



Universidad de Jaén

Facultad de Ciencias
Experimentales

Análisis microbiológico comparado en mariscos congelados y frescos

Autor: Sergio Campos Quesada

Grado: Biología

Fecha: Julio, 2024



CREA



**Universidad
de Jaén**



Trabajo Fin de Grado

Análisis microbiológico comparado en mariscos congelados y frescos

Alumno: Sergio Campos Quesada

Jaén, Julio, 2024

ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Introducción	2
2.1. Microbiología de los Alimentos como ciencia.....	2
2.2. Uso de microorganismos en la cadena alimentaria.....	2
2.3. Importancia de la seguridad alimentaria	4
2.4. Vías de contaminación de los alimentos	5
2.4.1. Contaminación biológica.....	6
2.4.2. Contaminación química	6
2.4.3. Contaminación física	7
2.5. Principales microorganismos presentes en alimentos	7
2.5.1. Patógenos en pescados y mariscos	8
2.5.2. Conservación de pescados y mariscos	10
2.6. Mecanismos de resistencia microbianos.....	11
2.7. Posibles medidas de prevención de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs)	13
3. Objetivos	15
4. Material y métodos	15
4.1. Elaboración de medios de cultivo.....	15
4.1.1. Medio TSA (Scharlab, Barcelona)	16
4.1.2. Medio Agar MacConkey.....	17
4.1.3. Medio EMB	17
4.1.4. Medio KAA.....	18
4.1.5. Medio YGC	19
4.2. Preparación de placas de cultivo y solución salina	20
4.3. Selección de mariscos, homogeneizado y siembra de muestras por diluciones seriadas	23
4.4. Recuento y selección de colonias	26
4.5. Tinción de Gram y análisis macro y microscópico	27
4.6. Prueba de la catalasa	28

5. Resultados y discusión	28
5.1. Recuento y cálculo de unidades formadoras de colonias (UFC/g) en mariscos congelados y frescos	28
5.1.1. Crecimiento en almejas	29
5.1.2. Crecimiento en sepia	30
5.1.3. Crecimiento en chipirón	31
5.2. Resumen del recuento de colonias y UFC/g en mariscos congelados y frescos	33
5.3. Evaluación macro y microscópica de colonias bacterianas en mariscos congelados	35
5.4. Evaluación macro y microscópica de colonias bacterianas en mariscos frescos	38
5.5. Prueba de la catalasa	41
5.6. Caracterización de las colonias bacterianas seleccionadas	42
6. Conclusiones	43
7. Bibliografía	44

1. RESUMEN

El mercado de alimentos naturales y sin procesar se ha visto incrementado en los últimos años, teniendo un especial auge para los alimentos de origen acuático, como el pescado o el marisco. Esto supone un grave problema a nivel sanitario, ya que este tipo de alimentos poseen unas características óptimas para el crecimiento microbiano. Por ello, es muy importante que se mantengan todas las medidas de seguridad alimentaria permitidas para evitar la transmisión de patologías a partir de alimentos contaminados. Por otro lado, estos microorganismos también pueden tener un papel fundamental en la industria de productos alimentarios, médicos o de belleza, por lo que es necesario que se puedan identificar de forma efectiva para evitar riesgos. En el presente estudio se busca comparar la carga microbiana presente en diferentes muestras de marisco congelado y fresco, adquiridas en distribuidoras locales para llevar a cabo un análisis, con mayor representatividad, del aislamiento y clasificación de dichas bacterias.

Palabras clave: alimentos, crecimiento bacteriano, mariscos congelados y frescos, medio de cultivo y microorganismos patógenos.

1. ABSTRACT

The market for natural and unprocessed foods has increased in recent years, with a significant peak in aquatic foods such as fish and seafood. That represents a serious health problem, as these foods have optimal characteristics for microbial growth. It is therefore very important that all permitted food safety measures are maintained to prevent the transmission of pathologies from contaminated food. On the other hand, these microorganisms can also play an important role in the industrial of food, medical or beauty products, so it is necessary that they can be effectively identified to avoid risks. This study aims to compare microbial growth in samples of frozen and fresh seafood purchased from local distributors, in order to carry out a more representative analysis of the isolation and classification of these bacteria.

Keywords: food, bacterial growth, frozen and fresh seafood, culture medium and pathogenic microorganisms.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Microbiología de los alimentos como ciencia

En la actualidad, la microbiología de los alimentos es un ámbito científico muy estudiado e investigado a nivel mundial, no solo por su importancia en elaboración de una gran cantidad de sustentos, sino también debido a las diferentes condiciones patológicas que pueden llegar a causar. En la industria alimentaria se utilizan a los microorganismos para la producción de numerosos productos que posteriormente serán consumidos como fuente de energía y nutrientes por personas de todo el mundo. A pesar de que su empleo ha sido extendido desde bastante tiempo atrás, no fue hasta el siglo XIX cuando Louis Pasteur, científico que es considerado por muchos como el fundador de la Microbiología Moderna, descubrió la estrecha relación que existe entre los microorganismos y la producción y deterioro de alimentos, gracias a sus estudios sobre fermentaciones (Mendoza et al. 2003). A partir de ese momento, han sido múltiples las investigaciones que se han llevado a cabo para intentar descubrir nuevas propiedades en microorganismos que permitieran desarrollar nuevas técnicas de fabricación de productos y bienes para el beneficio de la humanidad.

2.2. Uso de microorganismos en la industria alimentaria

Los microorganismos han sido conocidos durante mucho tiempo únicamente por su papel como agentes patógenos, capaces de causar una enfermedad o alteración en el organismo de las personas. Sin embargo, esto dista considerablemente de la realidad, ya que a día de hoy forman parte de numerosos y variados procesos en industrias como la alimentaria, farmacéutica o estética. Muchos investigadores han basado su esfuerzo en el descubrimiento e innovación de nuevas técnicas o mejoras para la producción de microorganismos probióticos o beneficiosos para nuestra salud.

Está previsto que, para el año 2050, la población humana llegue hasta los 9.700 millones de personas, siendo este incremento consecuencia del crecimiento exponencial de nuestra especie en las últimas décadas. Como consecuencia de esta sobrepoblación, el suministro de alimentos, agua potable y demás víveres y

necesidades mínimas para poder llevar una vida plena puede verse comprometido, por lo que es fundamental que se lleve a cabo una buena gestión de los productos bajo demanda y de los alimentos (Gutiérrez et al., 2020).

Por ello, cada vez más se está implementando el uso de microorganismos en la producción de alimentos, tanto para la creación de productos de consumo humano como para la conservación de los mismos. Además, algunos proporcionan de forma eficaz grandes beneficios para la salud, como es el caso de los probióticos, cuyas propiedades los han convertido en uno de los principales ingredientes en una variada selección de sustancias, principalmente lácteos (Castillo et al., 2019). Entre los beneficios que aportan los probióticos se encuentran un correcto mantenimiento de la homeostasis intestinal, reducción del riesgo de padecer cáncer y un decrecimiento de los niveles de colesterol en sangre, previniendo el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Kechagia et al., 2013).

Otros microorganismos son empleados en los procesos de fermentación, es decir, la transformación o degradación de una matriz de carbohidratos a otra, en ausencia de oxígeno, hasta su paso a compuestos más simples, con características diferentes a las originales, que dependerán del tipo de fermentación usada, el pH o el microorganismo empleado (García et al., 2010). Entre los procesos de fermentación láctica, las bacterias mayormente utilizadas son las bacterias ácido lácticas (BAL), que pertenecen a géneros como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* o *Streptococcus*, destacando algunas especies como *Lactobacillus bulgaris* (Andreu et al., 2022).

También participan en la creación de bebidas alcohólicas, como es el caso del vino, donde participan también bacterias pertenecientes al grupo de las BAL como *Lactobacillus*, *Oenococcus* o *Pediococcus*, aunque el principal microorganismo empleado es *Saccharomyces ellipsoideus*, una levadura capaz de fermentar el zumo de uva o mosto de forma rápida y eficaz (Ciani et al., 2016), siendo resistente a medios ricos en alcohol, lo que la convierten en una candidata muy competente.

2.3. Importancia de la seguridad alimentaria

Tras el descubrimiento de los microorganismos y su papel en la producción de patologías, en la industria alimentaria, la inocuidad de sus productos se ha convertido en uno de los principales objetivos a tener en cuenta, no solo para ofrecer y garantizar la máxima seguridad y esterilidad durante su manufacturación y distribución, sino también para evitar grandes tensiones financieras (Tesson et al., 2020). Hablamos de seguridad alimentaria cuando se pueden adquirir sin impedimentos alimentos nutritivos y descontaminados, según las preferencias de cada persona, que le permitan satisfacer sus requerimientos y poder llevar una forma de vida sana y activa (FAO, 1996).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud ([OMS], 2020), cada año se estima que alrededor de 600 millones de personas contraen una enfermedad por ingestión de alimentos contaminados y de ellas, 420 000 terminan falleciendo. Por ello, en los últimos años, se ha buscado desarrollar nuevas técnicas que aumenten y mejoren en gran medida la calidad de los alimentos, además de facilitar la no modificación de sus propiedades organolépticas (Tropea, 2022).

En la mayoría de los casos, además, la contaminación bacteriana no supone la presencia y acción de un único tipo de parásito, sino que también es posible que se favorezca a su vez la susceptibilidad del huésped para ser infectado por un mayor número de microorganismos oportunistas. Un ejemplo de acción conjunta microbiana lo encontramos en la bacteria *Giardia duodenalis*, que actúa de forma conjunta con *Rotavirus* o *Vibrio Cholerae* para producir una coinfección (Bondi et al., 2014).

El 25% de todos los alimentos producidos a nivel mundial se pierden debido al deterioro microbiano (Bondi et al., 2014). Sin embargo, no hay que confundir el concepto de alimento contaminado y deteriorado. Se define como alimento deteriorado a toda sustancia comestible que ha disminuido sus propiedades organolépticas o sus propiedades características y nutritivas, debido a la acción de factores biológicos o externos a él (Garcinuño, 2013). Por su parte, un alimento se encuentra contaminado cuando posee un número determinado de microorganismos por una mala conservación o preparado, o bien alguna toxina derivada de los mismos

o sustancia química que cause enfermedad al ser consumido (Vásquez de Plata, 2003).

Es importante distinguir ambos conceptos a la hora de decidir ingerir o no un determinado producto y poder prevenir cualquier tipo de patología derivada.

2.4. Vías de contaminación de los alimentos

Los productos de consumo, antes de ser expendidos y adquiridos, deben de satisfacer diversos objetivos que aseguren al consumidor una mínima seguridad alimentaria. Sin embargo, en muchas ocasiones esto puede no cumplirse, y los productos pueden adquirir una carga bacteriana suficiente para clasificarlos como no aptos para el consumo.

El procesado de alimentos conforma una serie de pasos realizados desde la obtención de la materia prima del medio natural hasta su transformación en producto alimentario y consumición (Nerín et al., 2016). Es fundamental la investigación y determinación de los principales focos de contaminación en la cadena de procesamiento, para poder disponer de recursos para la prevención de los potenciales patógenos y facilitar el esterilizado alimentario (Pakdel et al., 2023).

Existen varios mecanismos de contaminación alimentaria, atendiendo al tipo de agente que la produzca, siendo la más común la infección biológica.

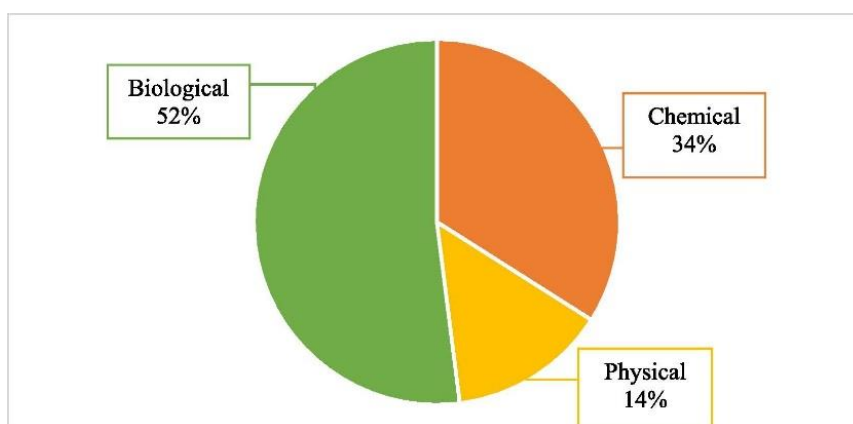


Figura 2.4.1. Representación gráfica de las principales formas de contaminación de los alimentos (Pakdel et al., 2023)

2.4.1. Contaminación biológica

Existen tres principales tipos de contaminación biológica, dependiendo del material al que afecte:

- Contaminación primaria, cuando la infección se produce en alimentos crudos o sin procesar. Este es el caso de productos como la leche o vegetales como las frutas o verduras, cuya composición es óptima para el crecimiento bacteriano (Garcinuño, 2013).
- Contaminación directa, que corresponde con el paso de un microorganismo desde un alimento contaminado a otro que no lo estaba, siendo el agente causante la manipulación humana (Zamora et al., 2019).
- Contaminación secundaria, donde el origen de la contaminación se encuentra en una mala higiene, desinfección o esterilización de utensilios de cocinado o procesamiento (Garcinuño, 2013).

Entre estas, destaca la contaminación cruzada como principal forma de acceso de los microorganismos en la cadena alimentaria, es decir, el paso de un agente biológico contaminante desde la superficie o producto en el que se encuentra hasta otro que no lo incluía (Jiménez, 2014).

Asimismo, la capacidad que muchos microorganismos poseen para formar biopelículas o biofilms como mecanismo de resistencia bacteriana y protección frente a los factores del medio, además de facilitar su adhesión a extensiones inertes o vivas, contribuye a su supervivencia, por lo que es primordial emplear las medidas higiénicas necesarias para su eliminación (González et al., 2016). Esta característica no es exclusiva de un determinado grupo de bacterias, sino que, bajo las condiciones adecuadas, todas las bacterias pueden utilizarlos y beneficiarse de ella (Donlan et al., 2002).

2.4.2. Contaminación química

Engloba a todos los procesos que hacen uso de algún tipo de sustancia no natural durante el procesamiento de los productos alimenticios. Los agentes químicos pueden estar presentes en varias fases de la cadena de alimentos, desde el uso de pesticidas

para evitar la destrucción de cultivos durante la fase de producción de la materia prima hasta el empleo de conservantes para la fase de almacenado y distribución de los productos (Garvey, 2019). Algunas personas, debido a la exposición y consumo de estas sustancias, han desarrollado ciertas alergias y enfermedades asmáticas al tratarse de agentes capaces de actuar como alterantes endocrinos. Entre estas sustancias se encuentra el tributilestaño, un biocida o pesticida muy utilizado entre los agricultores, capaz de causar un estrés oxidativo en los ganglios linfáticos y provocar patología (Kato et al., 2013).

