

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**INFORME DE PRACTICA DE ESPECIALIDAD**

**UTILIZACIÓN DE *Lactobacillus acidophilus* COMO AGENTE  
ANTAGÓNICO PARA EL CONTROL DE *Salmonella enteritidis* EN  
PESCADO.**

**UNIVERSIDAD NACIONAL, ESTACION DE BIOLOGÍA MARINA,  
PUNTARENAS**

**Edna Leonie Lord Arroyo**

**CARTAGO, 2002**

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**INFORME DE PRACTICA DE ESPECIALIDAD**

**UTILIZACIÓN DE *Lactobacillus acidophilus* COMO AGENTE  
ANTAGÓNICO PARA EL CONTROL DE *Salmonella enteritidis* EN  
PESCADO.**

**UNIVERSIDAD NACIONAL, ESTACION DE BIOLOGÍA MARINA,  
PUNTARENAS**

**Edna Leonie Lord Arroyo**

**CARTAGO, 2002**

**UTILIZACIÓN DE *Lactobacillus acidophilus* COMO AGENTE  
ANTAGÓNICO PARA EL CONTROL DE *Salmonella enteritidis* EN  
PESCADO.**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de  
Costa Rica como requisito parcial para optar al título de Bachiller en  
Ingeniería en Biotecnología.**

**Miembros del Tribunal**

---

**Dra. Virginia Montero,  
Profesora Guía**

---

**Bch. Cristian Fonseca,  
Representante de la Institución**

---

**Msc. Johnny Peraza,  
Lector**

# UTILIZACIÓN DE *Lactobacillus acidophilus* COMO AGENTE ANTAGÓNICO PARA EL CONTROL DE *Salmonella enteritidis* EN PESCADO.

Edna Leonie Lord Arroyo<sup>†</sup>

## RESUMEN

El género *Lactobacillus sp* se ha caracterizado en los últimos años por tener gran importancia como antagonista de diferentes bacterias patógenas. La bacteria entérica *Salmonella enteritidis* es un patógeno común en los alimentos y está directamente relacionada con las intoxicaciones alimentarias provocando graves problemas en la salud humana.

Se realizó una evaluación preliminar de la capacidad antagonica del *Lactobacillus acidophilus* contra *Salmonella enteritidis* en pescado. La evaluación se realizó para tres variables: Confrontación directa bacteria con bacteria, sobrenadante de *L. acidophilus* con bacteria y efecto del *Lactobacillus acidophilus* sobre el pescado. Se demostró que la actividad antagonica para la primera variable, está limitada a la reducción del pH, no se obtuvo actividad antagonica para la segunda variable y para la tercera variable se encontró que la disminución en el pH de las muestras de sardina (*Sardinella anchovia*) por la acción del *L. acidophilus* ocasionó una aceleración del deterioro del producto.

En la evaluación de bacteria contra bacteria, se comprobó que la actividad inhibitoria se daba sólo a concentraciones altas de *Lactobacillus acidophilus*, alrededor de  $10^7$ UFC/ml. También se observó que la adición de diferentes volúmenes de una concentración de  $10^7$ UFC/ml de *Lactobacillus acidophilus* a la carne de pescado almacenada a condiciones de temperatura habituales en la pesca artesanal, acelera el proceso de descomposición del producto.

**Palabras clave:** *Lactobacillus acidophilus*, *Salmonella enteritidis*, Antagonismo Bacteriano, Control Biológico.

---

<sup>†</sup> Informe de Práctica de Especialidad, Escuela de Biología, Ingeniería en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2002.

## **DEDICATORIA**

A mis padres por su apoyo incondicional durante mis estudios, a Dios por darme la fuerza necesaria para seguir adelante y a Frank por apoyarme en todos los momentos.

Edna

## **AGRADECIMIENTOS**

La autora desea dejar constancia de su agradecimiento a los siguientes organismos, por su colaboración en el presente trabajo:

A la Estación de Biología Marina de la Universidad Nacional, por el apoyo brindado en el suministro de reactivos, instalaciones, equipos y material bibliográfico para la ejecución del proyecto.

A los funcionarios de la Estación de Biología Marina de la Universidad Nacional, muy especialmente a el Biólogo Cristian Fonseca por su apoyo incondicional durante la ejecución del proyecto.

A los miembros del Tribunal evaluador, por su valiosa cooperación, y muy especialmente a la Dra. Virginia Montero, profesora consejera, por sus valiosos aportes y sugerencias.

## INDICE GENERAL

<i>RESUMEN</i> .....	<i>i</i>
<i>DEDICATORIA</i> .....	<i>ii</i>
<i>AGRADECIMIENTOS</i> .....	<i>iii</i>
<i>INDICE GENERAL</i> .....	<i>iv</i>
<i>INDICE DE CUADROS</i> .....	<i>vi</i>
<i>INDICE DE FIGURAS</i> .....	<i>vii</i>
<i>INDICE DE ANEXOS</i> .....	<i>viii</i>
<i>INTRODUCCIÓN</i> .....	<i>9</i>
<i>REVISION DE LITERATURA</i> .....	<i>11</i>
<b>Problemática del sector pesquero costarricense</b> .....	<b>11</b>
<b>Consecuencias de las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) ....</b>	<b>11</b>
<b>Importancia de la <i>Salmonella sp</i> entre las ETA</b> .....	<b>12</b>
<b>Características generales de la <i>Salmonella sp</i></b> .....	<b>12</b>
<b>Importancia de la utilización de <i>Lactobacillus acidophilus</i> como biopreservante en pescado</b> .....	<b>13</b>
<b>Efectos antagónicos de las bacterias ácido lácticas</b> .....	<b>14</b>
<b>Bioconservación</b> .....	<b>14</b>
<b>Situación actual y expectativas de los antimicrobianos naturales</b> .....	<b>15</b>
<i>OBJETIVO GENERAL</i> .....	<i>16</i>
<i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i> .....	<i>16</i>
<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i> .....	<i>18</i>
<b>CONFRONTACIÓN DIRECTA BACTERIA/BACTERIA</b> .....	<b>18</b>
<b>Preparación de las placas con el medio de cultivo:</b> .....	<b>18</b>
<b>Preparación del inóculo:</b> .....	<b>18</b>
<b>Siembra en placas</b> .....	<b>19</b>
<b>Preparación de los discos</b> .....	<b>19</b>
<b>Aplicación de los discos</b> .....	<b>19</b>
<b>Medida de las zonas de inhibición:</b> .....	<b>19</b>
<b>CONFRONTACION DIRECTA SOBRENADANTE DE <i>Lactobacillus acidophilus</i> /BACTERIA</b> .....	<b>20</b>

<b>Producción de bacteriocinas en medio líquido .....</b>	<b>20</b>
<b>Ensayo de la actividad de la Bacteriocina .....</b>	<b>21</b>
<b>EFECTOS DEL <i>Lactobacillus acidophilus</i> EN PESCADO .....</b>	<b>21</b>
<b>Control de Calidad .....</b>	<b>21</b>
<b>Determinaciones Físicas .....</b>	<b>21</b>
<b>Determinaciones químicas .....</b>	<b>22</b>
<b><i>RESULTADOS</i> .....</b>	<b>24</b>
<b>    CONFRONTACIÓN DIRECTA BACTERIA/BACTERIA .....</b>	<b>24</b>
<b>    PRUEBAS DE ANTAGONISMO EN GELATINA NUTRITIVA .....</b>	<b>35</b>
<b>    EFECTOS DEL <i>Lactobacillus acidophilus</i> EN EL PESCADO .....</b>	<b>36</b>
<b><i>DISCUSION</i> .....</b>	<b>50</b>
<b>    CONFRONTACIÓN DIRECTA BACTERIA/BACTERIA .....</b>	<b>50</b>
<b>    EFECTOS DEL <i>Lactobacillus acidophilus</i> EN EL PESCADO .....</b>	<b>52</b>
<b><i>CONCLUSIONES</i> .....</b>	<b>56</b>
<b><i>RECOMENDACIONES</i> .....</b>	<b>57</b>
<b><i>BIBLIOGRAFÍA</i> .....</b>	<b>60</b>
<b><i>ANEXOS</i>.....</b>	<b>62</b>

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Clasificación por puntaje de la evaluación sensorial que se utilizó para el control de calidad de Sardina ( <i>Sardinella anchovia</i> ). _____	22
<b>Cuadro 2.</b> Medida en milímetros de los halos de inhibición obtenidos según la concentración de <i>Lactobacillus acidophilus</i> vrs <i>Salmonella enteritidis</i> . _____	24
<b>Cuadro 3.</b> Eficiencia antagónica del <i>Lactobacillus acidophilus</i> sobre la <i>Salmonella enteritidis</i> . _____	25
<b>Cuadro 4.</b> Valor de pH en la zona de inhibición según la concentración de <i>Lactobacillus acidophilus</i> vrs <i>Salmonella enteritidis</i> . _____	28
<b>Cuadro 5.</b> Variaciones de pH y diámetro en los halos de inhibición a través del tiempo _____	30
<b>Cuadro 6.</b> Medida del halo de inhibición (mm) a través del tiempo según la concentración de <i>Lactobacillus acidophilus</i> vrs <i>Salmonella enteritidis</i> (UFC/ml). _____	32
<b>Cuadro 7.</b> Evaluación sensorial de la sardina ( <i>Sardinella anchovia</i> ) inoculada con 1 ml ( $10^7$ UFC/ml) de <i>Lactobacillus acidophilus</i> y preservada en refrigeración ( $10^{\circ}\text{C}$ ), entera (EN) y eviscerada (EV). _____	36
<b>Cuadro 8.</b> Evaluación sensorial de la sardina ( <i>Sardinella anchovia</i> ) en los tratamientos con 1 y 2 ml ( $10^7$ UFC/ml) de <i>Lactobacillus acidophilus</i> preservada en hielo ( $10-15^{\circ}\text{C}$ ), entera (EN) y eviscerada (EV). _____	39
<b>Cuadro 9.</b> Evaluación sensorial de la Sardina ( <i>Sardinella anchovia</i> ) patrón almacenada a una temperatura de $10^{\circ}\text{C}$ (hielo y refrigerada), entera (EN) y eviscerada (EV). _____	41
<b>Cuadro 10.</b> Evaluación sensorial promedio en todos los tratamientos (1-5ml UFC/ml de <i>Lactobacillus acidophilus</i> ) durante 72 horas, de la sardina ( <i>Sardinella anchovia</i> ) congelada y mantenida a $-14$ , $-18$ , $-21$ y $-24^{\circ}\text{C}$ _____	43
<b>Cuadro 11.</b> pH promedio de las muestras de Sardina ( <i>Sardinella anchovia</i> ) enteras (EN) y esviceradas (EV) mantenidas en hielo ( $10-15^{\circ}\text{C}$ ) y refrigeración a $10^{\circ}\text{C}$ según el volumen agregado de <i>Lactobacillus acidophilus</i> [ $10^7$ UFC/ml]. _____	46

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Porcentaje de eficiencia antagónica del <i>Lactobacillus acidophilus</i> sobre la <i>Salmonella enteritidis</i> . _____	26
<b>Figura 2.</b> Invasión de <i>Salmonella enteritidis</i> en el césped de papel filtro con <i>Lactobacillus acidophilus</i> . _____	27
<b>Figura 3.</b> Variaciones de pH según la concentración de <i>Lactobacillus acidophilus</i> vrs <i>Salmonella enteritidis</i> (UFC/ml) a través del tiempo. _____	29
<b>Figura 4.</b> Relación entre el pH y los halos de inhibición para un periodo de 72 horas. _____	31
<b>Figura 5.</b> Halo de inhibición de 16mm obtenido con una concentración de $10^7$ UFC/ml de <i>Lactobacillus acidophilus</i> vrs $10^1$ UFC/ml de <i>Salmonella enteritidis</i> . ____	33
<b>Figura 6.</b> Halo de inhibición de 14mm obtenido con una concentración de $10^7$ UFC/ml de <i>Lactobacillus acidophilus</i> vrs $10^2$ UFC/ml de <i>Salmonella enteritidis</i> . ____	34
<b>Figura 7.</b> Ausencia de halo de inhibición obtenida con una concentración de $10^6$ UFC/ml de <i>Lactobacillus acidophilus</i> vrs $10^3$ UFC/ml de <i>Salmonella enteritidis</i> . ____	35
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de Calidad obtenido en las muestras de Sardina ( <i>Sardinella anchovia</i> ) enteras y esviceradas inoculadas con 1 ml de <i>L. acidophilus</i> [ $10^7$ UFC/ml] durante 72 horas en refrigeración a $10^{\circ}\text{C}$ . _____	38
<b>Figura 9.</b> Porcentaje de Calidad obtenido en las muestras de Sardina ( <i>Sardinella anchovia</i> ) enteras y esviceradas inoculadas con 1 y 2ml de <i>L. acidophilus</i> [ $10^7$ UFC/ml] durante 72 horas en hielo entre $10-15^{\circ}\text{C}$ . _____	40
<b>Figura 10.</b> Porcentaje de Calidad obtenido en las muestras patrón de Sardina ( <i>Sardinella anchovia</i> ) enteras y esviceradas durante 72 horas en hielo entre $10-15^{\circ}\text{C}$ y refrigeración a $10^{\circ}\text{C}$ . _____	42
<b>Figura 11.</b> Porcentaje de Calidad obtenido en las muestras de Sardina ( <i>Sardinella anchovia</i> ) inoculadas con volúmenes de 1-5ml de <i>L. acidophilus</i> a través de 72 horas de congelación a $-14,-18,-21$ y $-24^{\circ}\text{C}$ . _____	45
<b>Figura 12.</b> Valores de pH promedio en las muestras de Sardina ( <i>Sardinella anchovia</i> ) enteras (EN) y esviceradas (EV) mantenidas en hielo ( $10-15^{\circ}\text{C}$ ) y	

*refrigeración a 10°C según el volumen agregado de Lactobacillus acidophilus*  
*[10<sup>7</sup>UFC/ml]. \_\_\_\_\_ 47*

## **INDICE DE ANEXOS**

*Anexo 1. Esquema de clasificación utilizado en la evaluación organoléptica de*  
*sardina (Sardinella anchovia). \_\_\_\_\_ 63*

# UTILIZACIÓN DE *Lactobacillus acidophilus* COMO AGENTE ANTAGÓNICO PARA EL CONTROL DE *Salmonella enteritidis* EN PESCADO.

