post-harvest processing. International Journal of Research in Medical and Health Sciences. 2014; 4(4): 30-42.

42. FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2010.Departamento de Pesca de la FAO, Roma-Italia. 2010; 242.

43. INDECOPI (Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual, Perú). Anchoas en salazón y envasadas: Requisitos Norma Técnica Peruana NTP 204.056:2013. Lima, Perú. 5 Nov. 2013; 15.

44. Karan R, Kumar S, Sinha R, Khare, S. Halophilic microorganisms as sources of novel enzymes. In Satyanarayana, T. (ed.), Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology: Springer. 2012. DOI 10.1007/978-94-007-2214-9_25.

45. Margesin R, Schinner F. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. Extremophiles. 2001; 5: 73-83. DOI: 10.1007/s007920100184

46. Agu K, Nmecha C, Nwaiwu M, Ikedinma J, Awah N, Eneite H, Victor-Aduloju A, Umeoduagu N, Onwuatuegwu J. Isolation and Characterization of Halotolerant Bacteria from Ezzu River Amansea, Awka, Anambra State Bioengineering and Bioscience. 2017; 5(4): 86-90. DOI: 10.13189/bb.2017.050404

47. Hernández-herrero M. Influencia de la calidad higiénica del boquerón (Engraulis encrasicholus var. Mediterraneus) en la maduración de la anchoa. (Tesis para optar el grado de Doctor). Universidad Autónoma de Barcelona. 1997.

48. SANIPES. Toma y envío de muestras pesqueras. Resolución Directoral N°002-2017-SANIPES-DSNPA.

49. APHA. Microorganismos Halófilos (ligeramente halófilos, halófilos moderados y halotolerantes). 4ta edición. Chapter 17.

50. INDECOPI. Control de Esterilidad. NTP 204.009: 1986. (Revisada el 2010) 1ª ed.

51. ISO 9308-1. Detección y recuento de Escherichia coli y bacterias coliformes. Amd.1.2016.

52. ISO 6579-1. Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de Salmonella spp. Parte 1: Detección de Salmonella spp. 2017.

53. Mc Faddin JF. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Médica Panamericana. Buenos Aires. 1980.

54. FDA /BAM. Numeración de microorganismos Aerobios mesófilos viables. Método Recuento en placa. FDA /BAM Online 8th Ed. Rev. A / 1998. Revised: January 2001 Chapter 3.

55. Cowan S, Steel L. Manual for the Identification of Medical Bacteria, 3a ed. Cambridge University Press, UK. 1993.

56. Collins C, Lyne P. Métodos microbiológicos. Editorial Acribia; Zaragoza. 1989.

57. Kirby W, Bauer A, Sherris J, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology. 1966; 45: 493-496.

58. Chávez-Hidalgo E. Bacterias halófilas moderadas con actividad lipolítica aisladas de las salinas de Pilluana – San Martin (tesis para optar el grado de magíster) Lima: Facultad de Farmacia y Bioquímica - UNMSM. 2010.

59. Sumitha D, Preetha D, Joseph C. Functional Properties of Halophilic Bacteria Isolated from Fermented Foods. Indian Journal of Applied Microbiology. 2018; 21(1): 37-45.

60. Pérez Silvina. Estudio de la cinética de bacterias halófilas presentes en la maduración de Engraulis anchoita involucradas en la transformación de histidina/histamina (tesis para obtener el grado de doctor). Universidad Nacional de la Plata. 2018.

61. Talon R., Leroy S. Fermented Meat Products and the Role of Starter Cultures. Elsevier Ltd. INRA, Saint-Genès Champanelle. 2014. DOI:10.1016/B978-0-12-384730-0.00116-6

62. SANIPES. Indicadores sanitarios y de inocuidad para los productos pesqueros y acuícolas para mercado nacional y de exportación. Resolución de Dirección Ejecutiva Nº 057-2016-SANIPES-DE.2016.

63. Cojoc R, Merciu S, Popescu G, Dumitru L, Kamekura M, Enache M. Extracellular hydrolytic enzymes of halophilic bacteria isolated from a subterranean rock salt cristal. Romanian Biotechnological Letters. 2019; (14): 5, 4658-4664.