2.4.3. Contaminación física

Este tipo de contaminación tiene lugar cuando en los alimentos se encuentran elementos ajenos a los mismos y que no deberían estar en ellos, como pueden ser materiales plásticos, trozos de metal o vidrios, entre otros. Sin embargo, la contaminación radiactiva, que está incluida en este apartado, también es muy frecuente en los alimentos, ya que prácticamente todos contienen alguna partícula con radioactividad en su composición material. En la mayoría de casos, la cantidad ingerida de radionucleidos es ínfima y poco perjudicial para la salud, aunque puede variar dependiendo de la zona de producción y las actividades de agrarias, aumentando hasta niveles perjudiciales para la salud (IAEA, 2020).

2.5. Principales microorganismos presentes en alimentos

Los alimentos, debido a las propiedades que poseen, pueden actuar como vehículo de un gran número de microorganismos (Campos et al., 2003), ocasionando graves daños en los consumidores que lo ingieran, por lo que es muy importante el estudio de las formas más comunes de estos agentes encontrados en alimentos. Dependiendo de las características del producto, este va poder ser colonizado por un grupo de microorganismos u otros, por lo que es interesante analizar de forma individual cada conjunto de alimentos con propiedades y composición similares.

En un estudio realizado en el año 2010 por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2010) sobre la presencia de determinados grupos bacterianos causantes de enfermedad en alimentos a nivel mundial, se puede apreciar un incremento en la

contaminación por patógenos en alimentos en áreas con un menor desarrollo sociocultural y sanitario, como es el caso de algunas regiones del continente africano, donde prevalecen un mayor número de bacterias en los alimentos en comparación con otras regiones más desarrolladas, tales como Europa o América. Destaca una alta cantidad de microorganismos incluidos en el grupo de las enterobacterias como principal organismo causante de enfermedad presente en los alimentos de las zonas con menor grado de desarrollo, en relación con el resto de disposiciones geográficas alrededor del mundo seleccionadas para el estudio.

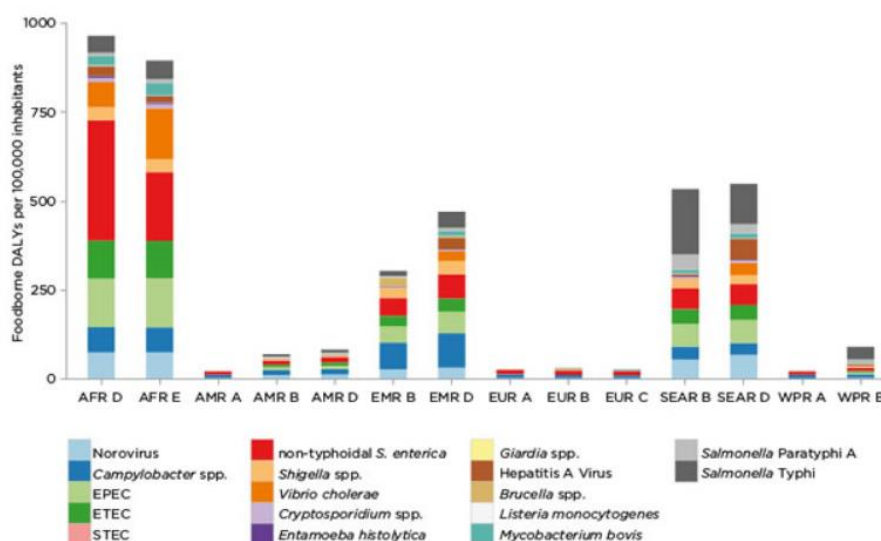


Figura 2.5.1. Principal carga microbiana de las enfermedades de transmisión alimentaria (OMS, 2010)

2.5.1. Patógenos en pescados y mariscos

Los productos alimentarios de origen marino, como el marisco y el pescado, son considerados como producto básico en la dieta de muchas comunidades alrededor del mundo, lo que no es nada extraño si consideramos que, mediante su consumo, obtenemos una gran cantidad de nutrientes esenciales.

Tan solo el pescado se ha convertido en la primera opción de elección para la ingesta de proteína de origen animal a nivel global, alcanzando un total de 161 millones de toneladas consumidas solo en el año 2022 (Statista, 2023), y su expansión sigue en aumento. Otros alimentos, como el marisco, tampoco se queda atrás.

Además, poseen un elevado valor nutritivo, no solo a nivel proteico, sino también en cuanto a vitaminas y minerales como el calcio o el fósforo, así como ácidos grasos poliinsaturados como el Omega-3, que son indispensables en nuestra dieta ya que no somos capaces de sintetizarlos y cumplen un papel importante para el desarrollo del organismo, ya que pueden ayudar a reducir la cantidad de lípidos en la circulación y reducen el riesgo de aterosclerosis e incidencia cardíaca (Dávalos et al., 2005).

Solo en Europa, el consumo de marisco y de animales acuáticos se ha ido incrementando con el paso de los años, alcanzando un total de 15,8 millones de toneladas en 2019, posicionándose como el segundo continente con mayor ingesta de este tipo de sustento. Por otro lado, el implemento de la globalización en las últimas décadas ha contribuido de forma significativa a este incremento de, no solo el consumo de este tipo de productos en prácticamente todos los países del mundo, sino también a su forma de consumición.

Tabla 2.5.2.1. Comparativa entre los distintos niveles de consumo de productos acuáticos por continentes, así como a nivel mundial (FAO, 2022)

Región/categoría económica	Consumo total de alimentos acuáticos (millones de toneladas, equivalente en peso vivo)	Consumo per cápita de alimentos acuáticos (kg/persona/año)
Mundo	157,7	20,5
Mundo, excluida China	100,3	16,0
África	13,1	10,0
Américas	14,8	14,6
América del Norte	8,3	22,7
América Latina y el Caribe	6,4	9,9
Asia	113,1	24,6
Europa	15,8	21,1
Oceanía	1,0	23,2
Países de ingresos altos	32,0	26,5
Países de ingresos medianos altos	72,2	28,1
Países de ingresos medianos bajos	50,0	15,2
Países de ingresos bajos	3,5	5,4

Por otro lado, el implemento de la globalización en las últimas décadas ha contribuido de forma significativa a este incremento de, no solo el consumo de este tipo de productos en prácticamente todos los países del mundo, sino también a su forma de consumición. Debido a la influencia de culturas como la asiática, se ha popularizado el consumo de mariscos y pescados crudos, sin ninguna preparación o cocción previa, por lo que es esencial que se lleve a cabo su manipulación bajo las mejores condiciones higiénicas y de calidad posibles (Miriam et al., 2010).

Por otro lado, su composición alta en agua (alrededor del 70% de total), proteínas y demás compuestos nutritivos, los convierten en un medio con los requerimientos adecuados para el crecimiento microbiano, necesitando así una adecuada conservación y almacenaje para reducir el riesgo de posibles contaminantes (Buorgeois et al., 2004). Algunas de las principales bacterias presentes en pescados y mariscos capaces de infectar al ser humano se pueden clasificar según si provienen o son típicas de medios acuáticos, como es el caso de *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Edwardsiella tarda* o *Plesiomonas shigelloides*, o bien si proceden de las distintas fases del procesado de alimentos, como *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* y *L. monocytogenes* (Herrera et al., 2005).

En un estudio analítico realizado en un mercado de Colombia se encontraron patógenos en muestras de pescado como *Brachyplatistoma sp.*, comúnmente conocido como bagre, y *Oncorhynchus mykiss* o trucha arcoíris, destacando *S. aureus*, *Vibrio spp.*, *Salmonella* y algunos otros coliformes, confirmando la contaminación microbiológica de los alimentos y pudiendo atentar contra la seguridad sanitaria de los posibles compradores (Sanabria et al., 2019).

Otra investigación llevada a cabo en El Salvador, determinó la presencia de *Salmonella spp.* en carne de pescado muestreada, en un total de 50 pescados adquiridos al azar en un mercado mayorista de la ciudad, incumpliendo con ello la vigente normativa técnica centroamericana (RTCA 67.04.50:08) acerca de cantidad de microorganismos máxima que un alimento puede tener para poder ser denominado como apto para el consumo humano. También se incumplió dicha normativa para el caso de *E. coli*, donde 2/3 del total de muestras presentaban infección y para *S. aureus*, con 1/3 sobre la totalidad del pescado (Linares et al., 2020).

2.5.2. Conservación de pescados y mariscos

Es fundamental llevar a cabo un adecuado almacenamiento y conservación de los alimentos una vez que son adquiridos, no solo para mantener sus propiedades nutricionales, sino también para evitar la aparición y colonización por microorganismos que encuentren un óptimo hábitat en estos.

Uno de los mejores métodos de conservación de este tipo de productos es el proceso de congelación, mediante el cual los pescados se someten a bajas temperaturas para favorecer la solidificación del agua que forma parte de su composición, evitando su descomposición por efecto bacteriano (Valls et al., 2006). Además, es importante tener en cuenta el tiempo de congelado, así como la temperatura y condiciones de almacenamiento, ya que estos pueden comprometer la calidad y las propiedades del producto. Para cortos periodos de almacenaje, se recomienda refrigerar las muestras a unos 4°C, ya que a esta temperatura no se ven demasiado afectadas las propiedades organolépticas del alimento, logrando reducir también la actividad bacteriana lo suficiente como para no comprometer su vida útil (Duarte et al., 2020). Por otro lado, se recomienda una extremadamente baja temperatura de congelación para largos periodos de tiempo, debido a que ha sido demostrada su eficacia para asegurar la calidad y evitar el deterioro bacteriano (Choi et al., 2018).

Otra de las técnicas más ambiguas empleadas en la preservación de alimentos de origen marino es la salazón, donde se utiliza una gran cantidad de sal para deshidratar a los alimentos mediante la diferencia osmótica entre el medio interno y externo, reduciendo de forma considerable la presencia de microorganismos. Esta técnica puede ser utilizada junto a otras, como es el caso del ahumado, que consiste en, al igual que otros procedimientos, reducir la cantidad de agua presente en el interior de los alimentos, esta vez mediante la exposición al humo proveniente de la quema de madera. Además, ha sido demostrado que en el humo de determinadas maderas aparecen compuestos capaces de actuar como bactericidas (Marcén, 2000), lo que también disminuye el riesgo de alteración del alimento. También se puede utilizar la sal en conjunto con el vinagre, en un proceso que se denomina escabechado, creando un medio de pH ácido de efecto perjudicial para muchos microorganismos, logrando preservar y aumentar la vida útil del alimento (Dávalos et al., 2005).

2.6. Mecanismos de resistencia microbianos

Uno de los principales problemas que ha surgido en los últimos años ha sido la creciente capacidad de adaptación de los microorganismos como mecanismo de defensa ante determinadas circunstancias. Al encontrarse bajo estrés, son capaces de generar una respuesta específica que les asegure su supervivencia, lo que en la

mayoría de casos supone una mayor capacidad infectiva o grado de virulencia (Suzzi et al., 2020). Esto, aplicado a la alimentación, supone un grave riesgo para los consumidores, ya que pueden contraer distintas patologías, más o menos graves, a partir de la ingesta de alimentos contaminados por estos agentes, comprometiendo de esta forma su vida. De igual forma, esto también genera un especial interés para las industrias de alimentación, ya que las intoxicaciones o patologías provocadas por sus productos puede conllevar a enormes pérdidas a nivel económico. Se estima que para el año 2050, se incrementarán las causas de muerte por resistencias microbianas a tratamientos, superando incluso a las provocadas por tumores, según un estudio realizado por la Organización Mundial de la Salud (Camacho, 2023).

Por otro lado, bajo situaciones de estrés, los microorganismos suelen encontrarse en un estado metabólicamente activo, alterando la estructura de sus componentes y generando con ello una serie de sustancias y variaciones que dificultan enormemente su aislamiento y cultivo y, por tanto, su posible detección e identificación. Esto puede ser, además, el origen de la resistencia debida a la alimentación cruzada, es decir, cuando dos o más especies microbianas cooperan entre sí para resistir el estrés (Dal Bello et al., 2021), lo cual es fundamental para que exista una enorme diversidad de microorganismos y que no haya competitividad entre ellos (MacArthur, 1970).

Los factores de estrés que pueden afectar a los microorganismos en el área de la alimentación se pueden dividir o clasificar en dos, dependiendo de donde se produzcan. Por un lado, se encuentran los factores intrínsecos, que corresponden con el estado de los alimentos, así como su composición y características, como por ejemplo su nivel de pH, osmolaridad o la cantidad de nutrientes disponibles en el medio. Por otro, están los extrínsecos, que se centran en la forma de almacenaje, conservación o grado de procesamiento de los alimentos, destacando métodos de refrigeración, desecamiento, altas presiones y temperaturas elevadas (Ruiz et al. 2017). Con estas técnicas extremas se busca eliminar a los microorganismos presentes de los alimentos, aunque pueden suponer todo lo contrario, por lo que se están desarrollando procesos más suaves que puedan eliminar las posibles formas de resistencia microbiana. Sin embargo, pueden existir algunas bacterias adaptadas frente a las condiciones de estrés que, al no desistir, pueden ser resistentes posteriormente en tratamientos futuros de un determinado paciente o inhibir a los

mecanismos de defensa inmunitarios de nuestro organismo, originando la enfermedad.

El desarrollo de antibióticos marcó un antes y un después en la medicina moderna, así como en la salud mundial. Gracias a ellos, a día de hoy, se ha logrado aumentar la esperanza de vida de la población considerablemente en comparación con la de hace unos siglos, permitiendo optar por una calidad de vida superior a nivel de salud. Sin embargo, el uso indiscriminado de antibióticos en los últimos años ha provocado la aparición de bacterias multirresistentes, que son capaces de sobrevivir aún en presencia de los mismos, desarrollando métodos como la conjugación bacteriana, la transducción o la transformación mediante el paso de material genético de unas a otras, que les permiten resistir frente a distintas problemáticas (Camacho, 2023).

2.7. Posibles medidas de prevención de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs)

Se define como enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) a una serie de patologías cuyo origen se encuentra en la ingesta de productos alimentarios contaminados por microorganismos o sustancias derivadas de ellos (Fernández et al., 2021) y que tienen importancia para el bienestar y salud de los consumidores de forma parcial o total (González et al., 2005).

Los principales motivos de contaminación de los alimentos por microbios corresponden con una mala práctica en su conservación o manipulación, siendo la mayor causa, en un 55,8% de los casos de infección, una inadecuada refrigeración de los productos una vez adquiridos, siempre y cuando sea necesario hasta su consumición. También se pueden destacar la no consumición de alimentos durante 12 horas tras su preparación o cocinado y el manejo de alimentos sin utilizar las medidas de higiene adecuadas, siendo la causa en un 30,8% y 24,2%, respectivamente, mientras que el consumo de alimentos crudos y una mala limpieza de enseres durante el proceso de preparación se encuentran entre las causas menos frecuentes (Maestre et al., 2008).