## INTRODUCCIÓN

El pescado y los mariscos representan una importante fuente de contaminación y por ende de transmisión de microorganismos patógenos; esto como consecuencia de un deficiente control sanitario. Bacterias como la *Salmonella enteritidis* son responsables de problemas de intoxicación alimentaria.

En los últimos años, las familias puntarenenses cuyo sustento depende de la pesca artesanal, han lanzado un llamado de auxilio solicitando ayuda para que puedan producir alimentos seguros para el consumidor; como consecuencia de los escasos recursos de estas personas, se hace necesario encontrar una solución rápida y asequible. Por esto la Estación de Biología Marina de la Universidad Nacional, pretende desarrollar una opción práctica y saludable para los pescadores artesanales, que no involucre la adición de sustancias químicas, ya que podrían ocasionar un rechazo del producto por parte de los compradores además de muchos problemas agregados de manipulación y elevar los costos de su procesamiento.

Por otra parte, se pretende que con la utilización de *Lactobacillus acidophilus* como agente antagónico y por su considerable producción de bacteriocinas y ácido láctico, se pueda combatir la contaminación por *Salmonella enteritidis*, y aumentar el valor agregado de los productos, siendo estos más atractivos y saludables.

Existen a la fecha innumerables reportes de investigaciones que demuestran los beneficios por el consumo de probióticos, aunque es necesario enfatizar que no todos los microorganismos tienen el mismo efecto benéfico, por lo que es importante que se analice con mayor profundidad a cada uno de ellos.

Hay que destacar que en la bibliografía actual no se encuentran estudios que demuestren efectos perjudiciales con la administración de bacterias ácido lácticas y probióticas en personas sanas y en las distintas enfermedades estudiadas.

En algunos países europeos y en Japón, el consumo de probióticos es común y se han utilizado como profilácticos de enfermedades diarreicas desde hace muchos años. Sin embargo en occidente el consumo de éstos productos es reciente y los primeros probióticos llegan del viejo continente en forma de yogurt, leches fermentadas, quesos, fórmulas infantiles, bebidas de jugos, entre otros.

Los alimentos funcionales con probióticos pueden ser un elemento importante para mantener un buen estado de salud, así como la prevención de enfermedades.

## REVISION DE LITERATURA

### **Problemática del sector pesquero costarricense**

El sector pesquero, es una importante fuente de empleo e ingresos en el mundo en desarrollo. La pesca artesanal incrementa la seguridad alimentaria de las familias, no sólo por los ingresos que produce, sino también gracias a los descartes que van a dar a la mesa familiar. La pesca a menudo es una ocupación de temporada, en auge cuando los recursos costeros y de alta mar son más abundantes (FAO, 1996).

Actualmente alrededor del mundo muchas familias viven dedicadas a la pesca artesanal, formando las llamadas comunidades pesqueras. Una "comunidad pesquera" se define como aquel lugar identificado por las Administraciones Nacionales de los países, en donde se concentra un número no menor de diez pescadores artesanales. Para 1995 Costa Rica presentaba unas 69 comunidades pesqueras, esto es equivalente a 92 876 personas que se dedicaban directamente a la pesca artesanal. Del total de estos pescadores artesanales, el 85% son pescadores de mar, de los cuales el 72% pesca en el Pacífico y apenas un 28% en el Atlántico (PRADEPESCA, 1995).

En los últimos años, estas comunidades pesqueras han enfrentado serios problemas en la aceptación de sus productos debido a que no cuentan con los sistemas de higiene y congelación necesarios para garantizar un buen producto (PRADEPESCA, 1995).

Como consecuencia de lo anterior se ha dado un aumento de brotes de enfermedades por el consumo de mariscos crudos o insuficientemente cocinados. Entre las bacterias patógenas que se presentan en los productos pesqueros como resultado de la contaminación a partir de reservorios animal/humano está la *Salmonella enteritidis* (Sockett, 1995).

### **Consecuencias de las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA)**

Las enfermedades transmitidas por alimentos constituyen hoy en día probablemente uno de los mayores problemas de salud pública en el mundo contemporáneo y causa importante de baja o falta de productividad económica (Morán, 2000).

El control y prevención de las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) es un desafío actual en el ámbito mundial dado que no se conoce su real incidencia. La OMS ha estimado que, dependiendo del país, entre el 15% y el 70% de los casos de diarrea en menores de 5 años de edad se debe a alimentos contaminados. Se estima que el 60% de los brotes de ETA son de etiología desconocida. De las conocidas, las materias primas de origen animal son las que con más frecuencia parecen estar involucradas y en las que en la mayoría de los casos se deben a la presencia de bacterias. La diarrea de los viajeros afecta del 20% al 50% de los extranjeros que viajan a América Latina y el Caribe (Morán, 2000).

### **Importancia de la *Salmonella sp* entre las ETA**

Algunas enfermedades transmitidas por los alimentos, si bien son conocidas, se consideran emergentes porque están ocurriendo con mayor frecuencia y han ocasionado brotes epidémicos en varios países. Entre ellas se destacan la *Salmonella enteritidis* (Morán, 2000).

Durante el periodo de 1995-1999 en 21 países de América latina y el Caribe fueron reportados 4 234 brotes de ETA que afectaron a 142 639 personas de las cuales 240 fallecieron. Costa Rica reportó un total de 110 afectados. Con relación al agente etiológico, el 55% de los brotes fue como consecuencia de un agente microbiano, de este 55%, el 33.2% se dio por infecciones por *Salmonella sp*. El alimento asociado al brote fue identificado en 3 226 casos (76.2%), constatándose que el pescado fue el alimento más frecuentemente involucrado (27.8%) (Morán, 2000).

### **Características generales de la *Salmonella sp***

El nicho ecológico de la mayoría de los microorganismos patógenos entéricos (*E. coli*, *Salmonella sp.*, .), es el intestino del hombre, los pájaros y los mamíferos. La ocurrencia en el pescado y los productos pesqueros ha sido asociada con la contaminación fecal, ya sea por contaminación del medio acuático natural donde estos organismos pudieran sobrevivir durante meses a temperatura ambiente, o por contaminación durante el procesamiento (Arroyo, 1995).

Se han descrito más de 2 375 serovares de *Salmonella*, que finalmente pertenecen al mismo género en base a su gran identidad en el genoma, de 90% o más. El género *Salmonella* es el agente causal de diferentes

infecciones intestinales, conocidas como salmonelosis. La salmonelosis humana puede dividirse en dos síndromes (Ramos,1997):

1) La fiebre entérica, que incluye la fiebre tifoidea causada por *S. typhi*, y la fiebre paratifoidea que es patológica y clínicamente similar a la tifoidea pero con síntomas menos fuertes, causada por *S. paratyphi* A, B, o C. La fiebre entérica implica una infección sistémica, debido a la invasividad de la bacteria.

2) La gastroenteritis o envenenamiento por alimentos, la cual es la más común de las infecciones, causada por muchos serotipos. Este tipo de infecciones no es acompañada de una infección sistémica. Los serotipos más comunes en la salmonelosis no-tifoidea son *S. typhimurium* y *S. enteritidis*.

Puede también ocurrir una invasión sistémica sin gastroenteritis, sobre todo en individuos inmunocomprometidos, como en el caso de las infecciones intra-hospitalarias. Asimismo, sobre todo para la fiebre tifoidea, puede establecerse la condición de portador asintomático (Ewing, 1986).

### **Importancia de la utilización de *Lactobacillus acidophilus* como biopreservante en pescado**

Conociendo la importancia que tiene la presencia de *Salmonella* en pescado para la salud del consumidor y teniendo en cuenta que el criterio microbiológico internacional de aceptabilidad para este microorganismo patógeno es su ausencia en 25 g del producto, es necesario encontrar alternativas para combatir esta bacteria, es por tanto que surge la posibilidad de utilizar *Lactobacillus* como agente antagonico contra la *Salmonella sp* (Lee, 1993).

Por lo anteriormente mencionado, es de gran importancia utilizar aditivos naturales en los productos alimentarios, que para este efecto denominaremos “biopreservantes”, que además de realizar un efecto antagonico frente a la *Salmonella*, enriquezcan nuestra flora intestinal ayudando en los procesos digestivos. Las bacterias ácido lácticas (LAB) son reconocidas por jugar un papel muy importante en las fermentaciones alimentarias y en la preservación de alimentos (Liepe,1993).

Además de los roles mencionados anteriormente, las LAB también incrementan la higiene y seguridad de los alimentos como consecuencia de la inhibición por competición con bacterias patógenas (Schillinger, 1990).

## **Efectos antagónicos de las bacterias ácido lácticas**

El efecto primario de inhibición provocado por las LAB es la producción de ácido láctico y con esto la disminución del pH (Daeschel, 1991). Además, estas producen un gran número de compuestos inhibitorios y ácidos orgánicos, que incluyen el peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, acetaldehído y bacteriocinas (Piard, 1992).

Las bacteriocinas son sustancias antimicrobianas de naturaleza proteica que a diferencia de los antibióticos se sintetizan a nivel ribosómico. En particular, las bacteriocinas producidas por las LAB han despertado un gran interés científico e industrial debido a su potencial como agentes bioconservantes (Garriga, 2000).

En contraposición con los aditivos químicos, los consumidores perciben las bacterias lácticas y sus metabolitos como algo natural y beneficioso para la salud por lo que su empleo en la conservación de alimentos tiene una gran aceptabilidad (Aymerich, 1998).

## **Bioconservación**

Cuando hablamos de bioconservación nos referimos a: Incremento de la vida útil y de la seguridad de los alimentos utilizando su microflora natural o controlada y sus productos antibacterianos. La bioconservación puede ser aplicada, por ejemplo, en alimentos y sistemas cárnicos por cuatro métodos básicos (Stiles, 1996; Aymerich, 1998):

(i) Adición de cepas bacterianas que crecen rápidamente o producen sustancias antagonistas. Este método ofrece una manera indirecta de incorporar bacteriocinas en un producto alimentario. Su éxito depende de la capacidad del cultivo para crecer y producir bacteriocinas en el alimento bajo condiciones ambientales y tecnológicas (temperatura, pH, ingredientes .).

Puesto que los productos cárnicos no pueden ser pasteurizados antes de añadirle un cultivo de bacterias del ácido láctico, las LAB para la bioconservación deben ser capaces de competir con la microbiota natural de la carne.

(ii) Adición de sustancias antagonistas purificadas. Con este sistema la dosificación de bacteriocinas es más precisa y por lo tanto más predecible.

No obstante, su aplicación queda limitada por las leyes nacionales de aditivos alimentarios.

(iii) Adición del licor de fermentación o un concentrado de un microorganismo antagonista. Este modo evita la utilización de un compuesto purificado y por lo tanto la obligación de declarar su presencia en el etiquetado.

(iv) Adición de LAB mesófilas como una protección fallo-seguro contra abusos de temperatura. En este caso, la cepa biop35rotectora se mantendrá en las concentraciones iniciales en condiciones de refrigeración. Bajo condiciones de abuso de temperatura, la cepa crecerá de forma competitiva frente a las bacterias patógenas evitando riesgos de salud.

Una característica interesante de los cultivos bioconservadores es su capacidad para producir el compuesto deseado "in situ", por lo que es importante tener en cuenta que la producción de los agentes antimicrobianos depende de la composición del entorno: pH, temperatura, potencial redox, presencia de organismos competidores, efectos aditivos, . (Daeschel,1991).

### **Situación actual y expectativas de los antimicrobianos naturales**

Actualmente muchos son los grupos de investigación de todo el mundo que están trabajando en antimicrobianos naturales, entre ellos las bacteriocinas, para aplicación en alimentos. Las bacteriocinas de las bacterias lácticas son producidas por microorganismos reconocidos como GRAS (Generally Recognized As Safe). Por el momento únicamente la bacteriocina nisina está aprobada para su uso en determinados alimentos, aunque diversos productos comerciales como Alta y Microgard, aprobados también para su uso como aditivos son fermentos de bacterias de grado alimentario con propiedades antibacterianas en alimentos (Monfort, 1996).

Para que en un futuro las bacteriocinas sean aprobadas como aditivos de uso alimentario será imprescindible disponer de resultados de eficacia probada en productos (Hugas , 1998 y Monfort, 1996).

## OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este trabajo fue una evaluación preliminar del potencial antagonico de *Lactobacillus acidophilus* sobre la *Salmonella enteritidis*

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cuantificar los efectos inhibitorios de una cepa de *Lactobacillus acidophilus* frente a *Salmonella enteritidis* mediante la medición de halos de inhibición producidos por la cepa y sus extractos mediante el método de difusión en discos.
- Evaluar los efectos inhibitorios del extracto de *Lactobacillus acidophilus* en un medio de cultivo elaborado con harina de pescado.
- Determinar la concentración inhibitoria adecuada de *Lactobacillus acidophilus* para detener el crecimiento de *Salmonella enteritidis* en pescado.
- Determinar los efectos del *Lactobacillus acidophilus* en el pescado.

## MATERIALES Y METODOS

## MATERIALES Y MÉTODOS

La cepa de *Salmonella enteritidis* que se utilizó en este estudio fue facilitada por la Dr. Virginia Montero del Laboratorio de Servicios químicos y microbiológicos CEQUIATEC, de la escuela de química del Instituto Tecnológico, Cartago, Costa Rica. Se utilizó además una cepa de *Lactobacillus acidophilus* comercial.

Para realizar un “screening” inicial y evaluar la producción de actividad inhibidora se utilizó el método de “Botón en césped” de Bauer et al, 1966, sustituyendo en todos los casos el agar Müller Hinton por agar nutritivo.