64. Xin Li y Ying Hui Yu. Biodiversity and screening of halophilic bacteria with hydrolytic and antimicrobial activities from Yuncheng Salt Lake, China. Biologia. 2015; 70: 151–156. DOI: https://doi.org/10.1515/biolog-2015-0033

65. Jae-Hyung, Mah Young-Hyo Chang, Han-Joon, Hwang. *Paenibacillus tyraminigenes sp*. nov. isolated from Myeolchi-jeotgal, a traditional Korean salted and fermented anchovy. International Journal of Food Microbiology.2008;127(3):209-214. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.002

66. Singh, S.K., Tripathi, V.R., Jain, R.K., Vikram, S., and Garg, S.K. An antibiotic, heavy metal resistant and halotolerant *Bacillus cereus* SIU1 and its thermoalkaline protease. 2010; Singh et al. Microbial Cell Factories. 9:59. DOI: https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-59

67. Nashwa A. Ezzeldeen, Hayam A. Mansour and Abeer A. Ahmed. Phenotypic and Molecular Identification of *Staphylococcus aureus* Isolated from Some Egyptian Salted Fish. World Applied Sciences Journal. 2011; 15 (12): 1703-1712.

68. Elyasifar B, Jafari S, Hallaj-Nezhadi S, Chapeland-Leclerc F, Ruprich-Robert G., Dilmaghani A. Isolation and Identification of Antibiotic-Producing Halophilic Bacteria from Dagh Biarjmand and Haj Aligholi Salt Deserts, Iran. Pharmaceutical Sciences. 2019; 25: 70-77. DOI: 10.15171/PS.2019.11

69. Puig Peña, Y., Leyva Castillo, V., Aportela López, N. et al. Resistencia antimicrobiana en bacterias aisladas de pescados y mariscos. Revista Habanera De Ciencias Médicas. 2019; 18(3): 500-512.

70. Zhang H, K Xu, J Wu, Z. Dai. Microbiological changes and Biodiversity of cultivable indigenous bacteria in Sanbao Larger Yellow Croaker (*Pseudosciaena crocea*), a Chinese Salted and Fermented Seafood. Journal of Food Science. 2015. DOI: 10.1111/1750-3841.12818.

71. Guan L., K. H. Cho, J.-H. Lee. Analysis of the Cultivable Bacterial Community in Jeotgal, a Korean Salted and Fermented Seafood, and Identification of Its Dominant Bacteria, Food Microbiology. 2011; 28 (1): 101-13. DOI: 10.1016/j.fm.2010.09.001

72. López C. Análisis filogenético y genómico del género Salinivibrio. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla. 2017.

73. López-Hermoso C, R. R. de la Haba, C. Sánchez-Porro, A. Ventosa. Salinivibrio Kushneri Sp. Nov., a Moderately Halophilic Bacterium Isolated from Salterns. Systematic and Applied Microbiology. 2018; 41 (3): 159-66. DOI: 10.1016/j.syapm.2017.12.001

74. Spergser J, M. Wieser, M. Täubel, R. A. Rossello-Mora, R. Rosengarten, B. Hans-Jürgen. Staphylococcus nepalensis sp. Nov., isolated from goats of the Himalayan region. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2003; 53, 2007–2011. DOI: 10.1099/ijs.0.02646-0

75. Whitman W, Rainey F, Kämpfer P. et al. (Eds). Sporosarcina. In Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015.

76. Liu W, Yang S. Oceanobacillus aidingensis sp. nov., a moderately halophilic bacterium, Antonie van Leeuwenhoek. 2014; 105(5): 801–808. DOI: 10.1007/s10482-014-0128-1.

77. Romanenko L. Psychrobacter maritimus sp. nov. and Psychrobacter arenosus sp. nov., isolated from coastal sea ice and sediments of the Sea of Japan. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2004; 54(5): 1741–1745. DOI:10.1099/ijs.0.63096-0

78. Das P, Behera B, Chatterjee S, et al. De novo transcriptome analysis of halotolerant bacterium Staphylococcus sp. strain P-TSB-70 isolated from East coast of India: In search of salt stress tolerant genes, Public Library of Science one. 2020; 15: 1-28. DOI: 10.1371/journal.pone.0228199

79. Onyango L, Alreshidi M. Adaptive Metabolism in Staphylococci: Survival and Persistence in Environmental and Clinical Settings. Journal of Pathogens. 2018, 1–11. DOI: https://doi.org/10.1155/2018/1092632

80. Carlin F, Brillard J, Broussolle V. Adaptation of Bacillus cereus, a ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. Food Research International (Ottawa, Ont.). 2010; 43(7): 1885-1894. DOI: 10.1016/j.foodres.2009.10.024

81. Ji C, Zhang J, Lin X, Han J, Dong X, Yang S, Yan X, Zhu B. Metaproteomic analysis of microbiota in the fermented fish, Siniperca chuatsi. LWT Food Sci. Technol. 2017; 80: 479 - 484. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.03.022