Hoy en día, muchos consumidores están optando cada vez más por la compra e ingesta de productos bajos en conservantes químicos, por lo que sería interesante optar por medidas de protección y conservación de los alimentos que empleen otro tipo de sustancias. Es por esto que pequeñas empresas e industrias alimentarias están comenzando a utilizar conservantes naturales o la aplicación de tratamientos antimicrobianos físicos sobre sus productos.

Uno de los procesos de conservación natural de los alimentos más usados a día de hoy es la utilización de bacterias del ácido láctico o BAL, que son capaces de generar compuestos como ácidos orgánicos o bacteriocinas, muy útiles frente a la inhibición bacteriana, logrando aumentar considerablemente la vida útil de un gran número de alimentos (Holzapfel et al., 1995). Este grupo bacteriano posee además un amplio número de funciones en la preservación de alimentos, entre las que se encuentra el uso de cepas de BAL mesófilas como protección frente a las altas temperaturas, aumentando la concentración de las mismas de forma competitiva con las posibles bacterias contaminantes invasoras (Vásquez et al., 2009).

Algunas otras estrategias que se encuentran en auge actualmente son los tratamientos de irradiación con luz no térmica, que consisten en aplicar y someter bajo una fuente de iluminación visible a los alimentos, demostrando su eficacia frente a la eliminación de microorganismos a una longitud de onda de 405 nm (Murdoch et al., 2013).

Otro mecanismo que, a pesar de no ser una novedad, posee un alto grado de fiabilidad es la aplicación o sometimiento de ciertos alimentos a altas temperaturas antes de su consumo, lo que favorece la eliminación bacteriana. Esto se ha visto reflejado en estudios realizados empleando salchichas Frankfurt inoculadas con diacetato de sodio o lactato de potasio con *L. monocytogenes*, que fueron almacenadas por métodos convencionales y calentadas en un recipiente con agua para poder medir la carga bacteriana, en un horno microondas a media/alta potencia, y cuyos resultados muestran una clara disminución e inactivación microbiana de hasta 3,7 log UFC/ cm² (Rodríguez et al., 2009).

También pueden emplearse tratamientos con altas presiones hidrostáticas, conocidos como mecanismos de pascalización, mediante los cuales se comprime y sella a los alimentos en un recipiente para después ser llevados hasta una cámara de presurizado, que es llenada con agua sometida a un elevado grado de presión y a una temperatura moderada. Esta fuerza ejercida sobre el alimento va a disminuir la carga bacteriana presente en los alimentos (Téllez et al., 2001). Este método, a diferencia del anterior, donde se sometía a los alimentos únicamente a altas temperaturas, permite conservar sus propiedades organolépticas de forma eficaz, siendo más útil en la industria alimentaria.

3. OBJETIVOS

Objetivo general (OG) → Comparar el nivel de carga bacteriana entre mariscos frescos y congelados.

También se llevaron a cabo una serie de **objetivos específicos (OE)**, cuya función es lograr cumplir con el objetivo principal del estudio, destacando:

- Realizar un recuento del número de unidades formadoras de colonias para cada producto.
- Observar y seleccionar una variedad de colonias morfológicamente diferentes a nivel visual presentes en los alimentos.
- Aislar microorganismos presentes en distintas muestras de alimentos.
- Caracterizar los microorganismos aislados.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Elaboración de medios de cultivo

Para poder proceder con el análisis de las muestras de marisco, se prepararon una serie de medios de sustratos nutritivos en los cuales sembrar y detectar la presencia o ausencia de microorganismos. Los medios se seleccionaron por su capacidad de asegurar el crecimiento de los microorganismos más frecuentes en los alimentos,

asegurando que cumplan con sus requerimientos nutricionales óptimos, obteniendo un total de seis.

4.1.1. Medio TSA (Scharlab, Barcelona)

El medio Tryptone Soy Agar (TSA), es un medio de cultivo general, el más clásico y utilizado, formado fundamentalmente por dos peptonas que facilitan la proliferación de varios tipos de microorganismos, tanto de bacterias aerobias como anaerobias.

Composición del medio (g/L)

- Triptona 15
- Peptona de soja 5
- Agar-agar 15
- Cloruro de sodio 5

Preparación

Se necesitaron un total de 24 gramos de sustrato para un volumen de 600 mL, que fueron debidamente pesados en una balanza de precisión. Se añadieron a un matraz de 1000 mL, junto con 1,2 gramos de más de agar-agar, asegurando la correcta solidificación del medio.

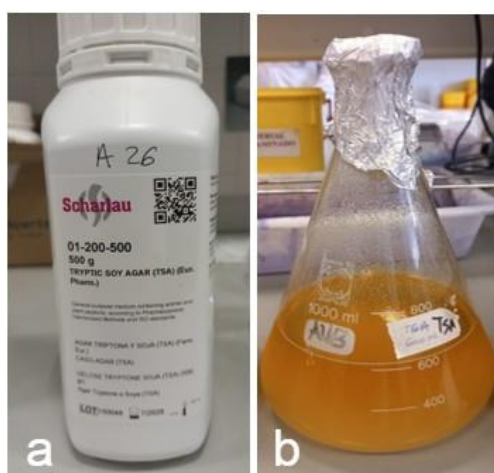


Figura 4.1.1.1. Recipiente con sustrato en polvo del medio TSA (a) y matraz Erlenmeyer con la disolución esterilizada (b). Fuente: Elaboración propia.

4.1.2. Medio Agar MacConkey (PanReac AppliChem)

Es un medio nutritivo selectivo y diferencial, empleado para el crecimiento y aislamiento de bacterias Gram negativas, así como de las principales enterobacterias.

Composición del medio (g/L)

- Peptona 17
- Peptonas de Caseína 1,5
- Peptonas de carne 1,5
- Lactosa Monohidratada 10
- Cloruro de sodio 5

Preparación

Para un volumen de 500 mL, se emplearon 25 gramos de soluto, que fueron incorporados a un matraz de Erlenmeyer de 1000 mL. Se añadió también 1 gramo extra de agar-agar. Seguidamente, se enrasó con agua destilada hasta completar el volumen final.



Figura 4.1.2.1. Bote con el sustrato sólido del medio MacConkey (a) y solución sellada y esterilizada del mismo (b). Fuente: Elaboración propia.

4.1.3. Medio EMB (Scharlau, Barcelona)

Se utiliza para el aislamiento selectivo y diferencial de bacterias Gram Negativas, con bajos requerimientos nutricionales. Mayormente usado para diferenciar entre bacterias lactosa positivas y negativas, es decir, capaces de fermentar lactosa o no.

Composición del medio (g/L)

- Peptona 10
- Lactosa 10
- Fosfato dipotásico 2
- Eosina 0,4
- Azul de metileno 0,065
- Agar-agar 15

Preparación

Se emplearon 30 g de sustrato, debidamente tarados en una balanza de precisión y añadidos a un matraz de Erlenmeyer de 1000 mL. Además, se adicionaron 1,6 gramos de agar-agar suplementarios, para asegurar la consistencia del medio de cultivo. Tras esto, se completó un volumen de 800 mL con agua destilada.

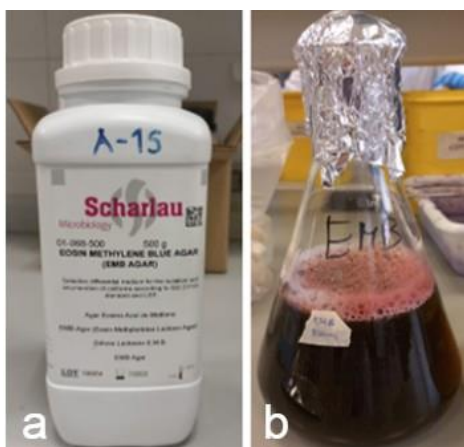


Figura 4.1.3.1. Sustrato en polvo del medio EMB (a) y disolución con el sustrato y agua destilada (b). Fuente: Elaboración propia.

4.1.4. Medio KAA (Scharlau, Barcelona)

Empleado para el aislamiento y detección confirmativa de estreptococos del grupo B de Lancefield.

Composición del medio (g/L)

- Triptona 20
- Extracto de levadura 5
- Cloruro sódico 5

- Citrato disódico 1
- Esculina 1
- Citrato-férrico-amónico 0,50
- Azida sódica 0,15
- Kanamicina 0,02
- Agar-agar 15

Preparación

Se pesaron y emplearon 38,4 g de sustrato, que fueron disueltos en un matraz de 1000 mL de volumen, junto a 800 mL agua destilada y 1,6 g adicionales de agar-agar para aumentar la eficacia de solidificación del medio una vez distribuido por las placas de Petri.

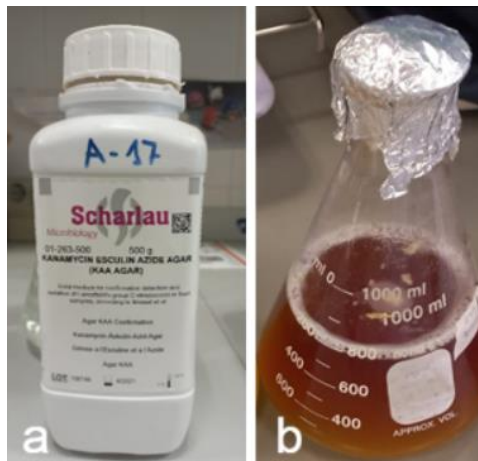


Figura 4.1.4.1. Medio KAA en sustrato sólido (a) y en disolución con agua destilada, ya esterilizada (b). Fuente: Elaboración propia.

4.1.5. Medio YGC (Condalab, Madrid)

Este sustrato se utiliza como medio selectivo para el aislamiento de levaduras, hongos y mohos.

Composición del medio (g/L)

- Dextrosa: 20
- Cloranfenicol: 0,1
- Agar bacteriológico: 12
- Extracto de levadura: 5

Preparación

En este caso, se pesaron aproximadamente 29,68 g de sustrato para un volumen final de 800 mL. Se añadió a un matraz de Erlenmeyer de unos 1000 mL junto con un complemento de 4 g de agar para la correcta formación del medio. Seguidamente, se completó el volumen con agua destilada, previamente medida mediante la utilización de una probeta.



Figura 4.1.5.1. Taraje de sustrato de medio YGC en balanza de precisión (a) junto a su correspondiente recipiente (b). Fuente: Elaboración propia.

4.2. Preparación de placas de cultivo y solución salina

Una vez preparados todos los matraces con el soluto y el agua destilada, fueron sellados parcialmente colocando un poco de algodón y papel de aluminio en la parte superior, para después ser llevado hasta un autoclave a una temperatura de 121°C para su adecuada esterilización y evitar con ello cualquier tipo de contaminantes.



Figura 4.2.1. Matraces Erlenmeyer con las distintas soluciones de medios de cultivo en el autoclave. Fuente: Elaboración propia.

Una vez transcurrido el tiempo necesario para su esterilización, se sacaron los matraces con los medios de cultivo y se colocaron en un baño con agua a 55°C para

atemperarlos. Este paso es necesario para que se evite quemar o fundir el plástico de las placas de Petri a la hora de añadir la solución resultante. A la vez que reducen los medios su temperatura, preparamos una serie de placas de cultivo para su posterior uso.

Cuando fue posible su manipulación, se tomó uno de los matraces y se añadió el medio de cultivo poco a poco a las placas de Petri, siempre agitando con cuidado para que se extienda bien la solución y cubra por completo el fondo de la placa.

Todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad, cerca de un mechero Bunsen. Se actuó de igual forma para los siguientes, siempre esperando el tiempo necesario para que reduzcan los matraces su temperatura, pero sin excedernos a la hora de repartir el medio en las placas para evitar su solidificación.

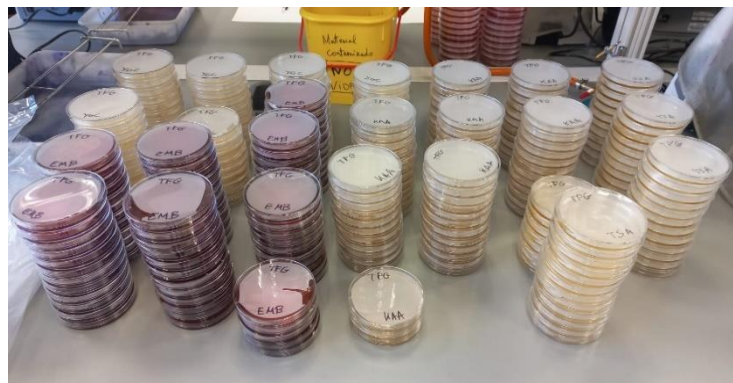


Figura 4.2.2. Placas Petri con los medios de cultivo correspondientes, comenzado el proceso de solidificación.
Fuente: Elaboración propia.

A continuación, se prepararon una serie de botes de solución salina al 0,9 % en un volumen de 200 mL, para usarlos posteriormente como disolvente y obtener una solución madre de cada alimento. Además, se preparó otro recipiente con 100 mL de solución salina para distribuir su contenido en varios tubos Eppendorf, que se emplearán para realizar una serie de diluciones a partir de dicha solución madre de cada alimento y que se utilizará en el estudio.

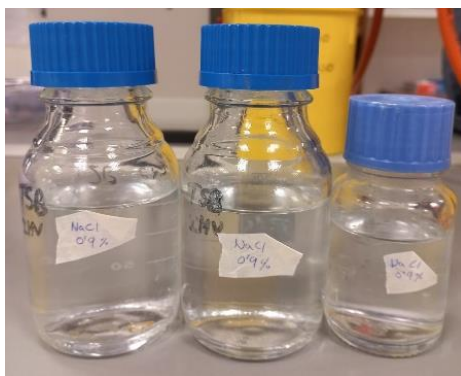


Figura 4.2.3. Recipientes con 200 mL de solución salina (en los dos primeros) y 100 mL (último bote). Fuente: Elaboración propia.

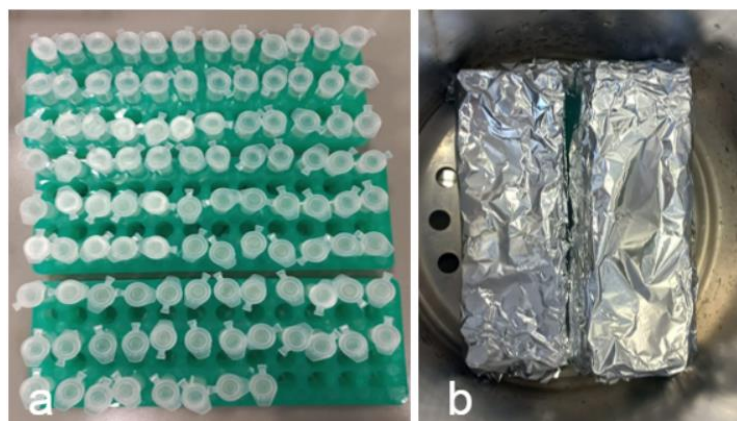


Figura 4.2.4. Tubos Eppendorf con 0,9 mL de solución salina 0,9% dispuestos y ordenados en gradillas (a) y tapados con papel de aluminio en el autoclave (b). Fuente: Elaboración propia.