### CONFRONTACIÓN DIRECTA BACTERIA/BACTERIA

#### Preparación de las placas con el medio de cultivo:

El medio de cultivo utilizado fue el agar Nutritivo con un pH de 7. Se vertieron entre 25 a 30 ml de agar fundido y enfriado hasta 50-55°C en placas estériles de vidrio de modo que se obtuvo una capa de 4 mm de alto. Fue fundamental respetar esta condición, pues de lo contrario, se obtienen halos mayores o menores según el caso. Para eliminar la humedad sobre la superficie del medio, las placas se secaron incubándolas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 30-60 minutos (se conservaron 15 días las placas preparadas, refrigeradas a 4-8 °C).

Las pruebas de inhibición bacteriana se realizaron a partir de cultivos monomicrobianos. La prueba de difusión en agar por el método de discos se realizó de la siguiente forma:

#### Preparación del inóculo:

Se tomaron de 3 a 5 colonias del cultivo original con un asa de nichrome y se introdujeron en un vial con 5 ml de agua destilada estéril, se agitó en un agitador "vortex" durante 15-20 segundos. La turbidez se comparó con un estándar de Mc Farland de 0.5, el cual posee un promedio de  $10^7$  UFC/ml, a partir de ésta, en 6 viales se procedió a realizar diluciones seriadas hasta alcanzar una concentración de  $10^1$  UFC/ml, este procedimiento se realizó tanto para *Salmonella enteritidis* como para *Lactobacillus acidophilus*.

## **Siembra en placas**

Cada suspensión bacteriana de *Salmonella enteritidis* obtenida como se indica en el punto anterior, fue absorbida con un hisopo de algodón estéril. El exceso de líquido se descartó oprimiendo el algodón contra la pared del tubo.

Para inocular las placas, se aplicó el hisopo sobre la superficie de las mismas, efectuando estrías en direcciones diferentes. Se dejaron secar las placas durante unos cinco minutos antes de proceder a aplicar los discos.

## **Preparación de los discos**

Se emplearon discos de papel filtro de 6 mm de diámetro esterilizados mediante un periodo de 15 minutos de autoclavado a 121<sup>0</sup>C con 15 libras de presión, y secados en la estufa durante un periodo de 15-20 minutos, éstos se introdujeron dentro de las diferentes diluciones de *Lactobacillus acidophilus*.

## **Aplicación de los discos**

Una vez impregnados con la solución inhibidora se colocaron 4 discos por placa, sobre la superficie del agar por medio de una pinza estéril, según el tratamiento con una distancia suficiente entre ellos para evitar la superposición de los halos de inhibición. Se tuvo el cuidado, que los discos hicieran buen contacto con la superficie del agar, ejerciendo para ello, ligera presión sobre los mismos, se realizaron tres repeticiones por tratamiento con cada una de las combinaciones posibles entre las concentraciones de 10<sup>7</sup> a 10<sup>1</sup> UFC/ml de *Lactobacillus acidophilus* y las concentraciones de 10<sup>7</sup> a 10<sup>1</sup> UFC/ml de *Salmonella enteritidis*. Transcurridos 30 minutos de la colocación de los discos, las placas se incubaron invertidas en la incubadora a 35±2°C durante un periodo de 24-48 horas.

## **Medida de las zonas de inhibición:**

Para la lectura de los halos de inhibición no se tomó en cuenta sólo su presencia o su ausencia, en todos los casos se tomó el diámetro de los halos, ya que estos varían según la inhibición provocada por el antimicrobiano. Para medir los halos se utilizó una regla milimétrica. Se midió

el diámetro total en milímetros del halo incluyendo el disco. De tal manera, la ausencia total de inhibición fue el borde del disco, es decir 6 mm de lectura.

Para analizar la importancia de la variación del pH sobre la formación de halos de inhibición más significativos en tamaño, se realizaron mediciones de pH en las zonas de inhibición a intervalos de 12 horas de incubación a 35°C hasta un total de 72 horas.

Posteriormente, se realizaron pruebas de antagonismo en las que se reemplazó el agar nutritivo por una gelatina nutritiva en la que se sustituyó el extracto de carne por harina de pescado, en este paso las pruebas también se realizaron mediante el procedimiento de Bauer et al, 1966.

Para controlar el aumento en el tamaño de los halos de inhibición, se realizaron mediciones de los mismos a intervalos de 12 horas durante un lapso de 72 horas de incubación a 35°C.

Una vez realizadas las pruebas para determinar cual concentración de *Lactobacillus acidophilus* resultó más inhibitoria para el crecimiento de la *Salmonella enteritidis*, se procedió a realizar una aislamiento primaria de bacteriocinas como se indica a continuación:

## **CONFRONTACION DIRECTA SOBRENADANTE DE *Lactobacillus acidophilus* /BACTERIA**

### **Producción de bacteriocinas en medio líquido**

En esta etapa del trabajo se utilizó la metodología de Liepe (1993).

Se inocularon volúmenes de 1 a 5ml de una solución de 10<sup>7</sup>UFC/ml de *Lactobacillus acidophilus* en 5 erlenmeyers de 250 ml con 200 ml de caldo tripticasa de soya, y se dejaron crecer durante un periodo de 18 horas a 35°. Se inocularon al 2% veinte viales con 8 ml de caldo nutritivo a partir del cultivo anterior y se dejó crecer durante 6h, 8h, 12h y 24h. A los diferentes tiempos se tomaron muestras de 1ml en tubos eppendorf y mediante centrifugación a 5 000 rpm durante 15 minutos se obtuvieron los extractos crudos, estos fueron almacenados a -20 °C. Posteriormente, el sobrenadante libre de células se ensayó en placa frente a la *Salmonella enteritidis* en el ensayo de actividad de bacteriocina.

## **Ensayo de la actividad de la Bacteriocina**

Se analizó la actividad antimicrobiana de los extractos concentrados de *Lactobacillus acidophilus* frente a diluciones de *Salmonella enteritidis* a concentraciones desde  $10^7$  hasta  $10^1$  UFC/ml, por el método de Bauer et al, 1966, descrito anteriormente.

## **EFFECTOS DEL *Lactobacillus acidophilus* EN PESCADO**

Para valorar la efectividad de una cepa bacteriocinogénica como cultivo bioprotector en un producto concreto es importante poder demostrar su actividad en un sustrato cárnico, en este caso en pescado.

Para ello se inocularon volúmenes de 1, 2, 3, 4 y 5 ml de la cepa de *Lactobacillus acidophilus* a una concentración de  $10^7$  UFC/ml en 3 sardinas (*Sardinella anchovia*) enteras con un peso de  $50 \pm 5$  g y 3 sardinas (*Sardinella anchovia*) evisceradas con un peso de  $50 \pm 5$  g, por tratamiento, bajo diferentes condiciones de almacenamiento: en refrigeración ( $10^\circ\text{C}$ ), con hielo a  $10-15^\circ\text{C}$ , sin hielo y congeladas a  $-14$ ,  $-18$ ,  $-21$ ,  $-24^\circ\text{C}$ .

Para conocer con mayor certeza las condiciones iniciales de la sardina desde el punto de vista físico-químico, se tomaron muestras recién capturadas (patrón) y se realizaron los análisis para posteriores comparaciones con las muestras congeladas.

## **Control de Calidad**

### **Determinaciones Físicas**

Se realizaron mediante pruebas organolépticas, utilizando la evaluación sensorial. Para esta prueba se elaboró un esquema de clasificación por puntaje (Cuadro 1), tomando en consideración algunos criterios propuestos por Shewan, 1974 y Huss, 1976, descritos en el Anexo 1.

**Cuadro 1.** Clasificación por puntaje de la evaluación sensorial que se utilizó para el control de calidad de Sardina (*Sardinella anchovia*).

<b>PUNTOS</b>	<b>%CALIDAD</b>	<b>CALIDAD</b>
27 - 30	90-100	Optima
24 - 26	80-89	Buena
18 - 23	60-79	Regular
0 - 17	0-59	Rechazada

*Fuente:* Basado en Shewan, 1974 y Huss, 1976

### **Determinaciones químicas**

Se almacenaron 3 muestras por tratamiento a una temperatura de -14, -18, -21 y -24C, en refrigeración a 10°C y en hielo a 10-15°C a las cuales se les midió el pH durante un periodo de 72 horas, realizando simultáneamente las pruebas organolépticos

## RESULTADOS

## RESULTADOS

A continuación se presentan los principales resultados del trabajo y se da un análisis del efecto antagónico del *Lactobacillus acidophilus* sobre la *Salmonella enteritidis*.

### CONFRONTACIÓN DIRECTA BACTERIA/BACTERIA

En el cuadro 2 se muestra el comportamiento general de la cepa de *Lactobacillus acidophilus* sobre la *Salmonella enteritidis* según la concentración.

**Cuadro 2.** Medida en milímetros de los halos de inhibición obtenidos según la concentración de *Lactobacillus acidophilus* vrs *Salmonella enteritidis*.

Concentración de <i>Lactobacillus spp.</i> UFC/ml	Concentración de <i>Salmonella enteritidis</i> UFC/ml						
	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>
	Medida de halos de inhibición <sup>1</sup> (mm)						
10 <sup>7</sup>	0	0	6	6	9	14	16
10 <sup>6</sup>	0	0	0	0	6	9	12
10 <sup>5</sup>	0	0	0	0	0	0	6
10 <sup>4</sup>	0	0	0	0	0	0	6
10 <sup>2</sup>	0	0	0	0	0	0	0
10 <sup>1</sup>	0	0	0	0	0	0	0

*Fuente:* Datos experimentales.

Como se observa en el cuadro anterior, a concentraciones de *S. enteritidis* altas, ya sean iguales o superiores a la concentración de *L. acidophilus* empleada para el antagonismo no se produjo ningún efecto antagónico, e inclusive en el 100% de los casos analizados se produjo una gran

<sup>1</sup> El cero indica invasión del césped de papel filtro por parte de la *Salmonella enteritidis*.

agresividad de la *S. enteritidis* que provocó la inhibición en el crecimiento del *L. acidophilus* y posterior invasión del césped de papel filtro.

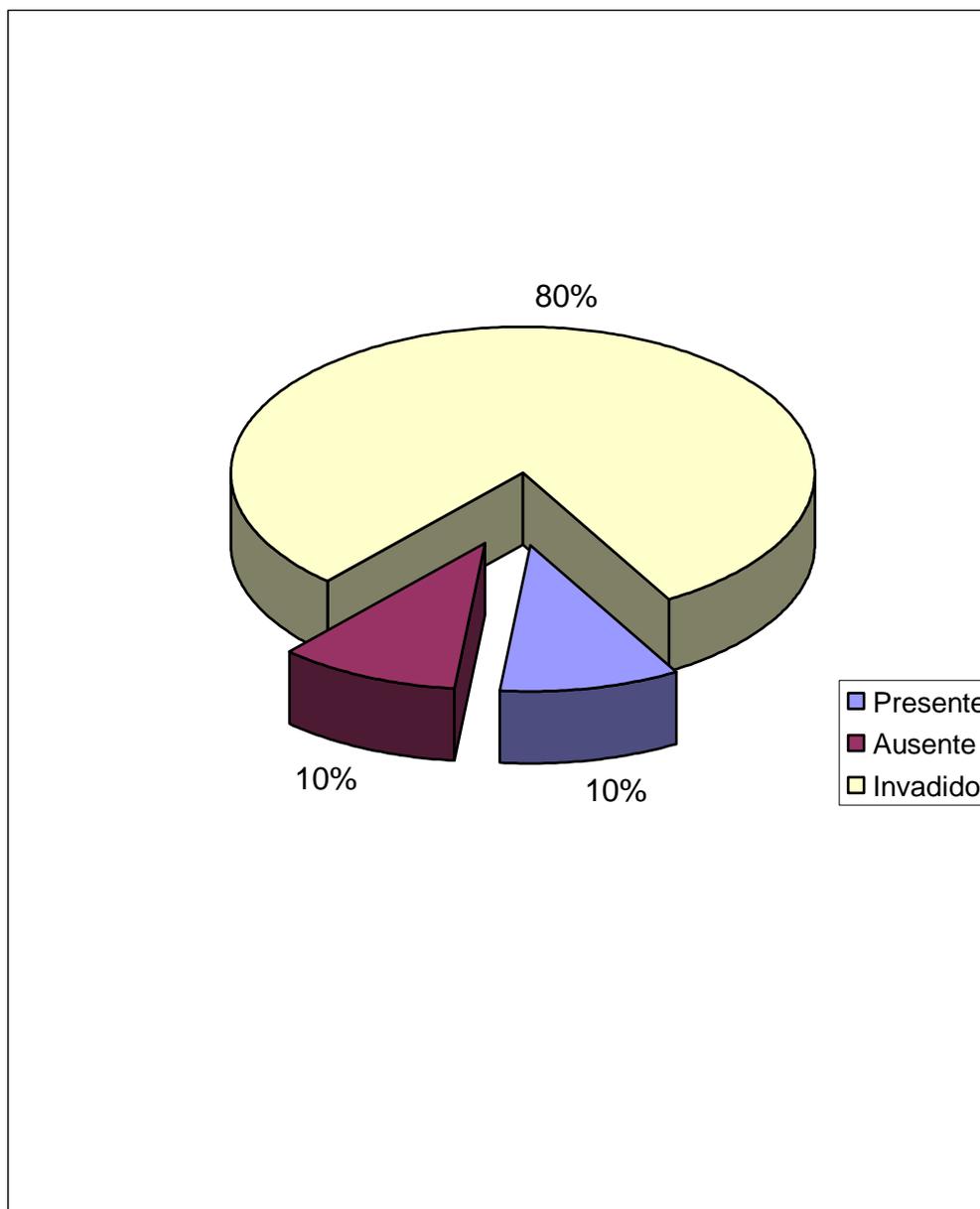
Con base en el cuadro anterior, se realizó una estimación porcentual de la eficiencia antagónica del *L. acidophilus* sobre la *S. enteritidis* tomando como puntos de referencia su ausencia (6mm) (Figura 8), presencia (Figura 6 y 7) e invasión del césped de papel filtro por parte de la *S. enteritidis* (0mm) (Figura 2), y clasificando la inhibición como positiva o negativa, a continuación se muestran los datos obtenidos (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Eficiencia antagónica del *Lactobacillus acidophilus* sobre la *Salmonella enteritidis*.

Halo de inhibición	Número de muestras	%eficiencia	Inhibición
<i>Presente</i>	5	10	+
<i>Ausente</i>	5	10	-
<i>Invasión del césped</i>	39	80	-
Total	49	100	

*Fuente:* Datos experimentales.

Los datos anteriores se muestran en la figura 1, como se observa, sólo un 10.2% de las posibles combinaciones entre las concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* y *Salmonella enteritidis* evaluadas presentaron un nivel inhibitorio positivo, donde en la concentración de  $10^7$ UFC/ml de *L. acidophilus* vs  $10^1$ UFC/ml de *S. enteritidis* se desarrolló el halo de inhibición de mayor diámetro (16mm) (Cuadro 2). En un 10.2% de los casos no se produjo ningún halo de inhibición, es decir, el crecimiento de la cepa de *S. enteritidis* llegó hasta el borde del césped de papel filtro (6mm), y en un 79.59% de los casos la *S. enteritidis*, reaccionó con gran agresividad invadiendo el césped de papel filtro e inhibiendo el crecimiento de la cepa de *L. Acidophilus* (figura 2). Es decir, la eficiencia antagónica del *L. acidophilus* sobre la *S. enteritidis* correspondió a tan solo un 10.2% de los casos evaluados.



**Figura 1.** Porcentaje de eficiencia antagónica del *Lactobacillus acidophilus* sobre la *Salmonella enteritidis*.

Fuente: Datos experimentales.



**Figura 2.** Invasión de *Salmonella enteritidis* en el césped de papel filtro con *Lactobacillus acidophilus*.

*Fuente:* Datos experimentales.

Para comprobar si los resultados anteriores, fueron consecuencia de la producción de compuestos intracelulares por parte del *Lactobacillus acidophilus* o por variaciones en el pH del medio de cultivo, se realizaron mediciones de pH en las zonas de inhibición, de lo cual se obtuvieron los resultados que se presentan en el cuadro 4.

**Cuadro 4.** Valor de pH en la zona de inhibición según la concentración de *Lactobacillus acidophilus* vrs *Salmonella enteritidis*<sup>2</sup>.

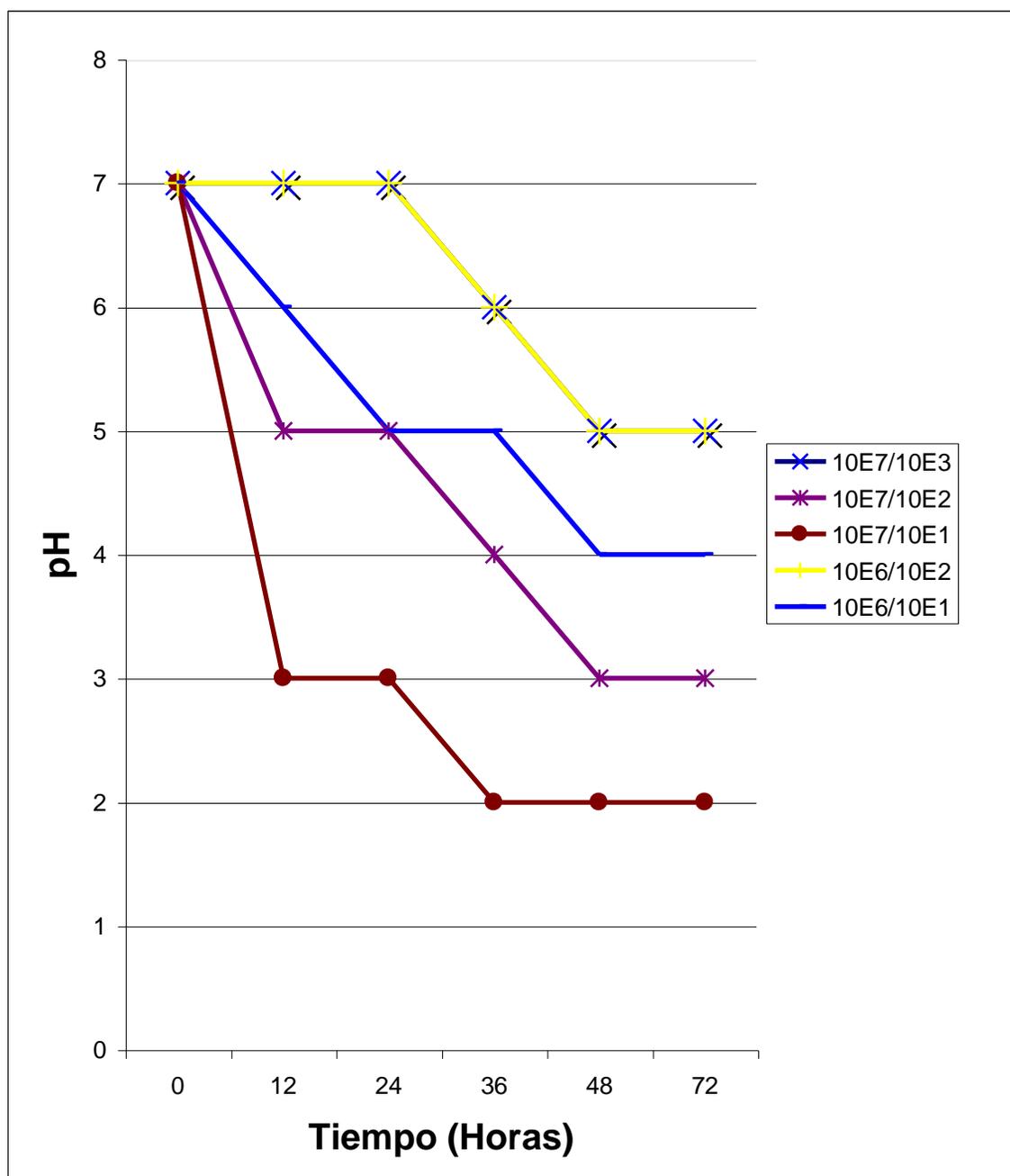
<i>Lactobacillus/Salmonella</i> (UFC/ml)	Tiempo (horas)					
	0	12	24	36	48	72
$10^7/10^3$	7	7	7	6	5	5
$10^7/10^2$	7	5	5	4	3	3
$10^7/10^1$	7	3	3	2	2	2
$10^6/10^2$	7	7	7	6	5	5
$10^6/10^1$	7	6	5	5	4	4

*Fuente:* Datos experimentales.

Como se observa en el cuadro 2, a mayor concentración de *Lactobacillus acidophilus* vrs menor concentración de *Salmonella enteritidis*, el efecto inhibitorio es mayor. Bajo las condiciones anteriores, se produjeron grandes variaciones en el pH de las zonas de inhibición (Figura 3).

---

<sup>2</sup> Los valores de pH corresponden a las concentraciones que formaron algún halo de inhibición.



**Figura 3.** Variaciones de pH según la concentración de *Lactobacillus acidophilus* vrs *Salmonella enteritidis* (UFC/ml) a través del tiempo.

Fuente: Datos experimentales.

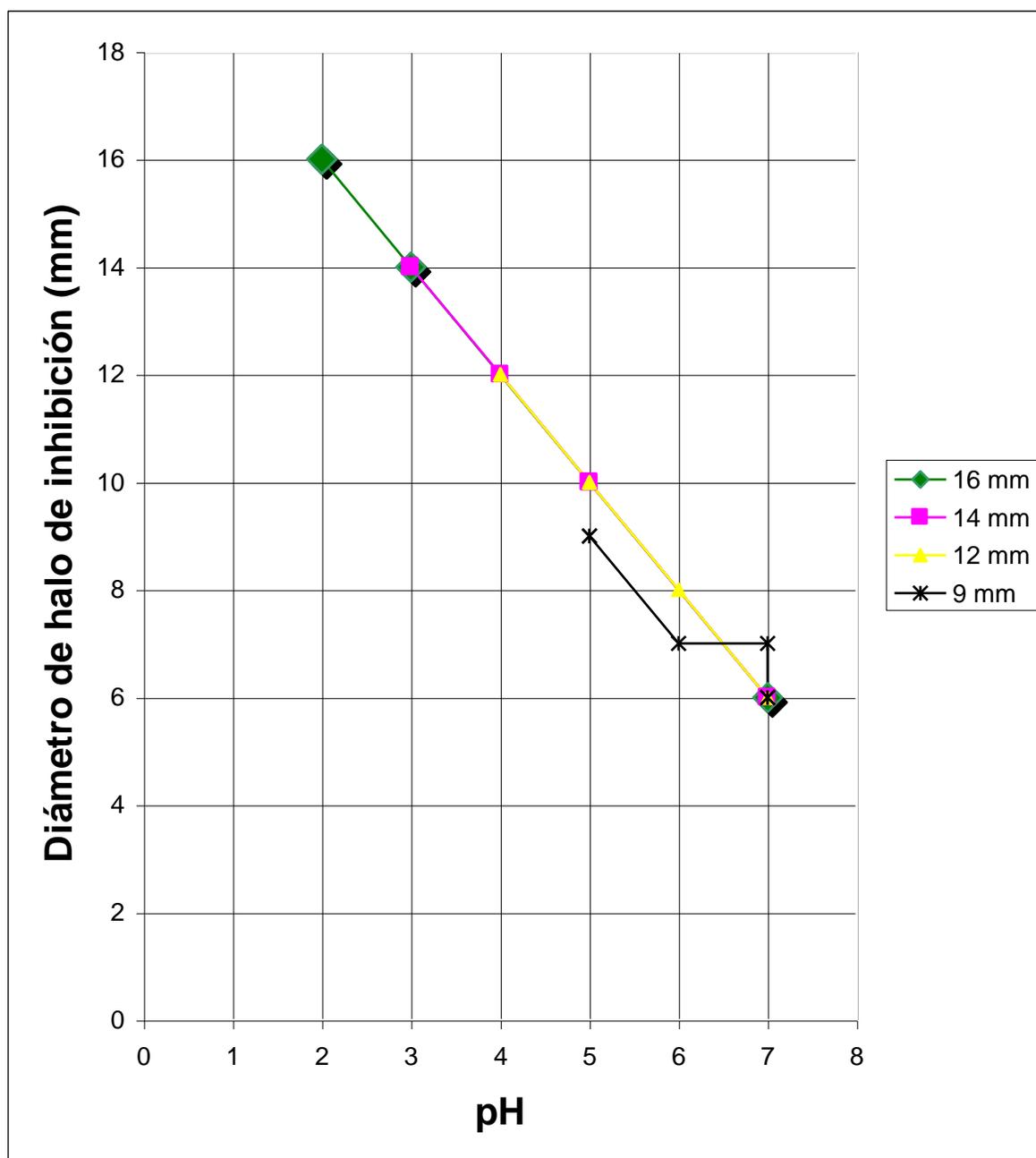
Al disminuir el pH de las zonas de inhibición, se da un incremento de forma paralela en el diámetro del halo de inhibición, es decir, el efecto inhibitorio del *Lactobacillus acidophilus* sobre la *Salmonella enteritidis*, fue directamente proporcional a la disminución del pH en la zona de inhibición del medio de cultivo a través del tiempo de incubación. Lo anterior, se puede observar más claramente en el cuadro 5.

**Cuadro 5.** Variaciones de pH y diámetro en los halos de inhibición a través del tiempo

Tiempo (Horas)	Concentración (UFC/ml)									
	$10^7/10^1$		$10^7/10^2$		$10^7/10^3$		$10^6/10^1$		$10^6/10^2$	
	Diámetro (mm)	pH	Diámetro (mm)	pH	Diámetro (mm)	pH	Diámetro (mm)	pH	Diámetro (mm)	pH
<b>0</b>	6	7	6	7	6	7	6	7	6	7
<b>12</b>	14	3	10	5	6	7	8	6	6	7
<b>24</b>	14	3	10	5	7	7	10	5	7	7
<b>36</b>	16	2	12	4	7	6	10	5	7	6
<b>48</b>	16	2	14	3	9	5	12	4	9	5
<b>72</b>	<b>16</b>	<b>2</b>	<b>14</b>	<b>3</b>	<b>9</b>	<b>5</b>	<b>12</b>	<b>4</b>	<b>9</b>	<b>5</b>

*Fuente:* Datos experimentales.

Como se observa en el cuadro anterior, un pH menor se expresó en un halo de inhibición de mayor tamaño, es fácil notar, que el incremento en el diámetro de los halos de inhibición se llevó a cabo por disminución en los valores de pH de la zona de inhibición hasta llegar a un punto en el que ambas variables se vuelven constantes a través del tiempo, en la figura 4 se muestra con claridad la relación entre las variables pH y diámetro de los halos de inhibición.



**Figura 4.** Relación entre el pH y los halos de inhibición para un periodo de 72 horas.

*Fuente:* Datos experimentales.

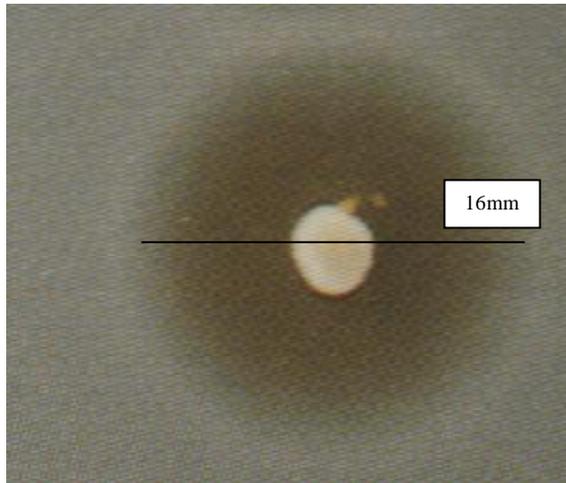
Para controlar el aumento en el tamaño de los halos de inhibición, se realizaron mediciones de los mismos a través del tiempo, como se puede observar en el cuadro 6, el crecimiento del diámetro de los halos de inhibición se detuvo entre las 36 y 48 horas de incubación, un vez detenido este crecimiento, la tendencia se mantuvo constante hasta las 72 horas de incubación a 35°C.