Para la realización de las soluciones salinas al 0,9 % en 200 mL, se emplearon 1,8 g de cloruro de sodio (NaCl), mientras que para el volumen de 100 mL fueron usados 0,9 g de soluto, pesados mediante el uso de una balanza.



Figura 4.2.5. Balanza utilizada para el taraje del sustrato de cloruro sódico (NaCl). Fuente: Elaboración propia.

4.3. Selección de mariscos, homogeneizado y siembra de muestras por diluciones seriadas

Una vez preparado todo el material necesario para el análisis en las distintas muestras de alimentos, se comenzó con la obtención de las muestras y su homogenización para el estudio. Se seleccionaron una serie de mariscos, alimentos en los que se basa el análisis, por su frecuencia de consumo en el día a día y por su facilidad a la hora de obtenerlos.

Tabla 4.3.1. Mariscos utilizados como muestra para la realización del método experimental, agrupados junto a su nombre científico y grupo animal. Fuente: Elaboración propia.

Tipo de marisco	Nombre científico	Grupo
Almeja	<i>Chamalea gallina</i>	Moluscos
Sepia	<i>Sepia officinalis</i>	Cefalópodos
Chipirón	<i>Loligo vulgaris</i>	Cefalópodos

Los alimentos objeto de estudio fueron almeja, sepia y chipirón. En primer lugar, se comenzó trabajando con los tres productos congelados, los cuales fueron previamente descongelados por la mañana para posibilitar su estudio. Posteriormente, fueron procesadas las tres unidades de producto fresco, que fueron adquiridas el mismo día, asegurando así su calidad y frescura. En ambos casos (mariscos congelados y frescos), el procedimiento a seguir fue el mismo.

Primero, se pesaron 5 gramos de cada tipo de alimento, cantidad suficiente para el análisis.



Figura 4.3.2. Pesaje de la cantidad necesaria de marisco (5 gramos) para distintos alimentos previo al proceso de homogeneizado. Fuente: Elaboración propia.

A continuación, a una bolsa de Stomacher, fueron añadidos, en condiciones de esterilidad cerca del mechero, 45 mL de solución salina, junto con los 5 gramos de alimento. Después, se llevó a un homogeneizador de Stomacher, que se programó a velocidad normal durante unos 30 segundos.

Una vez obtenida la solución, se depositó a un tubo de Falcon, que fue cerrado para evitar contaminación hasta su uso.

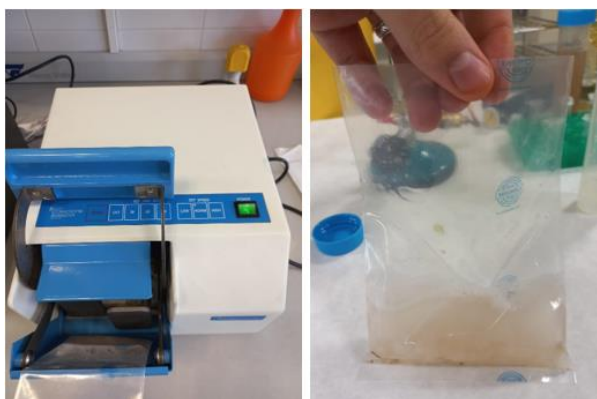


Figura 4.3.3. Stomacher empleado para el homogeneizado de alimentos, tanto frescos como congelados, junto a uno de los resultados. Fuente: Elaboración propia.

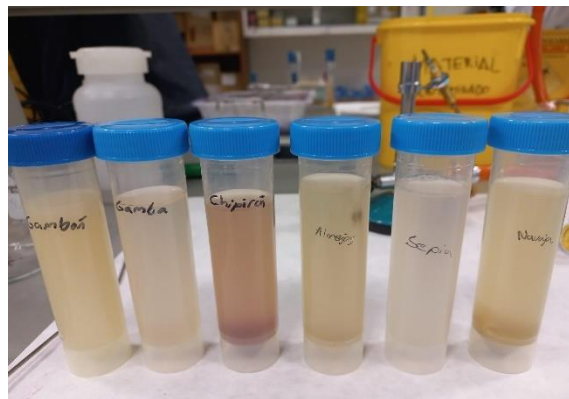


Figura 4.3.4. Tubos Falcon con las distintas soluciones madre de los alimentos, tras ser sometidos a homogeneizado. Fuente: Elaboración propia.

Tras esto, se procedió a la selección y marcaje de las distintas placas de Petri con el medio general y los selectivos, de tal forma que los microorganismos presentes en cada marisco puedan proliferar y crecer al encontrarse con las condiciones idóneas para ello.

Del medio general de cultivo o TSA, preparamos 8 placas, necesarias para poder sembrar la muestra a diferentes diluciones (0, -1, -2 y -3) y con 2 réplicas por cada una. Se rotularon y se prepararon para la siembra. Para el resto de medios, preparamos un total de 6 placas para cada uno (diluciones 0, -1 y -2, por duplicado), ya que al tratarse de medios selectivos y diferenciales la cantidad de colonias bacterianas que crecerán en ellos será menor en comparación con las placas de medio general, que permite el crecimiento de una amplia gama de microorganismos.

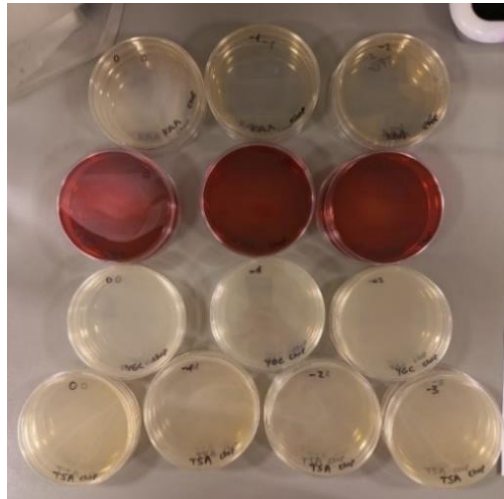


Figura 4.3.5. Placas de Petri con los medios de cultivo en proceso de solidificación. Fuente: Elaboración propia.

Para poder realizar las diluciones, se emplearon tubos Eppendorf con 0,9 mL de solución salina al 0,9% que fueron preparados el día anterior, debidamente rotulados y preparados para cada marisco. En condiciones de esterilidad, se añadieron 100 μ L de solución madre reservada en un tubo Falcon de uno de los mariscos al tubo Eppendorf rotulado como 0. Se mezcló el contenido en un agitador o vórtex y se tomaron 100 μ L del mismo tubo, que fueron transferidos al tubo marcado como -1, continuando así hasta finalizar con el resto de tubos necesarios para completar la dilución seriada descrita anteriormente.

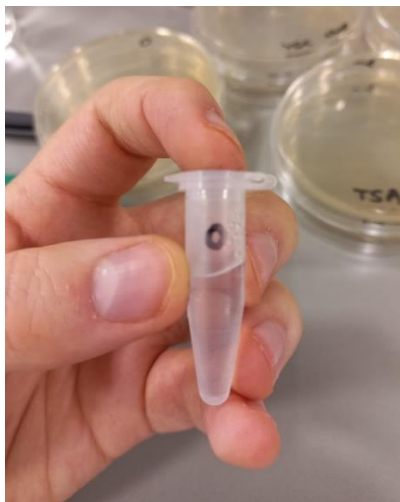


Figura 4.3.6. Tubo Eppendorf con la solución madre del alimento junto con la solución salina. Fuente: Elaboración propia.



Figura 4.3.7. Vórtex de agitación con los distintos tubos Eppendorf con las soluciones seriadas del alimento. Fuente: Elaboración propia

Una vez terminado con las diluciones, se transfieren 100 µL (0,1 mL) de cada tubo a su correspondiente placa de Petri, rotuladas de igual forma que los Eppendorf para facilitar el posterior recuento de microorganismos. La cantidad depositada en cada placa se extiende con la ayuda de un asa de siembra, que ha sido esterilizada con etanol al 96% y con la ayuda de un mechero Bunsen. A continuación, se llevaron las placas a la estufa a 37°C durante 24 horas. Por su parte, los cultivos con medio YGC se cultivaron a 30°C durante al menos 48 horas.

En ambos estudios (productos frescos y congelados) se llevó a cabo una réplica experimental para poder asegurar y confirmar los resultados obtenidos en cada tipo de muestra.

4.4. Recuento y selección de colonias

Según el Boletín Oficial del Estado (BOE, 1991), la vigente normativa en España establece que el límite máximo de crecimiento bacteriano en placa de cultivo de muestras de alimentos frescos o congelados es de 1×10^6 unidades formadoras de colonias bacterianas por gramo (UFC/g) de aerobios mesófilos, por lo que para que un alimento o producto de los empleados en el ensayo sea considerado apto para el consumo humano, no debe de sobrepasar este límite.

Se realizó un conteo del número de colonias bacterianas que han crecido en las distintas placas con medios de cultivo tras 24/48 horas de incubación en estufa, a distintas temperaturas según el tipo de medio, para posteriormente seleccionar una amplia variedad de colonias y llevar a cabo una tinción de Gram, con el objetivo de estudiarlas de manera macroscópica y microscópica.

Para la realización del cálculo de las unidades formadoras de colonias bacterianas según el recuento mostrado para cada tipo de producto alimentario, se basa en la aplicación de la siguiente fórmula (Ávila et al., 2015):

$$UFC/mL = \frac{n^{\circ} \text{ de colonias bacterianas en la placa} * \text{factor de dilución}}{\text{volumen (mL) de solución sembrada}}$$

Para expresar los resultados de los recuentos en UFC/g de alimento y poder comparar el resultado con la normativa de la BOE, se debe tener en cuenta la dilución 0 procede de la solución de 5 gramos de alimento en 45 mL de solución salina, lo cual implica una dilución 1:10, por lo que la operación anterior quedaría de la siguiente forma:

$$UFC/g = \frac{n^{\circ} \text{ de colonias bacterianas en la placa} * \text{factor de dilución}}{\text{volumen (mL) de solución sembrada}} * 10$$

Se seleccionó una media final de las colonias bacterianas encontradas, así como de sus unidades formadoras de colonias, para el análisis comparativo.

4.5. Tinción de Gram y análisis macro y microscópico

Mediante este método se pueden diferenciar bacterias Gram positivas (+) de otras Gram negativas (-), atendiendo a la estructura de sus paredes celulares. Los pasos a seguir en el transcurso de la tinción aparecen recogidos a continuación (Rodríguez et al., 2018).

- 1) Extensión bacteriana sobre portaobjetos de manera uniforme.
- 2) Fijación por calor a través de llama.
- 3) Adición de colorante Cristal Violeta unos 2 minutos (en lugar del minuto preestablecido, para asegurar la adquisición del colorante).
- 4) Lavado con abundante agua.
- 5) Adición de Lugol unos 2 minutos (de nuevo, en lugar de uno).
- 6) Lavado con agua.
- 7) Decoloración con etanol a 96° mediante arrastre, unos 30 segundos.
- 8) Lavado con agua para eliminar los restos de alcohol.
- 9) Adición de colorante Safranina durante 1 minuto (en lugar de los 30 segundos).
- 10) Secado y observación bajo el microscopio.

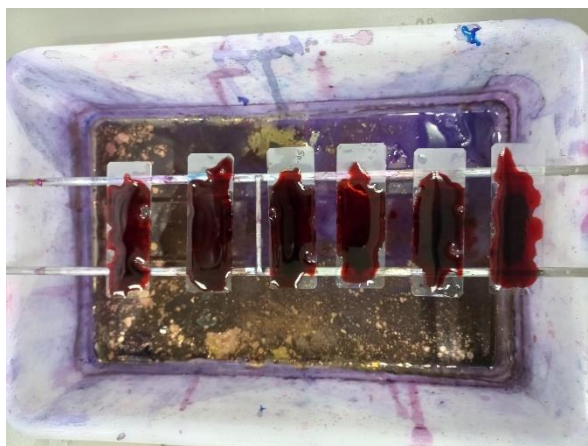


Figura 4.5.1. Colonias bacterianas fijadas en portaobjetos con colorante de Safranina durante la tinción de Gram. Fuente: Elaboración propia.

4.6. Prueba de la catalasa

Por último, se realizó una de las principales pruebas bioquímicas requeridas para caracterizar a las bacterias según la presencia o ausencia de la enzima catalasa, con la que algunas son capaces de, en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), comúnmente conocido como agua oxigenada, llevar a cabo su descomposición en agua y gas oxígeno. Para ello, se toma con un asa de siembra esterilizada una de las colonias bacterianas crecidas en las placas de cultivo y se extiende sobre una gota de peróxido de hidrógeno al 3%, previamente depositada en un portaobjetos, generando una serie de burbujas de oxígeno en la superficie en caso de resultado positivo o su no presencia tras un resultado negativo.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Recuento y cálculo de unidades formadoras de colonias (UFC/g) en mariscos congelados y frescos

5.1.1. Crecimiento en almejas

En general, el mayor crecimiento fue encontrado en muestras de almeja, tanto en productos frescos como congelados, cultivadas en medio TSA. Para el resto de medios de cultivo selectivos no se observó crecimiento, probablemente debido a que

sus componentes no son los adecuados para el óptimo crecimiento de las bacterias obtenidas. Este alimento presentaba un alto número de bacterias en comparación con el resto de productos congelados, pudiendo deberse a varios factores, como que las bacterias posean cierta resistencia frente al proceso de congelado, mediante su conversión a esporas de resistencia en estado latente que volviesen a activarse una vez descongelado el alimento, tal y como diversos estudios han evidenciado (Valls et al., 2006). Además, estas bacterias deben de ser microorganismos mesófilos, al haber sido capaces de crecer a una temperatura comprendida entre 30°C y 37°C.

Por otro lado, el incremento del número de colonias bacterianas encontradas durante el recuento en las placas de medio de cultivo con respecto a los otros dos productos de marisco congelado puede estar ocasionado porque la mayoría de microorganismos se encontraban en fase de crecimiento estacionario, en lugar de en fase exponencial, adquiriendo un mayor grado de resistencia frente a la congelación (Gabor et al., 2001).

Tras el recuento, se obtuvieron para las muestras de almeja congelada, $9,3 \times 10^3$ UFC/g.