**Cuadro 6.** Medida del halo de inhibición (mm) a través del tiempo según la concentración de *Lactobacillus acidophilus* vrs *Salmonella enteritidis* (UFC/ml).

Medida del halo de inhibición (mm) según concentración de <i>Lactobacillus/Salmonella</i> (UFC/ml)					
Tiempo	10 <sup>7</sup> /10 <sup>3</sup>	10 <sup>7</sup> /10 <sup>2</sup>	10 <sup>7</sup> /10 <sup>1</sup>	10 <sup>6</sup> /10 <sup>2</sup>	10 <sup>6</sup> /10 <sup>1</sup>
0 horas	6	6	6	6	6
12 horas	6	10	14	6	8
24 horas	7	10	14	6	10
36 horas	7	12	16	7	10
48 horas	9	14	16	9	12
72 horas	9	14	16	9	12

Fuente: Datos experimentales.

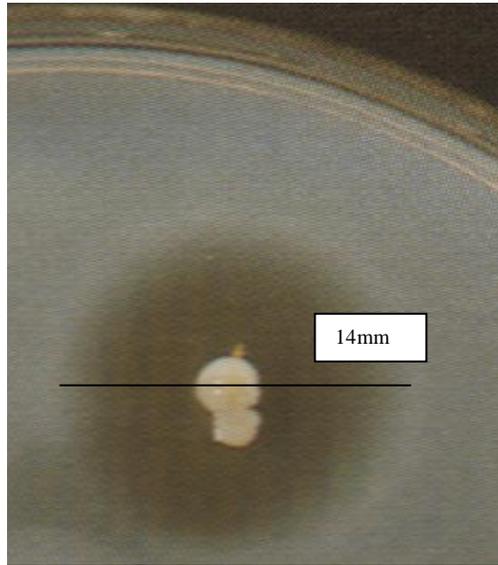
En la figura 5, se puede observar que en la formación del halo de inhibición de 16mm, el crecimiento de la cepa de *Lactobacillus acidophilus* fue homogéneo, es importante resaltar, que la medida de este halo de inhibición se alcanzó después de las 36 horas de incubación a 35°C y se mantuvo constante.



**Figura 5.** Halo de inhibición de 16mm obtenido con una concentración de  $10^7$  UFC/ml de *Lactobacillus acidophilus* vs  $10^1$ UFC/ml de *Salmonella enteritidis*.

*Fuente:* Datos experimentales.

El halo de inhibición de 14mm alcanzó su medida total luego de las 48 horas de incubación a  $35^{\circ}\text{C}$  y se mantuvo constante, en éste se dio un crecimiento más desordenado del *Lactobacillus acidophilus* como se puede observar en la figura 6.



**Figura 6.** Halo de inhibición de 14mm obtenido con una concentración de  $10^7$  UFC/ml de *Lactobacillus acidophilus* vrs  $10^2$ UFC/ml de *Salmonella enteritidis*.

*Fuente:* Datos experimentales.

Cuando la concentración de *S. enteritidis* fue superior o igual a  $10^3$  UFC/ml y la concentración de *L. acidophilus* fue menor o igual a  $10^6$ UFC/ml, se produjo la ausencia de halos de inhibición (6mm) (figura 7).



**Figura 7.** Ausencia de halo de inhibición obtenida con una concentración de  $10^6$  UFC/ml de *Lactobacillus acidophilus* vrs  $10^3$ UFC/ml de *Salmonella enteritidis*.

*Fuente:* Datos experimentales.

### **PRUEBAS DE ANTAGONISMO EN GELATINA NUTRITIVA**

Se realizaron pruebas de antagonismo en una gelatina nutritiva en la que se sustituyó el extracto de carne por harina de pescado, en este paso no se obtuvieron resultados positivos, a ninguna concentración se produjo halos de inhibición.

### **CONFRONTACION DIRECTA SOBRENADANTE DE *Lactobacillus acidophilus* /BACTERIA**

En esta fase del trabajo no se dieron resultados positivos. En el 100% de las pruebas de inhibición realizadas a partir del sobrenadante del centrifugado de las concentraciones de  $10^7$  y  $10^6$  UFC/ml de *Lactobacillus acidophilus* vrs

concentraciones desde  $10^7$  a  $10^1$  UFC/ml de *Salmonella enteritidis*, se presentó una gran agresividad por parte de la *Salmonella enteritidis* que en todos los casos invadió el césped de papel filtro remojado con el centrifugado de *Lactobacillus acidophilus*.

## EFFECTOS DEL *Lactobacillus acidophilus* EN EL PESCADO

Los resultados obtenidos en la evaluación sensorial indican que en el tratamiento realizado con 1 ml de la concentración  $10^7$ UFC/ml a  $10^\circ\text{C}$ , el producto entero está apto para el consumo sólo antes de 12 horas, mientras que el eviscerado se puede utilizar hasta las 12 horas (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Evaluación sensorial de la sardina (*Sardinella anchovia*) inoculada con 1 ml ( $10^7$ UFC/ml) de *Lactobacillus acidophilus* y preservada en refrigeración ( $10^\circ\text{C}$ ), entera (EN) y eviscerada (EV).

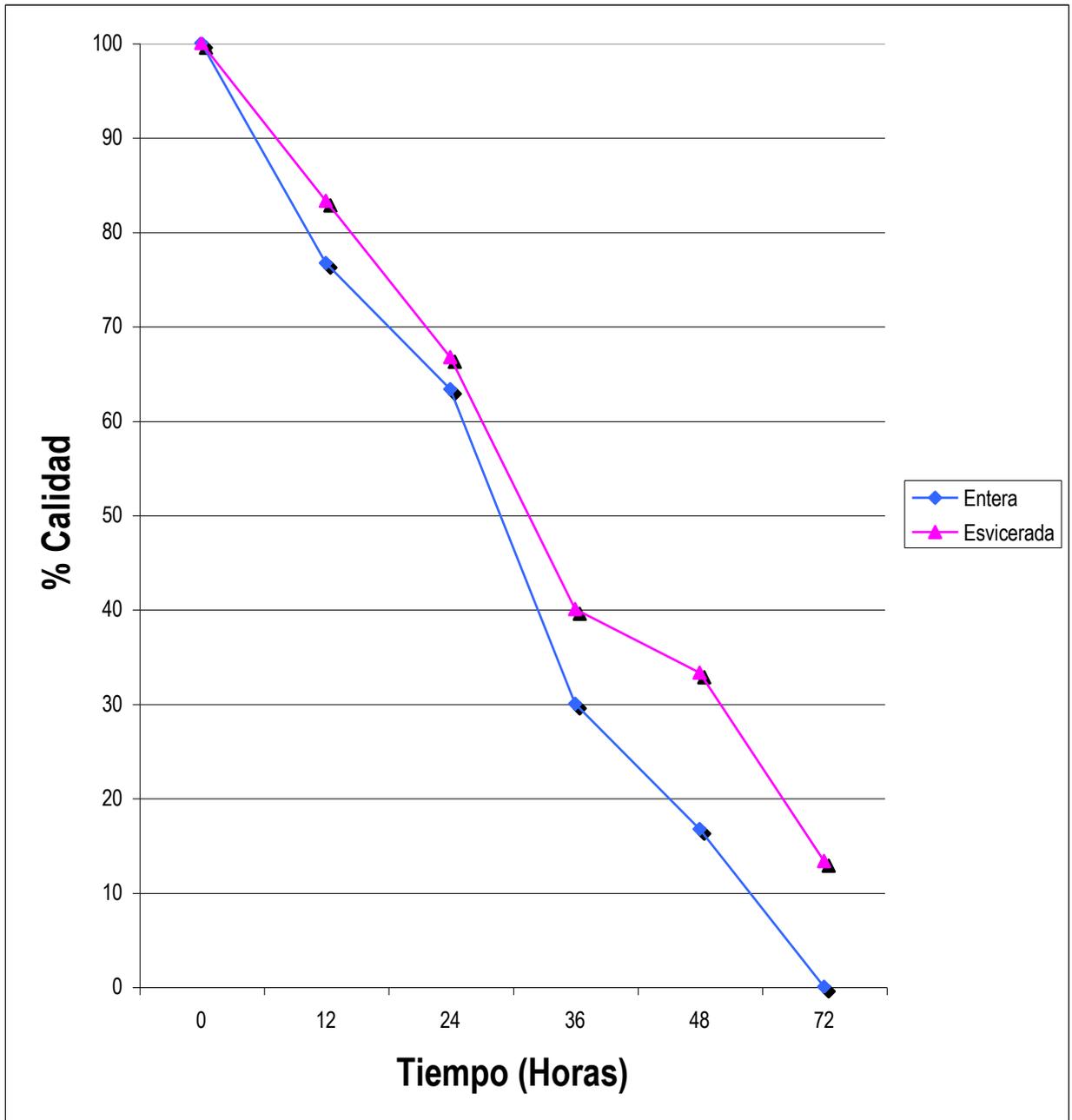
Tiempo (Horas)	0		12		24		36		48		72	
	EN	EV	EN	EV	EN	EV	EN	EV	EN	EV	EN	EV
Apariencia y consistencia	5	5	4	4	3	3	2	2	1	0	0	0
Olor	5	5	3	4	3	3	2	2	1	3	0	1
Agallas	5	5	4	4	3	3	1	1	0	0	0	0
Ojos	5	5	4	4	3	3	1	1	3	1	0	0
Carne	5	5	4	4	4	3	2	1	0	1	0	1
Cavidad Abdominal y Vísceras	5	5	4	5	3	5	1	5	0	5	0	2
<b>Total</b>	30	30	23	25	19	20	9	12	5	10	0	4
<b>Calidad (%)</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>77</b>	<b>83</b>	<b>63</b>	<b>67</b>	<b>30</b>	<b>40</b>	<b>17</b>	<b>33</b>	<b>0</b>	<b>13</b>

Fuente: Datos experimentales.

En el cuadro anterior se puede observar, que a las 12 horas de almacenamiento a  $10^\circ\text{C}$  el producto entero disminuye su porcentaje de calidad hasta un 77%, encontrándose en regular condición de calidad por lo que el producto no es seguro para el consumo humano; mientras que el

producto eviscerado alcanza una calidad buena hasta las 12 horas de almacenamiento cuando su porcentaje de calidad es de 83 %.

Es evidente, que el porcentaje de calidad del producto en refrigeración a 10°C, ya sea entero o eviscerado disminuye al transcurrir el tiempo, este fenómeno ocurre más rápido en las muestras enteras (Figura 8).



**Figura 8.** Porcentaje de Calidad obtenido en las muestras de Sardina (*Sardinella anchovia*) enteras y esviceradas inoculadas con 1 ml de *L. acidophilus* [ $10^7$ UFC/ml] durante 72 horas en refrigeración a  $10^{\circ}\text{C}$ .

Fuente: Datos experimentales.

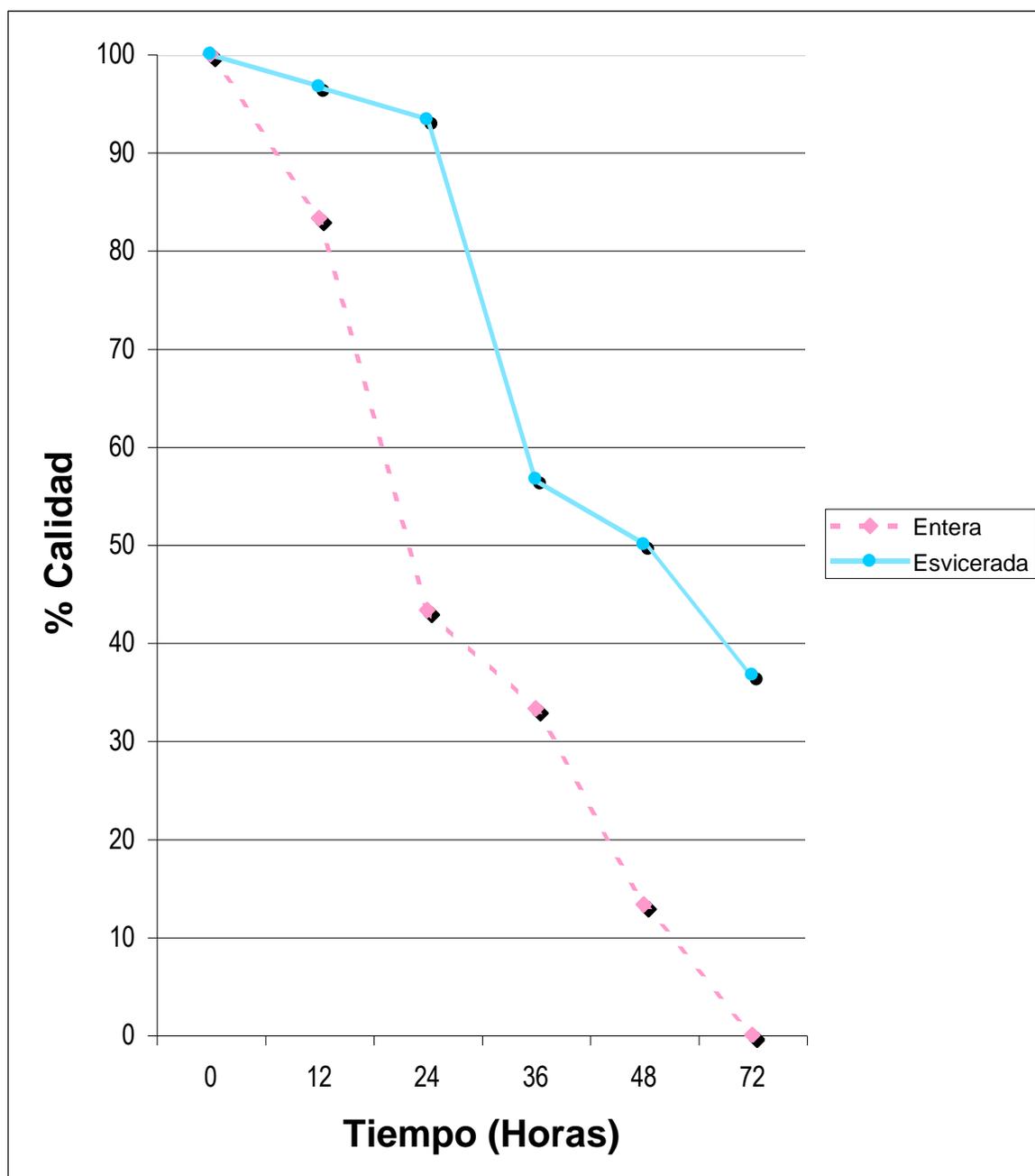
En los tratamientos con 1 y 2 ml de la concentración  $10^7$ UFC/ml mantenido en hielo (10-15°C), el producto entero está en buenas condiciones hasta las 12 horas, y eviscerado dura hasta 24 horas (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Evaluación sensorial de la sardina (*Sardinella anchovia*) en los tratamientos con 1 y 2 ml ( $10^7$ UFC/ml) de *Lactobacillus acidophilus* preservada en hielo (10-15°C), entera (EN) y eviscerada (EV).