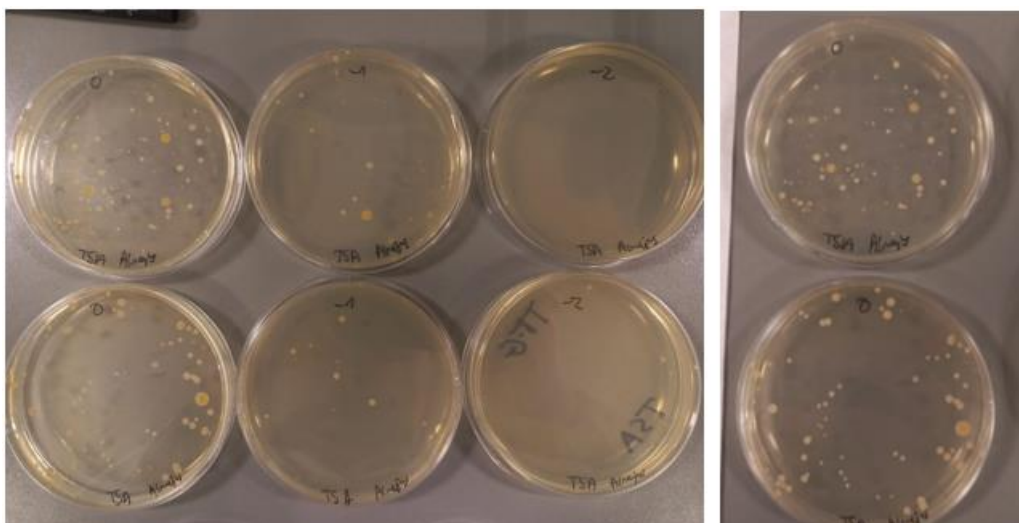


Figura 5.1.1.1. Crecimiento microbiano encontrado tras 24 horas de cultivo en estufa en las placas con medio TSA, para la solución de almejas congeladas. En la imagen de la derecha se aprecia con más detalle las colonias presentes en la placa en la que se llevó a cabo el recuento. Fuente: Elaboración propia.

Por su parte, en el recuento realizado en las placas TSA para el cultivo de almejas frescas, se obtuvo un total de $4,2 \times 10^3$ UFC/g. Como se puede apreciar, el número de colonias halladas en las almejas frescas es menor que en las congeladas.

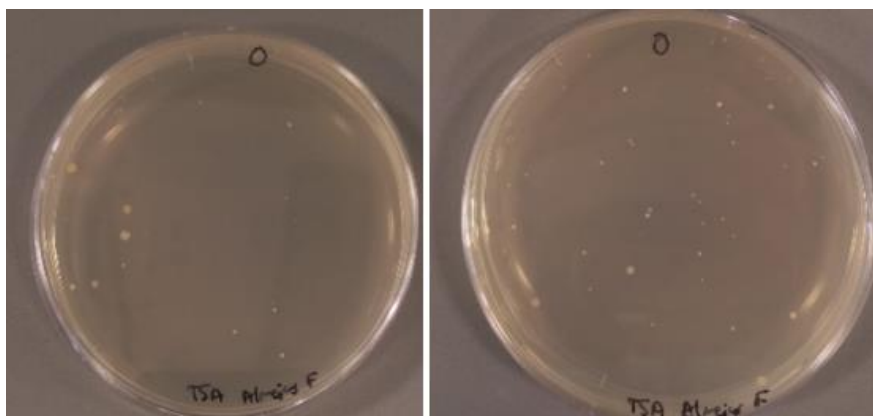


Figura 5.1.1.2. Crecimiento bacteriano hallado en placas con medio TSA para solución de almejas frescas. Fuente: Elaboración propia.

En ambos casos, tanto en las muestras de almejas congeladas ($9,3 \times 10^3$) como en las frescas ($4,2 \times 10^3$) empleadas en el estudio, no se sobrepasa el límite máximo establecido por el BOE de colonias aerobias mesófilas permitidas (1×10^6), por lo que pueden clasificarse estos productos como aptos para el consumo de la población.

5.1.2. Crecimiento en sepia

En el caso de la sepia congelada, también se halló la presencia de colonias bacterianas en el medio de cultivo TSA, siendo el segundo alimento con mayor crecimiento bacteriano, con un total de $7,7 \times 10^3$ UFC/g. Al igual que para el caso anterior, solo se mostró un claro crecimiento en el medio TSA.

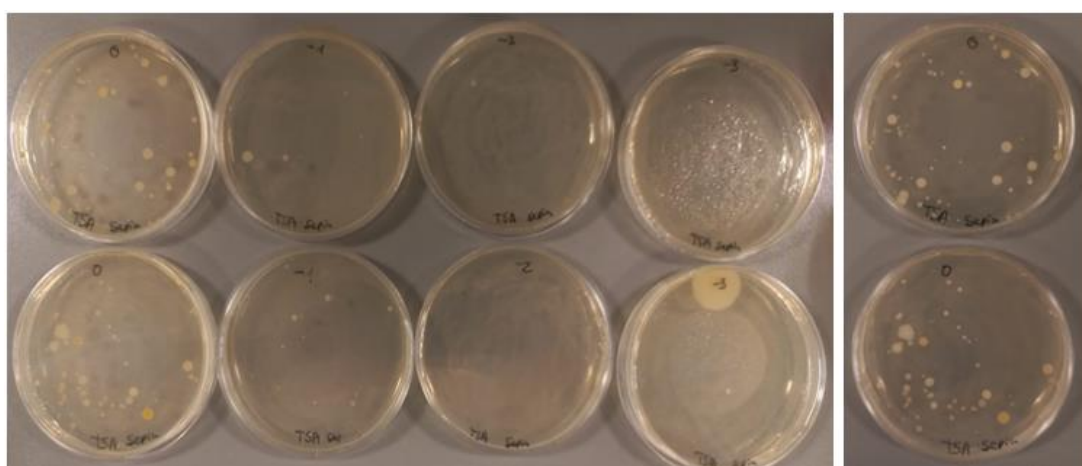


Figura 5.1.2.1. Colonias bacterianas crecidas tras una incubación de 24 horas en medio TSA para la solución de sepia, a distintas diluciones. A la derecha se muestran con más detalle las colonias de la placa en la que se llevó a cabo el recuento. Fuente: Elaboración propia.

El recuento medio en las placas sin diluir de TSA para la muestra de sepia fresca fue de $3,3 \times 10^3$ UFC/g, un valor también disminuido con respecto a su análogo en la muestra congelada, al igual que ha ocurrido con el resto de productos frescos.

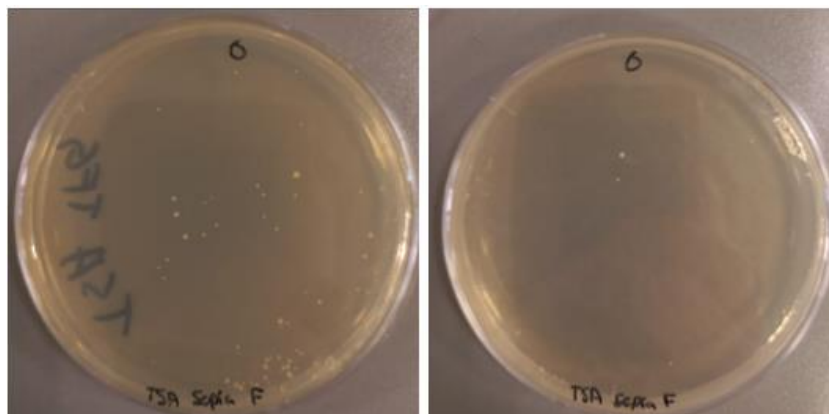


Figura 5.1.2.2. Crecimiento bacteriano en placas con medio TSA para la solución de sepia fresca. Fuente: Elaboración propia.

En este caso, tampoco se supera el límite establecido por los criterios del BOE en 1991 sobre el máximo de colonias bacterianas de aerobios mesófilos totales permitidos en alimentos frescos y congelados (1×10^6), obteniendo para las muestras de sepia congelada y fresca $7,7 \times 10^3$ y $3,3 \times 10^3$ colonias, respectivamente.

5.1.3. Crecimiento en chipirón

En este alimento, a pesar de encontrar presencia de colonias bacterianas en placas con medio TSA en el caso de la muestra congelada, su número no fue demasiado elevado, con un recuento total de $5,3 \times 10^3$ UFC/g.

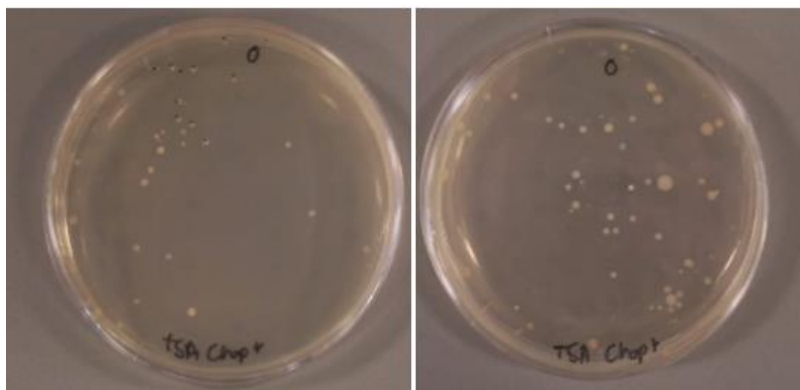


Figura 5.1.3.1. Placas con medio TSA con la presencia de algunas colonias bacterianas, para el chipirón congelado. Fuente: Elaboración propia.

Este bajo número de colonias bacterianas con respecto a los obtenidos para otros alimentos como las almejas o la sepia, puede deberse a que este producto haya sido sometido antes del congelado a diferentes procesos de tratamiento, como la exposición a sustancias acidificantes, alterando con ello la estabilidad de las membranas bacterianas, irradiación lumínica o medios hipertónicos (Speck et al., 1977) que reduzcan su cantidad de agua interna y con ello la contaminación microbiana.

Otras investigaciones avalan que es muy importante el tipo de congelación empleado en el producto durante su conservación, ya que mediante un proceso de congelación rápida se logra reducir de forma poco eficiente la carga microbiana de los alimentos en comparación con la congelación lenta, donde se obtienen mejores resultados (James et al., 1983) al formar cristales de hielo de mayor tamaño dentro y fuera de las bacterias que alteren su estabilidad estructural. Este último tipo de congelación podría explicar la baja carga bacteriana presente en dicho alimento.

En cuanto al producto fresco, tan solo aparecieron un total de $1,8 \times 10^3$ UFC/g.

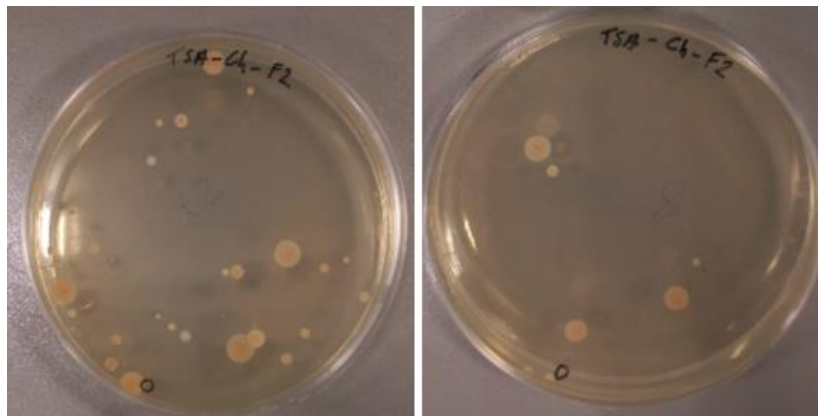


Figura 5.1.3.2. Crecimiento bacteriano en placas con medio TSA en muestras de chipirón fresco. Fuente: Elaboración propia.

Según la normativa publicada por el BOE, estos alimentos se encuentran dentro de los valores máximos de aerobios mesófilos establecidos como criterio para ser clasificados como aptos para el consumo humano, sin llegar a superar las 1×10^6 colonias bacterianas indicadas anteriormente.

5.2. Resumen del recuento de colonias y UFC/g en mariscos congelados y frescos

La presencia de colonias bacterianas en los mariscos frescos con respecto a los congelados fue menor a pesar de que, como muestran los resultados de otras investigaciones, se esperaba lo contrario, ya que mediante el proceso de congelación se logran mantener en gran medida la esterilidad de los alimentos y prevenirlos de la contaminación por microorganismos (Kong et al., 2016).

Esto puede deberse a que, según otros análisis microbianos realizados en productos de origen acuático, exista un mayor grado de sensibilidad ante la infección bacteriana de los alimentos durante su descongelado (Nian et al., 2022), pudiendo haber aumentado la carga microbiana durante esta fase experimental. Por otro lado, este resultado también puede ser consecuencia de que los productos adquiridos no sean realmente frescos, a pesar de distribuirse y venderse como tales, habiendo sido sometidos a procesos de almacenaje en congeladores u otros tratamientos, siendo posteriormente descongelados y expendidos en tiendas a nivel nacional.

Además, es posible que este bajo número de colonias bacterianas en los productos frescos a que los mariscos adquiridos provengan de piscifactorías y hayan sido tratados con algún tipo de antimicrobiano o sustancia química que les proporcione cierta resistencia frente a la colonización bacteriana (Serwecińska, 2020). Esto es común que ocurra en grandes productoras de productos marinos, donde se combinan algunos antibióticos profilácticos con el alimento de los peces y mariscos para favorecer su protección frente a patógenos (Rasul et al., 2017). No se debe olvidar que los medios acuáticos se encuentran muy adaptados para el crecimiento microbiano, gracias a sus óptimas características físico-químicas, por lo que, a pesar de haber sufrido un proceso de congelación, algunas bacterias pueden prevalecer y no eliminarse (Valls et al., 2006).

Tabla 5.2.1. Resumen de los resultados obtenidos para el recuento de colonias bacterianas en los distintos tipos de mariscos, por medio de cultivo. Fuente: Elaboración propia.

Muestra de marisco cultivada	Recuento por medio de cultivo (UFC/g)			
	TSA	EMB	KAA	YGC
Chipirón congelado	5,3x10 ³	-	-	-
Chipirón fresco	1,8x10 ³	-	-	-
Sepia congelada	7,7x10 ³	-	-	-
Sepia fresca	3,3x10 ³	-	-	-
Almeja congelada	9,3x10 ³	-	-	-
Almeja fresca	4,2x10 ³	-	-	-

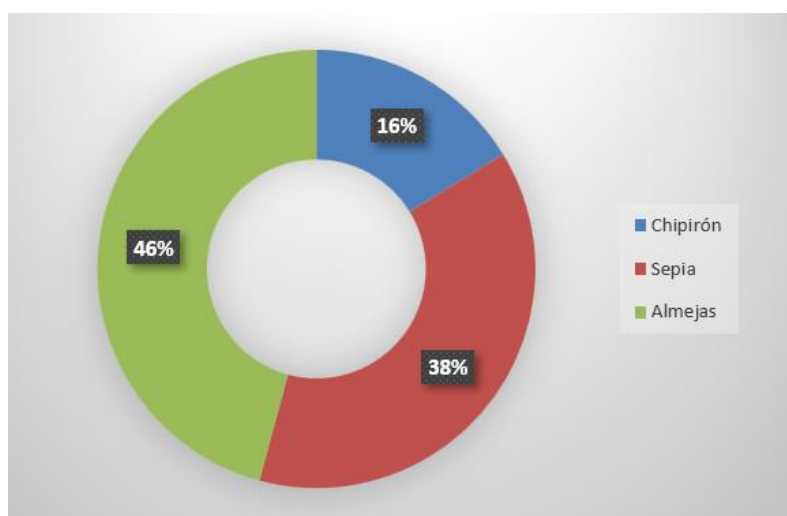


Figura 5.2.2. Gráfico de sectores en anillo donde aparecen representadas mediante porcentajes las UFC/g calculadas para marisco congelado. Fuente: Elaboración propia.

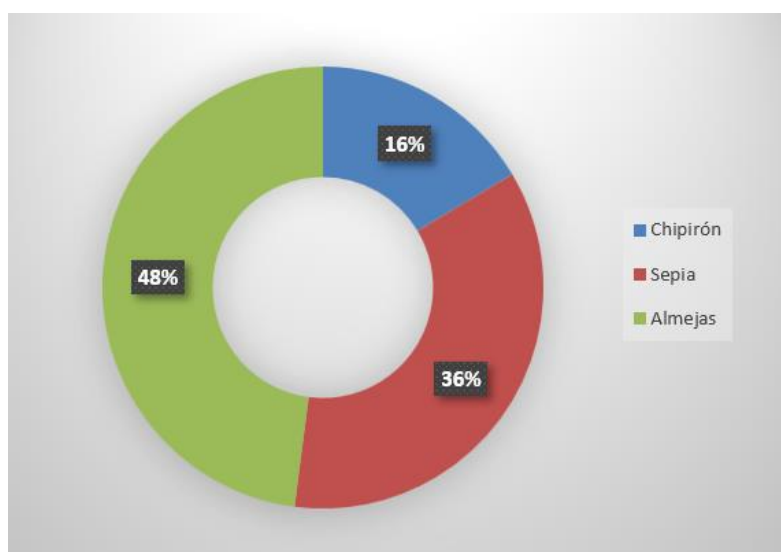


Figura 5.2.3. Gráfico de sectores en anillo donde aparecen representadas mediante porcentajes las UFC/g calculadas para cada tipo de marisco fresco. Fuente: Elaboración propia.

Se encuentra un resultado similar con respecto a la la proporcionalidad de las colonias bacterianas halladas en productos frescos y congelados debido a que, a pesar de que aparece un mayor número de microorganismos en los productos congelados, la tendencia de crecimiento microbiano siempre es la misma, apareciendo en menor medida en el chipirón y en mayor cantidad en las almejas empleadas.

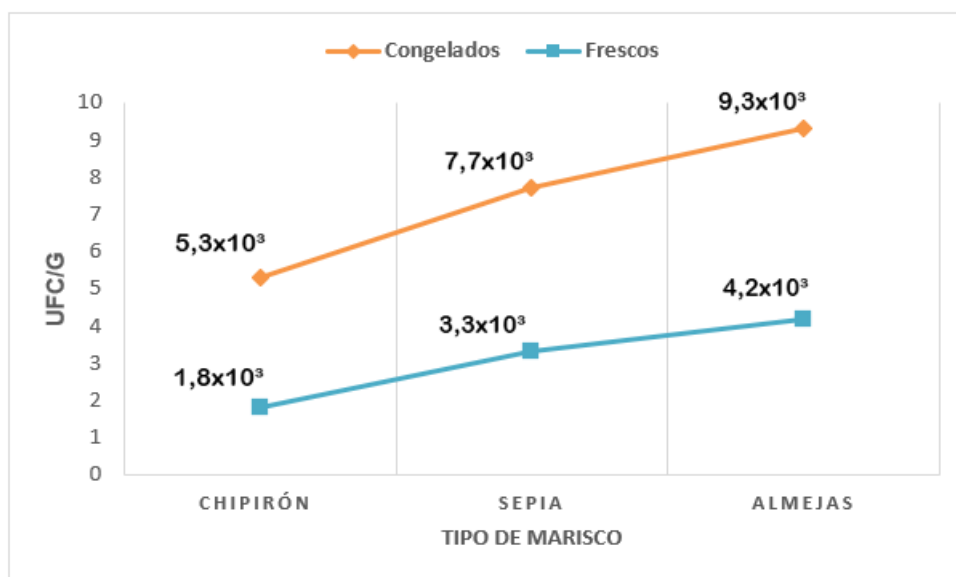


Figura 5.2.4. Líneas de tendencia donde aparece comparado el número de UFC/g entre muestras de marisco congelado y fresco. Fuente: Elaboración propia.

5.3. Evaluación macro y microscópica de colonias bacterianas en mariscos congelados

En cuanto a la observación macroscópica de las colonias bacterianas crecidas en medio general TSA (Figura 5.3.2.), se llevó a cabo una clasificación de algunas de ellas atendiendo a diferentes características, como el aspecto general, tonalidad y tamaño medio estimado, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 5.3.1. Análisis y evaluación macroscópica de distintas colonias bacterianas elegidas por su diversidad morfológica en mariscos congelados. Fuente: Elaboración propia.

Colonia bacteriana seleccionada	Análisis macroscópico		
	Color	Aspecto	Tamaño
Sp.T.1	Anaranjado	Discoidal	Grande
Sp.T.2	Amarillo	Puntiforme	Pequeño
Ch.T.3	Amarillo pálido	Pulvinada	Pequeño
Al.T.4	Rojizo	Con relieve	Pequeño
Al.T.5	Amarillo intenso	Elevado	Pequeño
Al.T.6	Anaranjado	Ameboide	Grande

* Las abreviaturas Sp., Ch. y Al. (Sepia, Chipirón y Almejas, respectivamente) hacen referencia al tipo de alimento del que proviene cada colonia bajo selección propia. Por su parte, la inicial (T) corresponde con el medio de cultivo del que proviene cada conjunto bacteriano, en este caso TSA, mientras que los números indican el orden de colonias elegido *

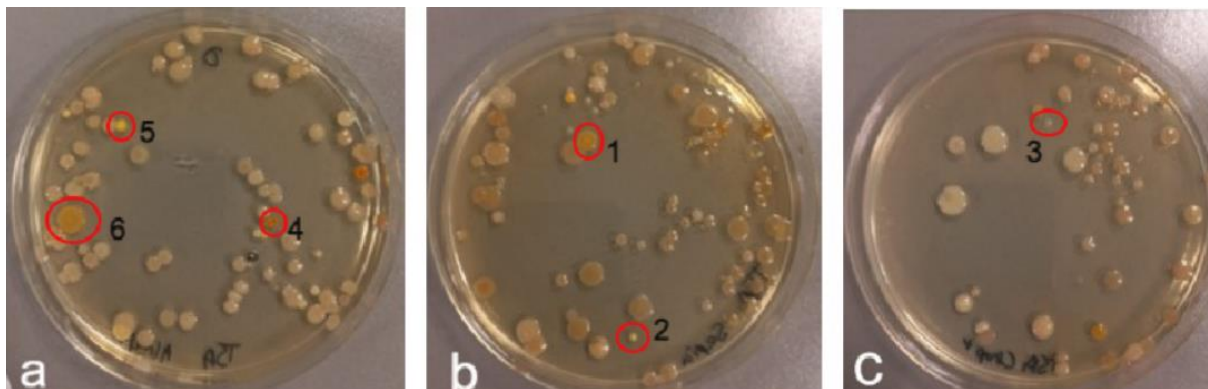


Figura 5.3.2. Placas de Petri con medio TSA con colonias bacterianas en muestras de almejas (a), sepia (b) y chipirón (c), numeradas y empleadas para el análisis de mariscos congelados. Fuente: Elaboración propia.

Por otro lado, una vez realizada la tinción de Gram para el análisis microscópico bajo un objetivo de 100X aumentos, se observó la morfología y aspecto de distintas bacterias con bastante exactitud, obteniendo como resultado una amplia variedad de morfologías bacterianas, que aparecen recogidas en las imágenes que se ven a continuación.

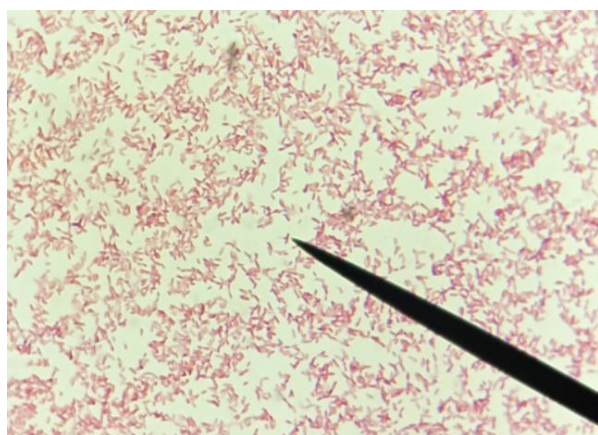


Figura 5.3.3. Observación bajo microscopio de bacilos Gram Negativas (-), a partir de la colonia bacteriana denominada como Al.T.4. Fuente: Elaboración propia.

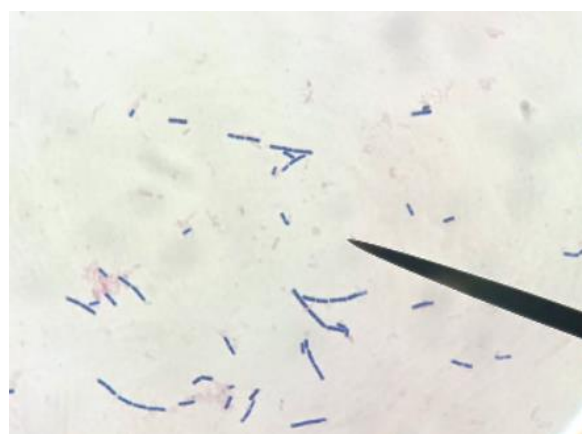


Figura 5.3.4. Bacilos Gram positivos (+) observados bajo el microscopio en la muestra de colonia Sp.T.1. Fuente: Elaboración propia.

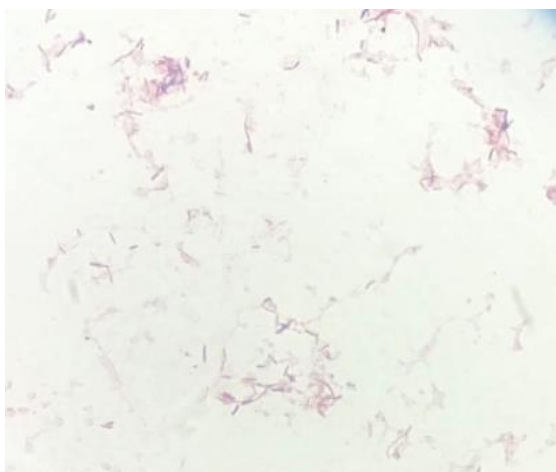


Figura 5.3.5. Bacilos Gram negativos (-) bajo el microscopio en la colonia bacteriana denominada como Ch.T.3. Fuente: Elaboración propia.

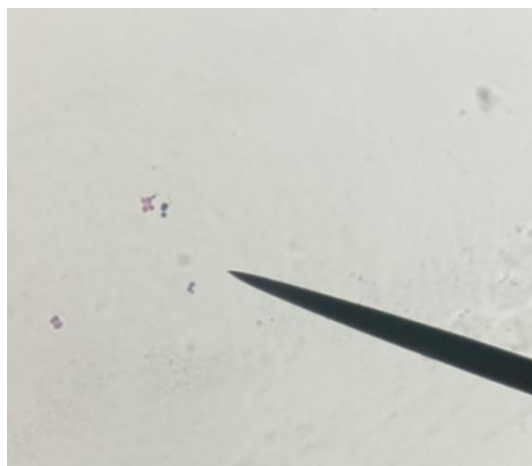


Figura 5.3.6. Cocos Gram positivos (+) agrupados en conjuntos cuádruples de bacterias, en muestra de colonia Al.T.6. Fuente: Elaboración propia.



Figura 5.3.7. Cocos Gram positivos (+) bajo el microscopio en la colonia bacteriana denominada como Sp.T.2. Fuente: Elaboración propia.

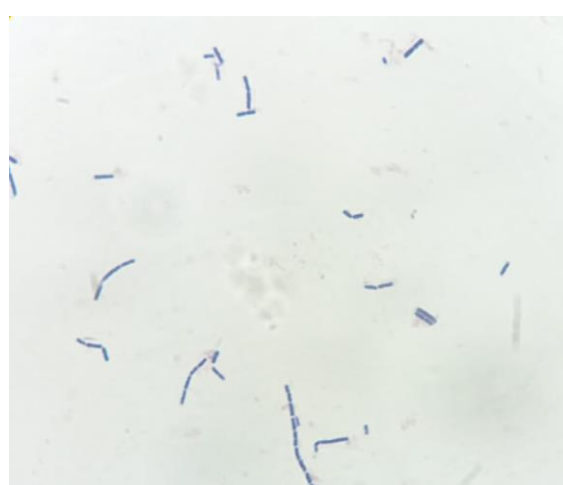


Figura 5.3.8. Bacilos Gram positivos (+) bajo el microscopio en la colonia bacteriana denominada como Al.T.5. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 5.3.9. Análisis microscópico de los resultados obtenidos tras la observación y tinción de Gram realizada sobre las colonias bacterianas elegidas en productos congelados. Fuente: Elaboración propia.

Colonia bacteriana seleccionada	Análisis microscópico	
	Morfología	Clasificación de Gram
Sp.T.1	Bacilos	Gram positivos (+)
Sp.T.2	Cocos	Gram positivos (+)
Ch.T.3	Bacilos	Gram negativos (-)
Al.T.4	Bacilos	Gram negativos (-)
Al.T.5	Bacilos	Gram positivos (+)
Al.T.6	Cocos	Gram positivos (+)

Como se observa en la tabla anterior, hay una mayor presencia de microorganismos o bacterias del grupo de las Gram positivas (+) en comparación con las Gram negativas (-) en productos de marisco congelado tal y como otros estudios han demostrado (Archer, 2004; Speck et al., 1977), siendo esto consecuencia de la diferencia estructural de la pared bacteriana y de su mayor o menor contenido en peptidoglicano, que las hace menos resistentes a la formación de cristales de hielo que destruyan o modifiquen su estructura (Chang et al., 2003).

5.4. Evaluación macro y microscópica de colonias bacterianas en mariscos frescos

Los resultados a nivel macroscópico de las colonias bacterianas obtenidas en el caso de los alimentos frescos (Figura 5.4.2.) fueron los siguientes:

Tabla 5.4.1. Análisis y evaluación macroscópica de distintas colonias bacterianas elegidas por su diversidad morfológica en mariscos frescos. Fuente: Elaboración propia.