<b>Tiempo (Horas)</b>	<b>0</b>		<b>12</b>		<b>24</b>		<b>36</b>		<b>48</b>		<b>72</b>	
<b>Indice</b>	<b>EN</b>	<b>EV</b>	<b>EN</b>	<b>EV</b>	<b>EN</b>	<b>EV</b>	<b>EN</b>	<b>EV</b>	<b>EN</b>	<b>EV</b>	<b>EN</b>	<b>EV</b>
<i>Apariencia y consistencia</i>	5	5	5	5	3	5	2	2	0	1	0	2
<i>Olor</i>	5	5	5	5	2	5	2	3	1	3	0	2
<i>Agallas</i>	5	5	4	5	1	4	1	3	0	3	0	1
<i>Ojos</i>	5	5	3	4	2	4	2	4	2	2	0	2
<i>Carne</i>	5	5	4	5	2	5	1	2	1	3	0	1
<i>Cavidad Abdominal y Vísceras</i>	5	5	4	5	3	5	2	3	0	3	0	3
<b>Total</b>	30	30	25	29	13	28	10	17	4	15	0	11
<b>Calidad (%)</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>83</b>	<b>97</b>	<b>43</b>	<b>93</b>	<b>33</b>	<b>57</b>	<b>13</b>	<b>50</b>	<b>0</b>	<b>37</b>

*Fuente:* Datos experimentales.

Al igual que en el almacenamiento en refrigeración a 10°C el producto eviscerado mantiene un buen porcentaje de calidad por más tiempo (93% a las 24 horas) mientras que el producto entero mantiene un buen porcentaje de calidad hasta las 12 horas (83%) de almacenamiento, sin embargo, es notable una disminución en la calidad del producto a través del tiempo (Figura 9).



**Figura 9.** Porcentaje de Calidad obtenido en las muestras de Sardina (*Sardinella anchovia*) enteras y esviceradas inoculadas con 1 y 2ml de *L. acidophilus* [ $10^7$ UFC/ml] durante 72 horas en hielo entre 10 -15°C.

Fuente: Datos experimentales.

En la muestra patrón almacenada en hielo o refrigerada a 10°C, el producto entero y eviscerado tiene buena calidad hasta después de las 72 horas, y su textura es bastante aceptable, los resultados de ambos almacenamientos se resumen en el Cuadro 9, ya que no existió ninguna diferencia entre ellos.

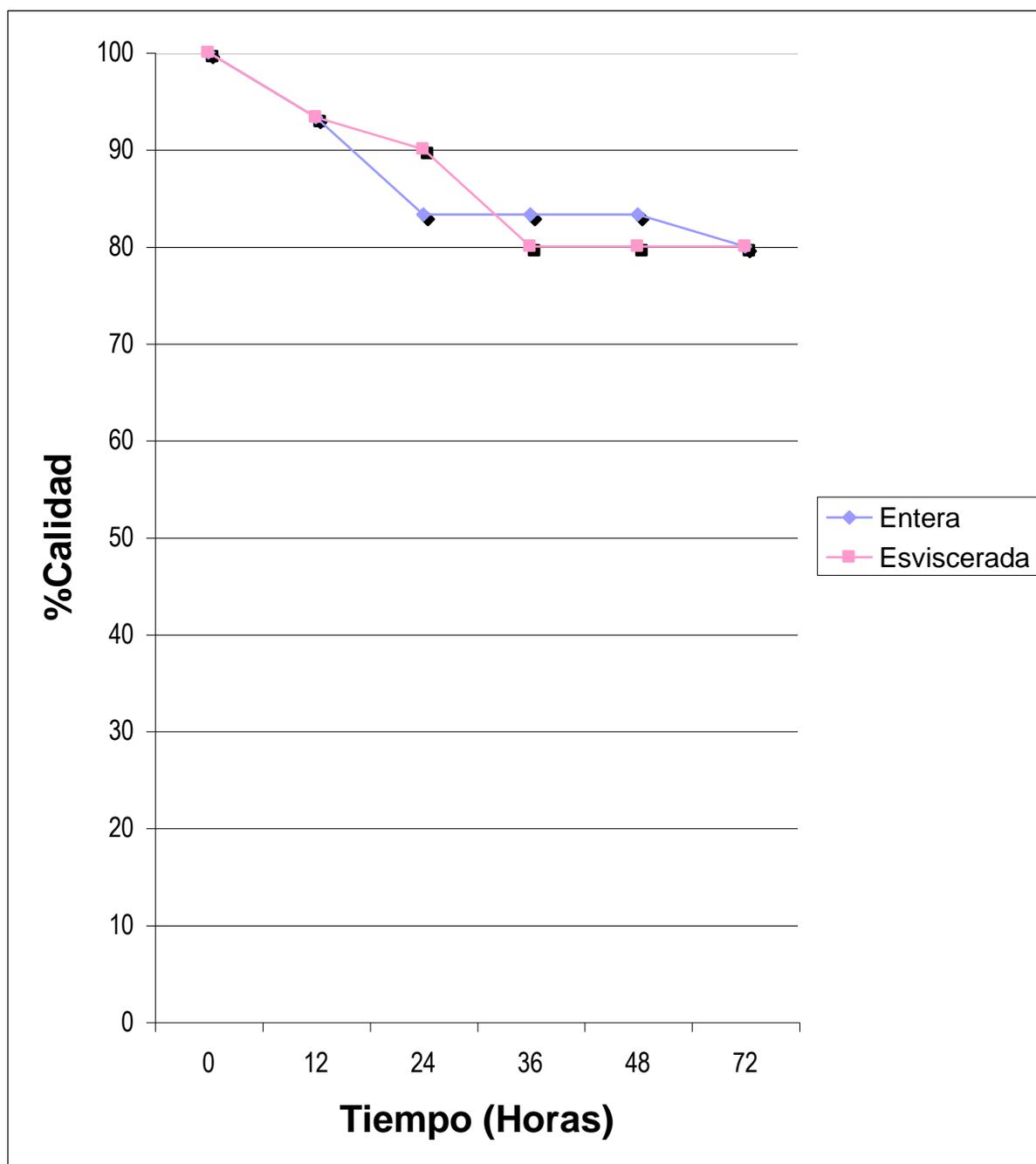
**Cuadro 9.** Evaluación sensorial de la Sardina (*Sardinella anchovia*) patrón almacenada a una temperatura de 10°C (hielo y refrigerada), entera (EN) y eviscerada (EV).

<b>Tiempo (horas)</b>	<b>0</b>		<b>12</b>		<b>24</b>		<b>36</b>		<b>48</b>		<b>72</b>	
<b>Índice</b>	<b>EN</b>	<b>EV</b>	<b>EN</b>	<b>EV</b>	<b>EN</b>	<b>EV</b>	<b>EN</b>	<b>EV</b>	<b>EN</b>	<b>EV</b>	<b>EN</b>	<b>EV</b>
<i>Apariencia y consistencia</i>	5	5	4	4	4	4	4	3	4	3	4	3
<i>Olor</i>	5	5	5	5	5	5	5	4	5	4	4	4
<i>Agallas</i>	5	5	5	5	4	5	4	4	4	4	4	4
<i>Ojos</i>	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<i>Carne</i>	5	5	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4
<i>Cavidad Abdominal y Visceras</i>	5	5	5	5	4	5	4	5	4	5	4	5
<b>Total</b>	30	30	28	28	25	27	25	24	25	24	24	24
<b>Calidad (%)</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>93</b>	<b>93</b>	<b>83</b>	<b>90</b>	<b>83</b>	<b>80</b>	<b>83</b>	<b>80</b>	<b>80</b>	<b>80</b>

*Fuente:* Datos experimentales.

A pesar de que se da una disminución en la calidad de las muestras patrón (enteras y esvisceradas) a través del tiempo ésta no alcanza niveles regulares y por lo tanto el producto se mantiene en condiciones buenas para el consumo humano aún después de 72 horas de almacenamiento (Figura 10).

En todos los tratamientos, el producto congelado mantiene su categoría de buena calidad por más de 72 horas, en especial cuando es almacenado a -24°C (Cuadro 10).



**Figura 10.** Porcentaje de Calidad obtenido en las muestras patrón de Sardina (*Sardinella anchovia*) enteras y esvisceradas durante 72 horas en hielo entre 10-15°C y refrigeración a 10°C.

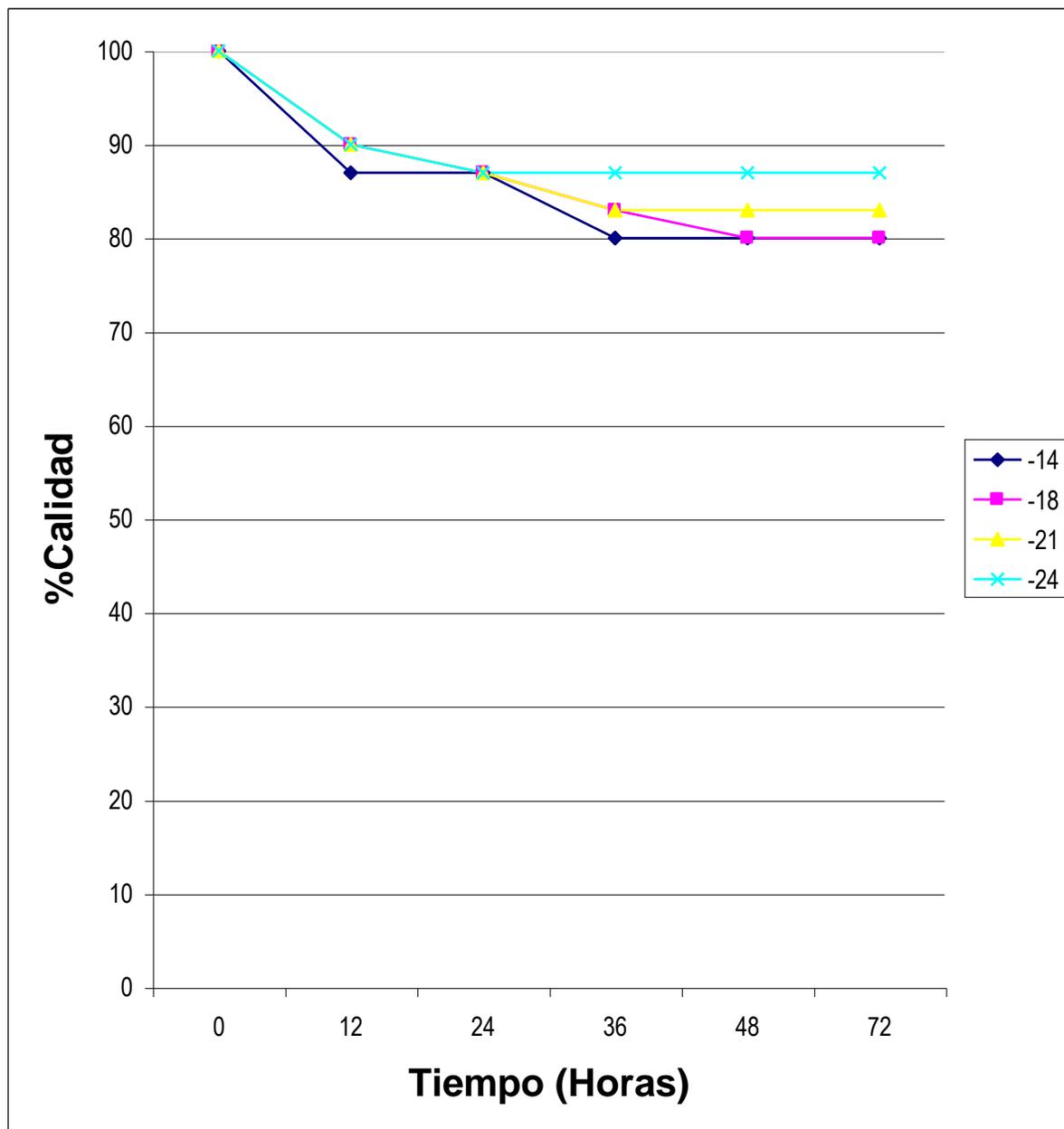
Fuente: Datos experimentales.