Colonia bacteriana seleccionada	Análisis macroscópico		
	Color	Aspecto	Tamaño
Sp.T.F.1	Blanquecino	Homogéneo	Grande
Sp.T.F.2	Naranja	Circular	Grande
Sp.T.F.3	Naranja pálido	Elevado	Mediano
Sp.T.F.4	Crema	Circular	Mediano
Al.T.F.5	Blanquecino con centro anaranjado	Mucoide	Grande
Al.T.F.6	Rojo pálido	Circular	Mediano

* Las abreviaturas *Sp.* y *Al.* (*Sepia* y *Almejas*, respectivamente) hacen referencia al tipo de alimento. Por su parte, la inicial (*T*) corresponde con el medio de cultivo, en este caso *TSA*, mientras que los números indican el orden de colonias elegido *

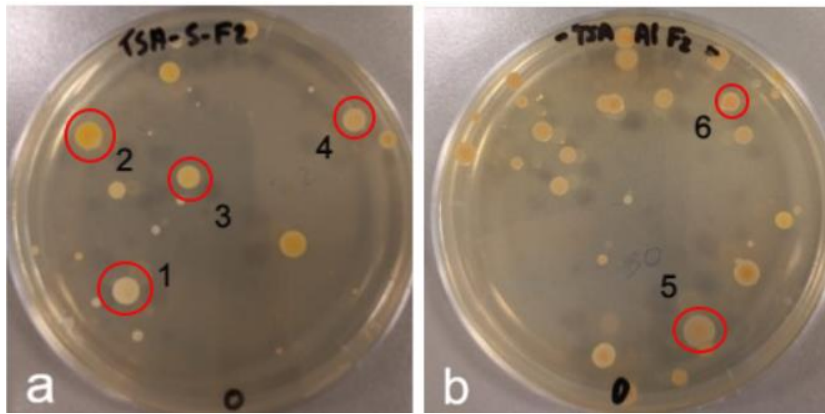


Figura 5.4.2. Placas de cultivo en medio TSA con las colonias bacterianas numeradas y utilizadas para el estudio en sepia (a) y almejas (b) frescas. Fuente: Elaboración propia.

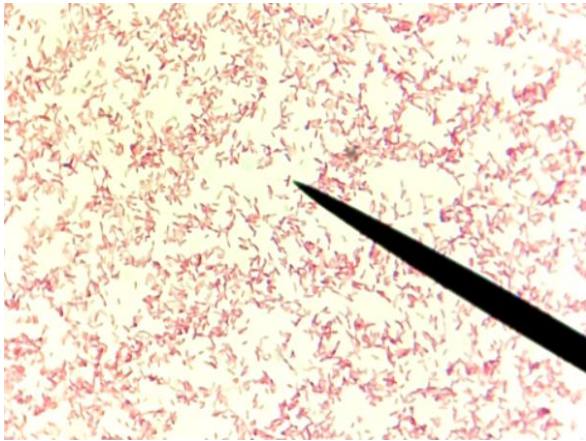


Figura 5.4.3. Bacilos Gram negativos (-) hallados en la muestra de colonia bacteriana Al.T.F.5. Fuente: Elaboración propia.

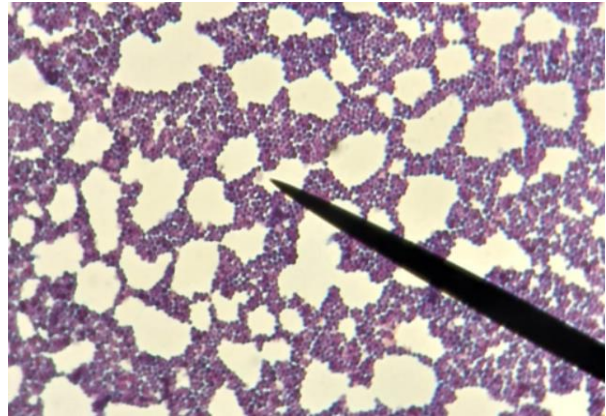


Figura 5.4.4. Cocos Gram positivos (+) en la colonia bacteriana denominada como Sp.T.F.1. Fuente: Elaboración propia.

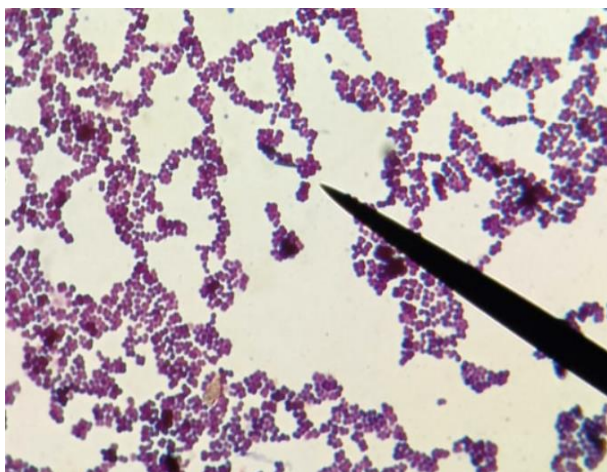


Figura 5.4.5. Cocos Gram positivos (+) agrupados en grupos de cuatro la colonia bacteriana Sp.T.F.3. Fuente: Elaboración propia.

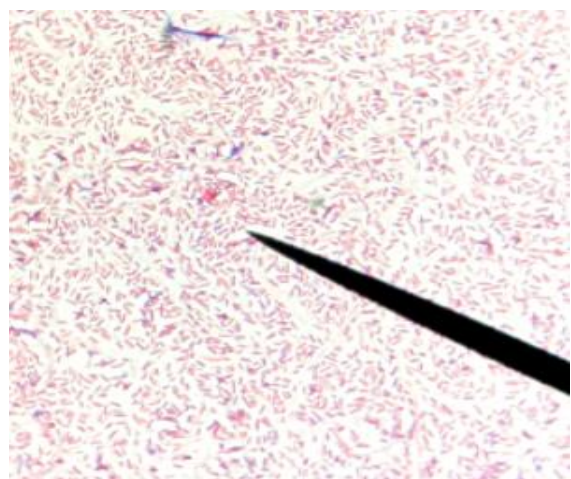


Figura 5.4.6. Bacilos Gram negativos (-) hallados en la muestra de colonia bacteriana Al.T.F.2. Fuente: Elaboración propia.

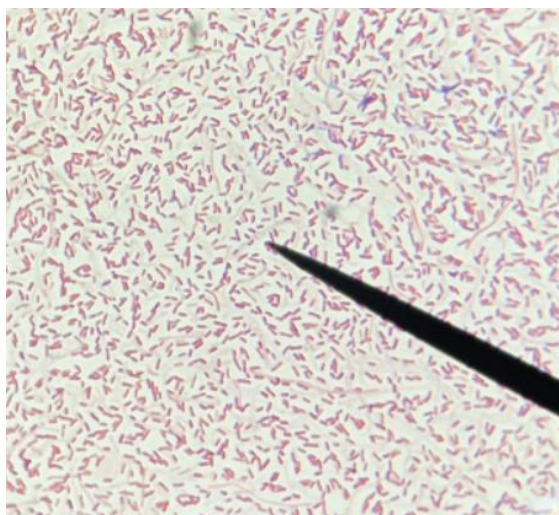


Figura 5.4.7. Bacilos Gram negativos (-) agrupados en grupos de cuatro la colonia bacteriana Sp.T.F.4. Fuente: Elaboración propia.

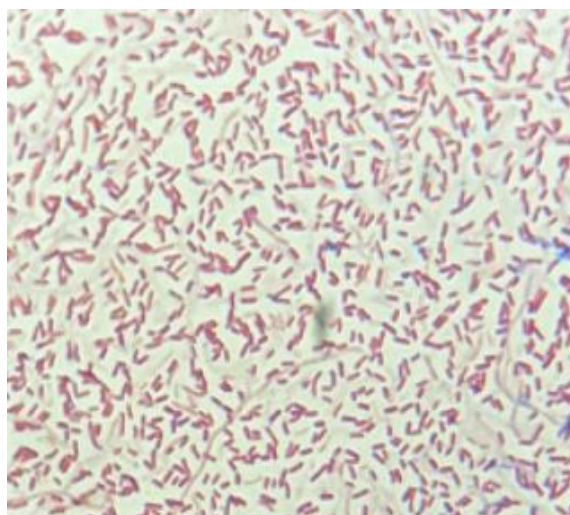


Figura 5.4.8. Bacilos Gram negativos (-) agrupados en grupos de cuatro la colonia bacteriana Al.T.F.6. Fuente: Elaboración propia.

En relación a la observación microscópica llevada a cabo tras la correspondiente tinción de Gram, se vuelven a apreciar variables morfologías, desde cocos hasta bacilos, tanto Gram positivos (+) y Gram negativos (-).

Tabla 5.4.5. Análisis microscópico de los resultados obtenidos tras la observación y tinción de Gram realizada sobre las colonias bacterianas en mariscos frescos. Fuente: Elaboración propia.

Colonia bacteriana seleccionada	Análisis microscópico	
	Morfología	Clasificación de Gram
Sp.T.F.1	Cocos	Gram positivos (+)
Sp.T.F.2	Bacilos	Gram negativos (-)
Sp.T.F.3	Cocos	Gram positivos (+)
Sp.T.F.4	Bacilos	Gram negativos (-)
Al.T.F.5	Bacilos	Gram negativos (-)
Al.T.F.6	Bacilos	Gram negativos (-)

Según investigaciones llevadas a cabo con carne de pescado procedente de la carpa común, las bacterias más predominantes en los procesos de descomposición del alimento fresco cuando se encuentra refrigerado a 5°C son Gram negativas (Sterniša et al., 2019), como aparentemente se obtiene en los resultados de tinción de Gram de este estudio, donde de las 6 colonias bacterianas aisladas de muestras de marisco fresco, 4 corresponde con este grupo de microorganismos.

5.5. Prueba de la catalasa

El resultado para los 6 tipos de colonias elegidas de los alimentos congelados por su distinto aspecto fue la obtención de cuatro grupos bacterianos con test de catalasa positivo (+) y otras dos colonias clasificadas como catalasa negativa (-). Por otro lado, en cuanto a los mariscos frescos, el resultado fue más dispar, ya que todas las colonias bacterianas seleccionadas se clasificaron como catalasas positivas (+).

Tabla 5.5.1. Tabla donde aparecen recogidos los resultados para el test de la catalasa en mariscos congelados y frescos, según el tipo de colonia bacteriana seleccionada para el experimento. Fuente: Elaboración propia.

Mariscos congelados		Mariscos frescos	
Colonias bacterianas	Test de la catalasa	Colonias bacterianas	Test de la catalasa
Sp.T.1	Catalasa (-)	Sp.T.F.1	Catalasa (+)
Sp.T.2	Catalasa (+)	Sp.T.F.2	Catalasa (+)
Ch.T.3	Catalasa (+)	Sp.T.F.3	Catalasa (+)
Al.T.4	Catalasa (+)	Sp.T.F.4	Catalasa (+)
Al.T.5	Catalasa (-)	Al.T.F.5	Catalasa (+)
Al.T.6	Catalasa (+)	Al.T.F.6	Catalasa (+)

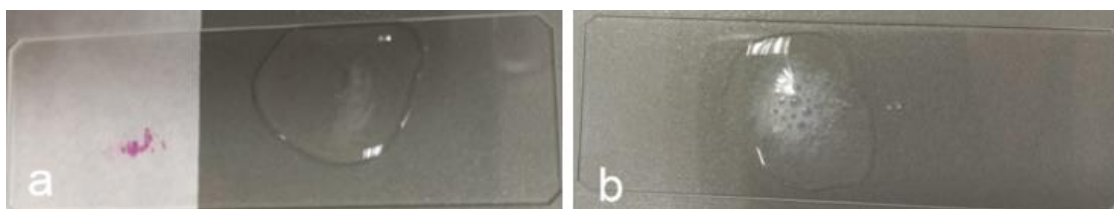


Figura 5.5.2. Test de la catalasa, donde se observa un resultado negativo sin aparición de burbujas de oxígeno (a) y un resultado positivo, donde ha tenido lugar la reacción (b). Fuente: Elaboración propia.

Se obtuvo, por tanto, una mayor proporción de colonias bacterianas, tanto en productos frescos como congelados, con predominancia enzimática de catalasa positiva (+), posiblemente debido a que requieran la enzima catalasa para hacer frente al estrés oxidativo del ambiente donde se encontrase el marisco (Díaz, 2006).

5.6. Caracterización de las colonias bacterianas seleccionadas

Una vez obtenidos estos resultados, podemos realizar una caracterización de las diferentes colonias bacterianas tomadas para el estudio.

Tabla 5.6.1. Resumen de los resultados obtenidos en las distintas pruebas para la identificación de microorganismos presentes en muestras de marisco congelado.

Mariscos congelados				
Colonias bacterianas	Morfología	Medio de aislamiento	Tinción de Gram	Test de la Catalasa
Sp.T.1	Bacilos	TSA	Gram (+)	Catalasa (-)
Sp.T.2	Cocos	TSA	Gram (+)	Catalasa (+)
Ch.T.3	Bacilos	TSA	Gram (-)	Catalasa (+)
Al.T.4	Bacilos	TSA	Gram (-)	Catalasa (+)
Al.T.5	Bacilos	TSA	Gram (+)	Catalasa (-)
Al.T.6	Cocos	TSA	Gram (+)	Catalasa (+)

En el caso de las colonias denominadas como Sp.T.1 y Al.T.5, podrían corresponder con una especie dentro del género *Lactobacillus spp.*, ya que este agrupa especies que generalmente se corresponde con un resultado negativo en la prueba de la catalasa, tal y como verifican otras investigaciones, donde los resultados de las pruebas para la identificación de la bacteria son similares a los obtenidos en este estudio, donde esta bacteria puede ser incluida dentro la dieta de estos animales en piscifactorías como probióticos (Gupta et al., 2019).

Además, las cepas Ch.T.3 y Al.T.4 pueden tratarse de *Pseudomonas spp.*, al tener este género la capacidad de crecer en condiciones de baja temperatura y procesos de congelación (Centeno et al., 2005), tal y como han demostrado algunas investigaciones, donde también se han analizado las características y propiedades de esta bacteria aislada y corresponden con las obtenidas en este estudio. Por otro lado, las cepas Al.T.2 y Al.T.6, pueden encontrarse dentro del género bacteriano *Micrococcus spp.*, debido a que sus características corresponden con las resultantes tras el proceso experimental, con una morfología muy característica de agrupaciones en tétradas que también aparece en otros estudios (Saleh et al., 2021).

Tabla 5.6.2. Resumen de los resultados obtenidos en las distintas pruebas para la identificación de microorganismos presentes en muestras de marisco congelado.

Mariscos frescos				
Colonias bacterianas	Morfología	Medio de aislamiento	Tinción de Gram	Test de la Catalasa
Sp.T.F.1	Cocos	TSA	Gram (+)	Catalasa (+)
Sp.T.F.2	Bacilos	TSA	Gram (-)	Catalasa (+)
Sp.T.F.3	Cocos	TSA	Gram (+)	Catalasa (+)
Sp.T.F.4	Bacilos	TSA	Gram (-)	Catalasa (+)
Al.T.F.5	Bacilos	TSA	Gram (-)	Catalasa (+)
Al.T.F.6	Bacilos	TSA	Gram (-)	Catalasa (+)

La cepa denominada como Sp.T.F.1 posee las características fenotípicas y bioquímicas similares a *Staphylococcus aureus*, como se ha comprobado anteriormente por su morfología de cocos agrupados en racimos (Romero et al., 2011). Además, las colonias Sp.T.F.2, Sp.T.F.4, Al.T.F.5 y Al.T.F.6 podrían encontrarse dentro del género *Pseudomonas spp.* (Centeno et al., 2005), aunque también pueden estar incluidas en los géneros *Aeromonas spp.* o *Vibrio spp.* (Suárez et al., 2011), al poseer las mismas propiedades ya estudiadas.

6. CONCLUSIONES

1. Únicamente se observó crecimiento bacteriano en el medio de cultivo general TSA. En el resto de medios de cultivo selectivo no hubo crecimiento en ningún alimento.
2. No se supera el límite máximo de crecimiento de aerobios mesófilos establecido por el BOE en productos de origen acuático, siendo considerados aptos para el consumo humano.
3. Se observa un mayor número de colonias bacterianas en los alimentos congelados que en los frescos, posiblemente debido a los tratamientos antimicrobianos empleados en piscifactorías o a la contaminación durante el descongelado.

4. La congelación de alimentos contribuye a reducir la presencia de bacterias Gram negativas, lo cual se puede deber a su menor resistencia frente a la formación de cristales de hielo que destruyan o modifiquen la estructura de su pared bacteriana.
5. Existe una amplia variedad de microorganismos presentes en las muestras de marisco, con características morfológicas y bioquímicas variadas.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Andreu, M. & Saavedra Coutado, C. 2022. El rol de los fermentos en la sostenibilidad alimentaria. *Nutrición Hospitalaria*, 39(3): 56-59.
- Archer, D. L. 2004. Freezing: an underutilized food safety technology? *International Journal of Food Microbiology*, 90(2): 127-138.
- Ávila, L., Naranjo, J. & Higueta, J. 2015. Viabilidad de levaduras y bacterias conservadas por liofilización: efecto de agentes lioprotectores. *Revista Vector*, 10: 7-13.
- Bondi, M., Messi, P., Halami, P. M., Papadopoulou, C., de Niederhausen, S. 2014. Emerging Microbial Concerns in Food Safety and New Control Measures. *BioMed Research International*, 2014.
- Buorgeois, M., Zuca, J. & Mescle, J. 2004. Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria. En: *Microbiología Alimentaria*. Acribia S.A., Zaragoza, España. pp. 263-277.
- Camacho Silvas L. A. 2023. Resistencia bacteriana, una crisis actual. *Revista Española de Salud Pública*, 97: e1-e10.
- Campos Díaz, J., Rodríguez Álvarez, C., Sierra López, A. & Arias Rodríguez, A. 2003. Estudio microbiológico de las comidas servidas en los comedores escolares de la isla de Tenerife. *Revista Española de Salud Pública*, 77(6): 749-760.
- Castillo Escandón, V., Fernández Michel, S. G., Cueto Wong, M. C. & Ramos Clamont Montfort, G. 2019. Criterios y estrategias tecnológicas para la incorporación y supervivencia de probióticos en frutas, cereales y sus derivados. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 22: 173.

- Chang, V. P., Mills, E. W. & Cutter, C. N. 2003. Comparison of Recovery Methods for Freeze-Injured *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Campylobacter coli* in Cell Suspensions and Associated with Pork Surfaces. *Journal of Food Protection*, 66(5): 798-803.
- Choi, M. J., Abduzukhurov, T., Park, D. H., Kim, E. J., & Hong, G. P. 2018. Effects of Deep Freezing Temperature for Long-term Storage on Quality Characteristics and Freshness of Lamb Meat. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 38(5): 959-969.
- Ciani, M., Capece, A., Comitini, F., Canonico, L., Siesto, G. & Romano, P. 2016. Yeast Interactions in Inoculated Wine Fermentation. *Frontiers in microbiology*, 7.
- Dal Bello, M., Lee, H., Goyal, A. & Gore, J. 2021. Resource-diversity relationships in bacterial communities reflect the network structure of microbial metabolism. *Nature Ecology & Evolution*, 5(10): 1424-1434.
- Da Silva, M., Rogério Matté, G., Germano, P. M. & Matté, M. H. 2010. Occurrence of pathogenic microorganisms in fish sold in São Paulo, Brazil. *Journal of Food Safety*, 30(1): 94-110.
- Dávalos, S., Zamora, D., Natividad, B., Tercero, J., Vázquez, C. & Quiñones, E. 2005. Alimentos marinos: tipificación y proceso de almacenamiento. *Revista Digital Universitaria*, 6(9): 1-14.
- Díaz Rosales, P. 2006. Papel de las actividades superóxido dismutasa y catalasa en la virulencia de *Photobacterium damsela* subsp. piscicida. Estrategias para la estimulación del estallido respiratorio en fagocitos de lenguados cultivados. Universidad de Málaga.
- Donlan, R. M. & Costerton, J. W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2): 167-193.
- Duarte, A. M., Silva, F., Pinto, F. R., Barroso, S. & Gil, M. M. 2020. Quality Assessment of Chilled and Frozen Fish-Mini Review. *Foods*, 9(12), 1739.
- FAO, 1996. Plan de acción de la Cumbre mundial de la alimentación. https://www.iri.edu.ar/publicaciones_iri/anuario/A97/A97-DAMB4.htm
- Fernández, S., Marcía, J., Bu, J., Baca, Y., Chávez, V., Montoya, H., Varela, I., Ruiz, J., Lagos, S. & Ore, F. 2021. Enfermedades transmitidas por Alimentos

(Etas); Una Alerta para el Consumidor. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 5(2): 2284-2298.

- Gabor, P. & Reichart, O. 2001. The effect of growth phase, cryoprotectants and freezing rates on the survival of selected micro-organism during freezing and thawing. *Acta alimentaria*, 30(1): 89-97.
- García, C. A., Arrázola, G. S. & Durango, A. M. 2010. Producción de ácido láctico por vía biotecnológica. *Temas Agrarios*, 15(2): 9-26.
- Garcinuño Martínez, R. M. 2013. Contaminación de los alimentos durante los procesos de origen y almacenamiento. *Aldaba*, 36: 51-64.
- Garvey, M. 2019. Food pollution: a comprehensive review of chemical and biological sources of food contamination and impact on human health. *Nutrire*, 44(1).
- González Flores, T. & Rojas Herrera, R. A. 2005. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud pública de México*, 47(5): 338-390.
- González Rivas, F., Fontecha Umaña F. & Rodríguez Jerez J. J. 2016. Biofilms: contaminación cruzada en industria alimentaria. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, 28(1): 215-233.
- Gupta, S., Fečkaninová, A., Lokesh, J., Koščová, J., Sørensen, M., Fernandes, J., & Kiron, V. 2019. Corrigendum: Lactobacillus Dominate in the Intestine of Atlantic Salmon Fed Dietary Probiotics. *Frontiers in microbiology*, 10.
- Gutiérrez Fernández, D., Fernández Llamas, L., Rodríguez González, A. & García Suárez, P. 2020. Bacteriófagos y endolisinas en la industria alimentaria. *Arbor*, 196(795): 544.
- Herrera Arias, F. C. & Santos Buelga, J. A. 2005. Prevalencia de Salmonella spp. En pescado fresco expandido en Pamplona (Norte de Santander). *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 3(2): 34-42.
- Holzapfel, W. H., Geisen, R. & Schillinger, U. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*, 24: 343-362.
- IAEA, 2017. Radioactividad natural en los alimentos: expertos discuten la armonización de las normas internacionales. <https://www.iaea.org/es/newscenter/news/radiactividad-natural-en-los-alimentos-expertos-discuten-la-armonizacion-de-las-normas-internacionales>

- James, S. J., Giegel, A. J. & Hudson, W. R. 1983. The ultra rapid chilling of pork. *Meat Science*, 8: 63-65.
- Jiménez Martínez, F. 2014. El filtro de cocina: como factor de riesgo en la contaminación cruzada de los alimentos. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 15(5).
- Kato, T., Tada Oikawa, S., Wang, L., Murata, M. & Kuribayashi, K. 2013. Endocrine disruptors found in food contaminants enhance allergic sensitization through an oxidative stress that promotes the development of allergic airway inflammation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 273(1): 10-18.
- Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N. & Fakiri, E. M. 2013. Health benefits of probiotics: a review. *ISRN Nutrition*, 2013.
- Kong, C. H. Z., Hamid, N., Liu, T. & Sarojini, V. 2016. Effect of antifreeze peptide pretreatment on ice crystal size, drip loss, texture, and volatile compounds of frozen carrots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(21): 4327-4335.
- Linares Hernández, C. E., Vásquez Guardado, J. A., Rodríguez Ruano, C. A., Alvarenga Artiga, R. F. & Sánchez Ramos, M. E. 2020. Determinación de la calidad microbiológica de pescado fresco comercializado en el área de mariscos del mercado de mayoreo “La Tiendona”, El Salvador. *Revista Agrociencia*, 3(15): 68-75.
- MacArthur, R. 1970. Species packing and competitive equilibrium for many species. *Theoretical Population Biology*, 1: 1-11.
- Maestre Naranjo, M. A. & Muñoz Ortega, S. 2008. Medidas de actuación para la prevención de la toxiinfección alimentaria. *Medicina y Seguridad del Trabajo*, 54(212): 121-130.
- Marcén Letosa, J. J. 2000. Antimicrobianos naturales. *Medicina naturalista*, 2: 104-108.
- Mendoza Galindo, S. 2003. Historia de la microbiología de los alimentos y su desarrollo en Latinoamérica. *Revista de la sociedad Venezolana de Microbiología*, 23(1): 80-84.
- Murdoch, L. E., McKenzie, K., Maclean, M., Macgregor, S. J. & Anderson, J. G. 2013. Lethal effects of high-intensity violet 405-nm light on *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, and on dormant and germinating spores of *Aspergillus niger*. *Fungal Biology*, 117(7-8): 519-527.

- Nerín, C., Aznar, M. & Carrizo, D. 2016. Food contamination during food process. *Trends in Food Science & Technology*, 48: 63-68.
- Nian, L., Wang, M., Pan, M., Cheng, S., Zhang, W. & Cao, C. 2022. A potential spoilage bacteria inactivation approach on frozen fish. *Food Chemistry: X*, 14(2).
- OMS, 2020. Inocuidad de los alimentos. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- Orden de 2 de agosto de 1991 por la que se aprueban las normas microbiológicas, los límites de contenido en metales pesados y los métodos analíticos para la determinación de metales pesados para los productos de la pesca y la acuicultura. *Boletín Oficial del Estado*, 195, de 15 de agosto de 1991.
- Pakdel, M., Olsen, A. & Skjøndal Bar, E. M. 2023. A Review of Food Contaminants and Their Pathways Within Food Processing Equipment. *Journal of Food Protection*, 86(12).
- Rasul, M. G. & Majumdar, B. C. 2017. Abuse of Antibiotics in Aquaculture and it's Effects on Human, Aquatic Animal and Environment. *Haya: The Saudi Journal of Life Sciences*, 2(3): 81-88.
- Rodríguez Marval, M., Geornaras I., Kendall, P. A., Scanga, J. A., Belk, K. E. & Sofos, J. N. 2009. Microwave Oven Heating for Inactivation of *Listeria monocytogenes* on Frankfurters before Consumption. *Journal of Food Science*, 74(8): 453-460.
- Romero Jarero, J. M. & Negrete Redondo, M. D. P. 2011. Presencia de bacterias Gram positivas en músculo de pescado con importancia comercial en la zona del Caribe mexicano. *Revista mexicana de la biodiversidad*, 82(2).
- Ruiz, L., Aertsen, A., Nguyen The, C., Gänzle, M. G. & Alvarez Ordóñez, A. 2017. Industrial and Host Associated Stress Responses in Food Microbes. Implications for Food Technology and Food Safety. *Frontiers in microbiology*, 8.
- Sanabria Sánchez, G. & Chiquillo Pompeyo, J. C. 2019. Análisis microbiológico de dos muestras de pescado comercializadas en Tunja, Boyacá. Estudio de caso. *Cultura Científica*, 17: 52-65.
- Serwecińska, L. 2020. Antimicrobials and Antibiotic-Resistant Bacteria: A Risk to the Environment and to Public Health. *Water*, 12(12).

- Speck, M. L. & Ray, B. 1977. Effects of Freezing and Storage on Microorganisms in Frozen Foods: A review. *Journal of Food Protection*, 40(5): 333-336.
- Sterniša, M., Klančnik, A. & Smole Možina, S. 2019. Spoilage pseudomonas biofilm with escherichia coli protection in fish meat at 5 °C. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(10): 4635-4641.
- Suárez, W. & Herrera, F. 2011. Aislamiento de Aeromonas spp. en muestras de pescado fresco comercializado en Pamplona (norte de Santander). *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 14(2): 7-13.
- Suzzi, G. & Corsetti, A. 2020. Food Microbiology: The Past and the New Challenges for the Next 10 Years. *Frontiers in microbiology*, 11.
- Téllez Luis, S. J., Ramírez, J. A., Pérez Lamela, C., Vázquez, M. & Simal Gándara, J. 2001. Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 3(2): 66-80.
- Tesson, V., Federighi, M., Cummins, E., de Oliveira Mota, J., Guillou, S. & Boué, G. 2020. A Systematic Review of Beef Meat Quantitative Microbial Risk Assessment Models. *International journal of environmental research and public health*, 17(3).
- Tropea, A. 2022. Microbial Contamination and Public Health: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(12).
- Valls, J., Paredes, A. & González, D. 2006. Estabilidad de filetes de sardina (*Sardinella aurita*) en almacenamiento congelado a -18°C. *Revista Científica (Maracaibo)*, 16(2): 176-185.
- Vásquez, M., Sandra Milena, Suárez M., Héctor, & Zapata B, Sandra. 2009. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista chilena de nutrición*, 36(1): 64-71.
- Vásquez de Plata, G. 2003. La Contaminación de los Alimentos: un Problema por Resolver. *Salud UIS*, 35: 48-57.
- Zamora Intriago, I. E. & Barbosa, Y. 2019. Los riesgos de manipulación de los alimentos funcionales y su importancia para la salud. *Correo Científico Médico*, 23(3): 976-993.