**Cuadro 10.** Evaluación sensorial promedio en todos los tratamientos (1-5ml UFC/ml de *Lactobacillus acidophilus*) durante 72 horas, de la sardina (*Sardinella anchovia*) congelada y mantenida a -14, -18, -21 y -24°C

Tiempo (Horas)	0				12				24				36				48				72			
Temp.congelación (°C)	-14	-18	-21	-24	-14	-18	-21	-24	-14	-18	-21	-24	-14	-18	-21	-24	-14	-18	-21	-24	-14	-18	-21	-24
<b>INDICE</b>																								
<i>Apariencia y Consistencia</i>	5	5	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4	3	4	4	4	3	4	4	4	3	4	4	4
<i>Olor/Sabor</i>	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<i>Agallas</i>	5	5	5	5	4	5	5	5	4	4	4	4	3	4	4	4	3	4	4	4	3	4	4	4
<i>Ojos</i>	5	5	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	4	4	4	3	4	4	4	3	4	4
<i>Carne</i>	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	4	5	5	5	4	5
<i>Cavidad Abdominal y Vísceras</i>	5	5	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	4	4	4	3	4	4
<b>Total</b>	30	30	30	30	26	27	27	27	26	26	26	26	24	25	25	26	24	24	25	26	24	24	25	26
<b>%Calidad</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>87</b>	<b>90</b>	<b>90</b>	<b>90</b>	<b>87</b>	<b>87</b>	<b>87</b>	<b>87</b>	<b>80</b>	<b>83</b>	<b>83</b>	<b>87</b>	<b>80</b>	<b>80</b>	<b>83</b>	<b>87</b>	<b>80</b>	<b>80</b>	<b>83</b>	<b>87</b>

Fuente: Datos experimentales.

Como se puede observar en la Figura 11, en todos los tratamientos, el producto congelado es bueno para el consumo humano aún después de las 72 horas de almacenamiento. Cuando las muestras almacenaron a  $-24^{\circ}\text{C}$ , el producto permanece hasta las 72 horas con un porcentaje de calidad (87%) muy cercano a la calidad óptima para consumo humano. Es importante aclarar, que en estos datos no se distingue entre muestras enteras y esvisceradas ya que su comportamiento fue muy parecido.



**Figura 11.** Porcentaje de Calidad obtenido en las muestras de Sardina (*Sardinella anchovia*) inoculadas con volúmenes de 1-5ml de *L. acidophilus* a través de 72 horas de congelación a  $-14$ ,  $-18$ ,  $-21$  y  $-24^{\circ}\text{C}$ .

Fuente: Datos experimentales.

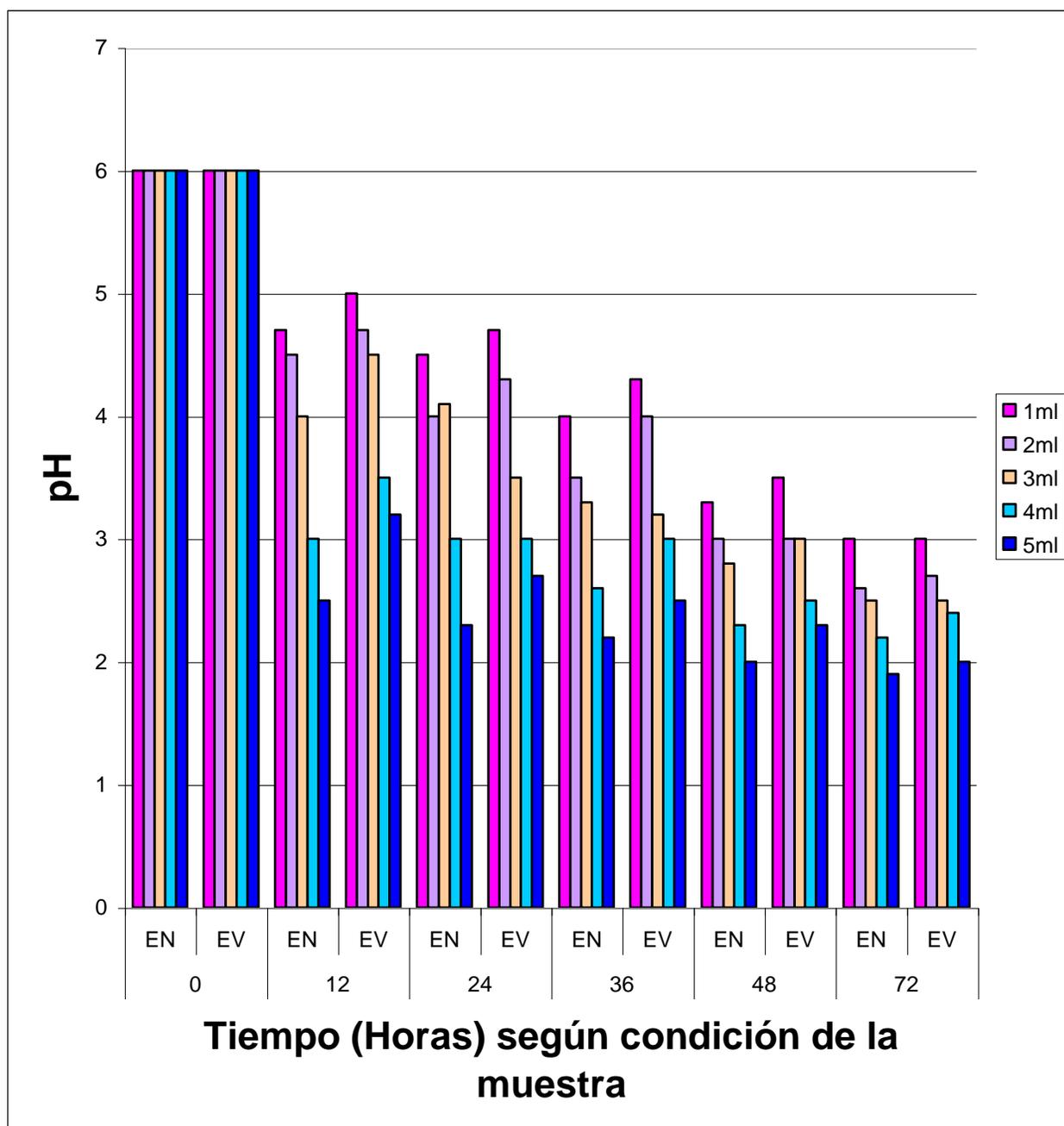
En lo que respecta a las mediciones de pH realizadas a las muestras de sardina (*Sardinella anchovia*) conservadas en refrigeración a 10°C o en hielo a una temperatura entre los 10-15°C, se realizó un promedio de los datos de pH obtenidos bajo las condiciones de almacenamiento anteriores según los volúmenes de *Lactobacillus acidophilus* [10<sup>7</sup>UFC/ml] adicionados, ya que en estas, las variaciones fueron imperceptibles (Cuadro 11).

**Cuadro 11.** pH promedio de las muestras de Sardina (*Sardinella anchovia*) enteras (EN) y esvisceradas (EV) mantenidas en hielo (10-15°C) y refrigeración a 10°C según el volumen agregado de *Lactobacillus acidophilus* [10<sup>7</sup>UFC/ml].

	pH según el Tiempo (Horas)											
	0		12		24		36		48		72	
Volumen de <i>Lactobacillus acidophilus</i> [10 <sup>7</sup> UFC/ml] (ml)	EN	EV	EN	EV	EN	EV	EN	EV	EN	EV	EN	EV
1	6.6	4.7	5.4	5.7	4.0	4.3	3.3	3.5	3.0	3.0	3.0	3.0
2	6.6	4.5	4.7	4.0	4.3	3.5	4.0	3.0	3.0	3.0	2.6	2.7
3	6.6	4.0	4.5	4.1	3.5	3.3	3.2	2.8	3.0	2.5	2.5	2.5
4	6.6	3.0	3.5	3.0	3.0	2.6	3.0	2.3	2.5	2.2	2.4	2.4
5	6.6	2.5	3.2	2.3	2.7	2.2	2.5	2.0	2.3	1.9	2.0	2.0

*Fuente:* Datos experimentales.

Como se puede observar en el cuadro anterior, al aumentar el volumen agregado de *Lactobacillus acidophilus* [10<sup>7</sup>UFC/ml] a las muestras enteras de sardina (*Sardinella anchovia*) se da un aumento acelerado en la acidez del producto, hasta llegar a un pH =1.9 con la inoculación de 5 ml de *L. acidophilus* [10<sup>7</sup>UFC/ml]; de igual forma, en las muestras de sardina (*Sardinella anchovia*) esvisceradas, se produce un decrecimiento paulatino en los niveles de pH hasta llegar a un pH=2 , lo cual es muy parecido a lo que sucedió con las muestras enteras. En términos generales, las muestras de sardina (*Sardinella anchovia*) enteras o esvisceradas al ser inoculadas con volúmenes de 1-5ml de *L. acidophilus* [10<sup>7</sup>UFC/ml] sufrieron una disminución paulatina de pH al transcurrir las 72 horas de almacenamiento, ya sea en refrigeración a 10°C o en hielo y esto se tradujo en un aceleramiento del proceso de deterioro del producto ya que la carne del mismo se deshizo al pasar el tiempo de almacenaje (10-15°C) (Figura 12).



**Figura 12.** Valores de pH promedio en las muestras de Sardina (*Sardinella anchovia*) enteras (EN) y esvisceradas (EV) mantenidas en hielo (10-15°C) y refrigeración a 10°C según el volumen agregado de *Lactobacillus acidophilus* [ $10^7$ UFC/ml].

Fuente: Datos experimentales.

Como se observa en la figura anterior, a mayor volumen agregado de *Lactobacillus acidophilus* [ $10^7$ UFC/ml] mayor es la variación en el pH de la muestra.

Es importante resaltar que bajo temperatura de congelación, las muestras de sardina no sufrieron ninguna alteración en los valores de pH ( $\text{pH}=6\pm 0.2$ ), es decir este permaneció constante a lo largo de las 72 horas de almacenamiento.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

## DISCUSION

### CONFRONTACIÓN DIRECTA BACTERIA/BACTERIA

En general se observa un antagonismo bastante bajo del *Lactobacillus acidophilus* sobre la *Salmonella enteritidis* que está estrictamente ligado a las disminuciones del pH en el medio de cultivo hasta niveles críticos ( $\text{pH} = 2 \pm 0.2$ ) para el desarrollo de la *Salmonella enteritidis*, ésta disminución se da como consecuencia de una alta concentración de *Lactobacillus acidophilus* (de  $10^6$ - $10^7$ UFC/ml) vs una baja concentración de *Salmonella enteritidis* (de  $10^1$ - $10^3$ UFC/ml).

Todos los microorganismos tienen un pH óptimo de crecimiento y un intervalo de pH fuera del cual les resulta imposible proliferar. Esto se refiere al pH del medio o extracelular, ya que el pH intracelular tiene que estar necesariamente cerca de la neutralidad, incluso el de los organismos que crecen mejor a pHs ácidos (acidófilos) (Roth, 1998).

En todos los casos en los que se dio la formación de halos de inhibición (de 9-16mm) se obtuvo un pH extracelular muy alejado de 7, lo cual pudo ocasionar la perturbación del gradiente de protones, que es el principal componente de la fuerza proto-motriz, necesaria para los procesos de transporte a través de la membrana, motilidad y síntesis de ATP acoplada al proceso respiratorio (Roth, 1998).

La inhibición provocada por la disminución del pH en el medio de cultivo pudo ocasionar que esta condición ácida atravesara la membrana plasmática y una vez en el interior de la bacteria, el ácido se disociara afectando directamente el pH intracelular microbiano (Östling y Lindgren, 1993). Esto puede afectar gravemente el metabolismo de la *Salmonella enteritidis*, ya que lo anterior afecta al gradiente de protones y de carga con el exterior, e interfiere con los sistemas de transporte de aminoácidos y fosfatos. Además, muchas enzimas esenciales para el metabolismo microbiano se inactivan a pHs ácidos.

Otra consecuencia negativa de este proceso pudo ser el aumento de turgor celular. Al producirse la disociación del ácido en el interior de la célula, la concentración interna de aniones va a aumentar. Esto a su vez, desencadena un mecanismo de compensación de la carga eléctrica que obliga a la bacteria a aumentar los niveles de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y glutamato, y como consecuencia se da un incremento de la fuerza iónica intracelular y del

turgor. Este proceso pudo ser responsable de un gran aumento de la presión mecánica sobre la pared del microorganismo, lo que hace que eventualmente estalle (Foster, 1999).

Por otra parte, es importante resaltar que el crecimiento de los halos de inhibición se dio hasta las 36-48 horas, después de este tiempo se mantuvo constante, esto pudo deberse al desarrollo de resistencia a las condiciones ácidas por parte de la *Salmonella enteritidis*. Las bacterias experimentan diferentes tipos de "estrés" en su vida diaria, a los cuales deben adaptarse. La *S. enteritidis*, tiene que tolerar episodios de bajo pH desarrollando el fenómeno de tolerancia inducida a estrés ácido; este mecanismo de adaptación estriba en que el crecimiento inicial a un pH moderadamente ácido induce la síntesis de proteínas específicas, las cuales protegen a las células a pHs extremadamente ácidos (Slonczwski y Foster, 1996).

La disminución del pH extracelular acaba provocando una disminución del pH intracelular. Esto es debido a la difusión pasiva de los protones, a pesar de que la membrana plasmática de la célula es bastante impermeable a estas moléculas. Este decrecimiento del pH intracelular activa la expresión de genes que codifican descarboxilasas de aminoácidos y estas enzimas pueden elevar el pH interno, ya que catalizan reacciones en las que se consumen protones (Slonczwski, 1990; Foster, 1996).

Además, la disminución del pH interno produce la acumulación de dos importantes proteínas reguladoras: RpoS y PhoP. Estos reguladores controlan distintos conjuntos de genes que están implicados en la protección y reparación de macromoléculas (Kwon, 1998).

En lo que respecta a las pruebas de antagonismo realizadas en la gelatina nutritiva modificada con harina de pescado, mediante el método de "Botón en césped", no se obtuvieron resultados de antagonismo debido a que quizás, el medio de cultivo no contenía los requerimientos nutricionales básicos para el crecimiento de la cepa de *Lactobacillus acidophilus*, este medio más bien parecía inactivar a este microorganismo es decir, al no darse crecimiento de la cepa de *Lactobacillus acidophilus*, no se produjo una disminución de pH y por lo tanto, este se mantuvo en condiciones óptimas para el desarrollo bacteriano de la cepa de *Salmonella enteritidis*.

## **CONFRONTACION DIRECTA SOBRENADANTE DE *Lactobacillus acidophilus* /BACTERIA**

En esta etapa del trabajo, no se obtuvieron resultados positivos, comprobándose de esta forma, que la formación de los halos de inhibición en la primera fase del trabajo se dio como consecuencia directa de la disminución en el pH del medio de cultivo provocado por las altas concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* ( $10^6$ - $10^7$ UFC/ml) vrs las bajas concentraciones de *Salmonella enteritidis* ( $10^1$ - $10^3$ UFC/ml) y no por la formación de compuestos extracelulares como bacteriocinas por parte de la cepa de *Lactobacillus acidophilus*. Por lo tanto, la formación de halos de inhibición en este proceso de antagonismo fue directamente proporcional a la concentración de *Lactobacillus acidophilus* e inversamente proporcional a la concentración de *Salmonella enteritidis*, y fue afectada directamente por la acidificación del medio de cultivo a través del tiempo (72h) hasta niveles críticos de crecimiento para el patógeno (pH<7).

## **EFFECTOS DEL *Lactobacillus acidophilus* EN EL PESCADO**

El tejido de los peces se caracteriza por su riqueza en nitrógeno proteico y no proteico (aminoácidos, óxido de trimetilamina (OTMA), creatinina), pero el contenido de carbohidratos es escaso, lo que origina un pH *post mortem* alto (> 6,0), sin embargo al adicionar volúmenes desde 1 hasta 5 ml de *Lactobacillus acidophilus* ( $10^7$ UFC/ml) se provocó un descenso brusco de pH en la carne de pescado, que se aceleró cuanto mayor fue el volumen agregado, provocando una aceleración de la condición denominada “deterioro” que se da como consecuencia de la combinación de fenómenos autolíticos, químicos y microbiológicos.

La pérdida inicial de frescura de la sardina (*Sardinella anchovia*) entera, se dio quizás como consecuencia de cambios autolíticos, ya que se desarrollaron olores y coloraciones extrañas probablemente consecuencia de la acción de las enzimas intestinales en las muestras; mientras que el deterioro probablemente se produjo como consecuencia de un cambio en la microflora dominante, de manera que pasó a estar formada principalmente por especies bacterianas acidófilas, levaduras y hongos causando una aceleración del proceso de deterioro principalmente en las muestras enteras y como consecuencia olores extraños y supuraciones; todo esto producto de la brusca disminución del pH principalmente en las muestras inoculadas con volúmenes entre 3-5ml de *Lactobacillus acidophilus* ( $10^7$ UFC/ml). En las

muestras inoculadas con 1 y 2 ml de *Lactobacillus acidophilus* ( $10^7$ UFC/ ml) también se dio el proceso anterior sólo que más lentamente.

No obstante, en el pescado congelado la acción bacteriana se encontró probablemente inhibida, por lo tanto, el óxido de trimetilamina (OTMA) fue descompuesto por la acción de enzimas autolíticas en dimetilamina (DMA) y formaldehído (FA):



Los efectos del FA formado en el pescado congelado ocasionaron: el aumento de la desnaturalización del músculo del pescado y cambios en la textura, sin embargo estos fueron prácticamente imperceptibles a lo largo de las 72 horas.

Es importante tomar en cuenta que el antagonismo bacteriano es un proceso multifactorial. Al ser este trabajo una evaluación preliminar no se consideraron muchos de estos factores, por lo tanto debe tenerse presente que si la cepa ensayada de *Lactobacillus acidophilus* no resultó ser efectiva en el antagonismo contra la *Salmonella enteritidis*, esto no significa que no tiene actividad. Este resultado puede ser consecuencia del tipo de aislamiento, el medio de cultivo o la metodología.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos es necesario optimizar el procedimiento para la aislamiento de metabolitos secundarios, específicamente bacteriocinas, que permita una evaluación más precisa de las mismas.

Es necesario, evaluar los cultivos de *Lactobacillus acidophilus* en diferentes edades de crecimiento para el ensayo de aislamiento de bacteriocinas y de esta forma, poder corroborar si la producción de los compuestos está ligado a este factor y también para abarcar la posibilidad de que se produzca este compuesto fuera del rango tiempo que se evaluó.

Es imposible dejar de lado que el análisis *in vitro* solamente permite comprender un mínimo nivel del comportamiento antagónico bacteriano, por lo cual no se pueden hacer conclusiones irrefutables sobre el efecto antagónico del *Lactobacillus acidophilus* sobre la *Salmonella enteritidis* en pescado, si se pretende utilizar a estos microorganismos como biopreservantes, deben realizarse múltiples ensayos.

Además de utilizar diferentes periodos de tiempo en los cultivos para evaluaciones posteriores y las variaciones que se puedan dar en la metodología, podría incluirse el aislamiento de bacterias acidolácticas del

intestino de los peces, ya que estas han sido reportadas por algunos autores como excelentes biopreservantes de la carne de pescado.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

## CONCLUSIONES

Se logró determinar una actividad antagónica *in vitro* mínima por parte del *Lactobacillus acidophilus* sobre la *Salmonella enteritidis* (10%).

La evaluación antagónica Bacteria/Bacteria mediante el método de botón en césped, demostró que el posible potencial antagónico del *Lactobacillus acidophilus* se encuentra directamente ligado a la disminución del pH en la zona de inhibición.

Se demostró que la actividad antagónica del *Lactobacillus acidophilus* sobre la *Salmonella enteritidis* está relacionada con una alta concentración del *L.acidophilus* y una baja concentración de la *S.enteritidis*.

La evaluación antagónica Metabolito Secundario/Bacteria no presentó resultados positivos, por lo que se hace necesario trabajar más fuertemente en esta área debido a las dificultades que se presentaron en esta fase del proyecto.

Al ser esta una evaluación preliminar, solo brinda una idea del potencial que eventualmente podría tener el *Lactobacillus acidophilus* sobre la *Salmonella enteritidis*. Es necesario realizar más pruebas con otros medios de cultivo, y otras bacterias ácido-lácticas así mismo trabajar en el aislamiento de cultivos ácido-lácticos del aparato intestinal de los peces y proceder de forma más analítica con la extracción de metabolitos secundarios por electroforésis.

## RECOMENDACIONES

Es de suma importancia ensayar una metodología de identificación de bacteriocinas en bacterias ácido-lácticas, de tal forma que se facilite el análisis de estos metabolitos secundarios, porque puede tenerse una cepa que no los produzca

En el caso de la metodología para evaluación de metabolitos secundarios, se recomienda el uso de diferentes periodos y medios de cultivo. Así mismo el uso de aislamiento de bacterias ácido-lácticas del aparato intestinal de los peces, pues estas podrían tener efectos menos drásticos en la calidad del pescado que aquellos cultivos que no sean propios del producto.

En estudios posteriores, es recomendable extraer la bacteria patógena del pescado ya que de esta forma se puede estar seguro de que esta es un riesgo potencial en el producto.

Es necesario, realizar análisis de la calidad del agua en la que viven los peces, para saber si existe alguna carga constante de bacterias patógenas que puedan contaminar el producto en estado *post mortem*, ya que los peces vivos tienen sus músculos en condiciones estériles.

Para estudios posteriores, es necesario tomar en cuenta los pescados que son típicamente obtenidos en la pesca artesanal, ya que para este trabajo se utilizó sólo la sardina (*Sardinella anchovia*) pues esta especie fue más barata y fácil de obtener, pero es más perecedera que otras obtenidas propiamente en la pesca artesanal y esto pudo interferir en los resultados obtenidos.

Es indispensable, que los pescadores artesanales tomen las medidas sanitarias necesarias para controlar la contaminación del producto mediante el uso de guantes, desinfección o limpieza del suelo de las lanchas, lavado de manos y de utensilios utilizados en el esvicerado del producto así como el almacenamiento del mismo a temperaturas de congelación.

Los pescadores artesanales, pescan por algunas horas y regresan a vender sus capturas mientras los peces continúan muy frescos, por lo tanto, no requieren un sistema complicado de aseguramiento de la calidad. Sus compradores conocen muy bien la calidad del pescado y generalmente el pescado es capturado, vendido y consumido en el mismo día. Por tal motivo, la adición de biopreservantes debe implementarse en otro nivel de pesca ya sea en la compañía productora de alimentos, procesadora o distribuidora, ya que en estas el producto puede mantenerse en el medio a largo plazo.

Es recomendable, almacenar el producto en condiciones de congelación (-21 a -24°C) para mantenerlo en condiciones óptimas para el consumo humano.

Finalmente, se recomienda a los consumidores consumir el pescado fresco y suficientemente cocinado además de evitar comerlos crudos o casi crudos, para prevenir de esta forma problemas de intoxicación alimentaria relacionados con la *Salmonella enteritidis* y otras bacterias patógenas.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

- 📖 Arroyo, G; Arroyo, J. 1995. Detection of *Salmonella* serotypes in edible organ meats from markets in Madrid, Spain. *Food Microbiol.*12 (3):13-20.
- 📖 Aymerich, M. 1998. Estado actual de la bioconservación en productos cárnicos. *Eurocarne.* 72:39-49.
- 📖 Bauer, A; Kirby, W; Sherris, J; Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 45: 493-496.
- 📖 Daeschel, M. 1991. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.*43:164-167.
- 📖 Ewing, W. 1986. Edwards and Ewing's identification of *Enterobacteriaceae*. 4<sup>a</sup> ed. New York: Elsevier. 500 p.
- 📖 FAO ,1996. Review of the state of world marine fishery resources. *FAO Fish. Tech.* 335 p.
- 📖 Foster, J. 1999. *Current Opinion in Microbiology*, 2: 170-174.
- 📖 Garriga, M; Aymerich, T; Costa, S; Monfort, J; Hugas, M. 2000. Las altas presiones en combinación con bacteriocinas como nueva tecnología de conservación en productos cárnicos. *Eurocarne.* 87:59-63.
- 📖 Hugas, M; Pages, F; Garriga, M; Monfort, J. 1998. Application of the bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* CTC494 to prevent growth of *Listeria* in fresh and cooked meat products packed with different atmospheres. *Food Microbiology.* 15: 639-650.
- 📖 Huss, N. 1976. Quality and keeping time of fresh and frozen argentinean hake. *FAO-FII-UNDP/76/10.* 55 p.
- 📖 Kwon, Y; Ricke, S. 1998. *Applied and Environmental Microbiology.* 64: 3458-3463.
- 📖 Lee, J. 1993. An introduction to application of the hazard analysis critical control point .HACCP. *MTS J.*25:34-9.
- 📖 Liepe, H. 1993. Starter cultures in meat production. *Biotechnology.* 600 p.
- 📖 Monfort, J. M; Hugas, M; Pagés, F; Garriga, M. 1996. Comparación de diferentes lactobacilos productores de bacteriocina sobre el crecimiento de *Listeria* en salchichones. *Eurocarne.* 48: 51-55.

- 📖 Morán, N. 2000. Resumen de XVII Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de Alimentos. En: Congreso Internacional de Seguridad Alimentaria. (II. Guadalajara, México) p. 1-15.
- 📖 Östling, C; Lindgren, S. 1993. Appl. Bacteriology. 75: 18-24.
- 📖 Piard, J. 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Lait. 72: 113-142.
- 📖 PRADEPESCA. 1995. Encuesta de las actividades pesqueras con énfasis en la pesca artesanal. Enfoque Regional. Istmo Centroamericano. 48 p.
- 📖 Ramos, J. 1997. "Salmonelosis no tifoidea e infección por el virus de la inmunodeficiencia humana". Medicina Clínica. 108:9-12.
- 📖 Roth, F; Kichgener, M. 1998. Feed Sci. 7:25-33.
- 📖 Schillinger, U. 1990. Lactic acid bacteria as protective culture in meta products. Fleischwirtsch. 70: 1296-1299.
- 📖 Shewan, J. 1974. The biodegradation of certain protein stuff of chill temperature. Torry Research Station Memory (Aberdeen, UK), 32:7.
- 📖 Slonczewski, J; Foster, J. 1990. *Escherichia Coli* and *Salmonella Typhimorium*. Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology. 1600 p.
- 📖 Sockett, P; West, P; Jacob, M. 1995. Shellfish and public health. Publ Hith Labor Serv Microbiol Diag. 2:29-35.
- 📖 Stiles, M. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. Ant. van Leeuw. 70:331-345.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Esquema de clasificación utilizado en la evaluación organoléptica de sardina (*Sardinella anchovia*).

APARIENCIA CONSISTENCIA	OLOR	AGALLAS	OJOS	CARNE	CAVIDAD ABDOMINAL Y VÍSCERAS	PUNTAJE	CALIDAD
Firme, oscura, rígida, elástica a la presión de los dedos.	Muy fresco, olor a algas, específico de la especie.	Rojo brillante, secreción, acuosa transparente.	convexos, pupilas negras, córnea transparente	marrón rojiza, sin estrías, firmemente, adherida al espinazo.	Firmes	5	Óptima
Firme, sin decoloraciones, regresa rápido a su posición.	fresco, específico de la especie.	Rosado oscuro, secreción escasa.	Con puntos rojos y negros	adherida al espinazo	Elástica, vísceras consistentes	4	Muy buena
Firme, algo de decoloración. Aceptable	Pérdidas de olor, sin olores extraños.	manchas pardas, secreción opalescente.	Algo planos. Corneas opacas.	Semi-resistente al desprendimiento del espinazo.	Poco elástica con pequeñas estriaciones	3	Buena
Blanda, se hunde fácilmente. Notorias decoloraciones. Olores extraños, suaves, ligeramente amoniacal	Olores extraños, suaves, ligeramente amoniacal.	Manchas casi negras, secreción opaca.	Hundidos, manchas sanguinolentas, con pupilas claras	Fácil desprendimiento del espinazo, con estrías.	Blanca, Vísceras sin consistencia	2	Regular
Muy blanda, puede romperse, muy decolorado.	Olores extraños fuertes, amoniacal, nauseabundo.	Manchas negras, secreción sucia, mugrosa	Córnea rugosa, encogida. Pupila blanquecina.	Sin consistencia, aspecto de cera.	Muy blanda, vísceras sobresalientes gelatinosas, o maceradas, se deshacen.	1-0	Rechazadas

Fuente: Shewan, 1974 y Huss, 1976.