



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

GRADO EN BIOLOGÍA
Trabajo Fin de Grado

Análisis microbiológico y de resistencia a antibióticos en distintas variedades de pescado

Alumno: Gázquez Martínez, Carolina

Junio, 2020



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

GRADO EN BIOLOGÍA
Trabajo Fin de Grado

Análisis microbiológico y de resistencia a antibióticos en distintas variedades de pescado

Alumno: Gázquez Martínez, Carolina

Junio, 2020

Índice

1. RESUMEN	5
2. SUMMARY	5
3. INTRODUCCIÓN	6
4. OBJETIVOS	13
5. MATERIALES Y MÉTODOS	14
5.1. Material.....	14
5.2. Métodos.....	15
5.2.1. <i>Medios de cultivo, composición y preparación.....</i>	<i>15</i>
5.2.1.1. <i>Medios de cultivo no selectivos</i>	<i>16</i>
5.2.1.2. <i>Medios de cultivo selectivos</i>	<i>17</i>
5.2.1.3. <i>Solución salina</i>	<i>21</i>
5.2.2. <i>Muestras y procesado.....</i>	<i>22</i>
5.2.3. <i>Siembra en placas</i>	<i>22</i>
5.2.4. <i>Recuento de colonias</i>	<i>24</i>
5.2.5. <i>Identificación de colonias.....</i>	<i>25</i>
5.2.6. <i>Antibiograma.....</i>	<i>27</i>
6. RESULTADOS	28
6.1. Recuento microbiano de las colonias	28
6.2. Diversidad microbiana.....	31
6.2.1. <i>Características macroscópicas y microscópicas, morfología de las colonias.....</i>	<i>31</i>
6.2.2. <i>Tinción de Gram y prueba de la catalasa en colonias seleccionadas ...</i>	<i>35</i>
6.3. Resistencia frente a antibióticos.....	40

7. DISCUSIÓN	43
8. CONCLUSIONES	45
9. BIBLIOGRAFÍA	46

1. RESUMEN

El pescado constituye uno de los pilares básicos de la alimentación debido a sus propiedades nutricionales. Los peces se encuentran íntimamente ligados a ambientes con niveles relativamente ricos en microorganismos, y a su vez en bacterias. En este estudio, por un lado se ha analizado la carga y diversidad bacteriana de 10 alimentos, que han sido bacaladilla, merluza, lubina, tintorera, dorada, boquerón, caballa, jurel, salmón y sardina, estos se han clasificado en función de su porcentaje lipídico, en pescados magros, semigrasos y grasos. En la segunda parte del estudio, se han testado tres antibióticos, que han sido ampicilina, gentamicina y eritromicina en cepas bacterianas seleccionadas, para observar su resistencia. Según nuestros resultados, los mesofilos totales se encuentran dentro de los límites establecidos por la FAO y por el Reglamento (CE) n.º 2073/2005 de la Comisión del 15 de noviembre del 2005, a excepción de la bacaladilla que sobrepasa los niveles límites del reglamento citado en cuanto a carga microbiana. Respecto a las resistencias a antibióticos, el porcentaje de cepas resistentes y multiresistentes que se han obtenido han sido de 100% y 70%, respectivamente.

Palabras clave: microorganismos, pescado, carga microbiana, resistencia a antibióticos, multiresistencia.

2. SUMMARY

Seafood products play an important role in human diet due to their nutritional properties. They are closely linked to environments with relatively rich microorganisms levels. In this research, on the one hand, bacterial load and diversity have been analyzed for 10 foods: blue whiting, hake, sea bass, blue shark, gilt-head bream, anchovy, mackerel, pompano, salmon and sardine, these ones have been classified according to their lipid percentage, in fatty fish, half fatty and lean. On the other hand of the study three antibiotics have been tested: ampicilin, gentamicin and erythromycin in selected bacterial strains to analyze their resistance. According to our results, the total mesophiles are within the limits established by FAO and (CE) n.º 2073/2005 law, excluding blue whiting which exceeds the limits of the strain in its microbial load. Regarding antibiotic resistance the percentage of resistant and multiresistant strains that obtained have been 100% and 70%, respectively.

Key Words: microorganisms, seafood, microbial load, resistant antibiotics, multiresistant.

3. INTRODUCCIÓN

Hasta los inicios del año 2020 se conoce que hay aproximadamente 35.500 especies descritas de peces, según el Instituto de Ciencia y Sostenibilidad de la Biodiversidad de California (Ron et al., 2020). Lo cual se corresponde con la cifra de casi un 50% del total de las especies de vertebrados (Tellería, 2013).

Los peces son vertebrados aclimatados al agua, dulce o salada. La forma corporal, está íntimamente relacionada con la forma de vida, y es generalmente de forma fusiforme e hidrodinámica. En el cuerpo se distinguen, una región anterior o cabeza, seguida del tronco que termina en una región caudal o cola, y está cubierto por escamas proporcionando protección y aislamiento. Están dotados de aletas como órganos locomotores que son a menudo un buen indicador de velocidad y agilidad. La respiración es a través de branquias y a menudo se encuentran protegidas por un opérculo (Ruiz, 2012).

En la reproducción, la sexual es el tipo más común (Coward et al., 2002). Existen dos tipos de fecundación, la externa que está presente en el 94% de las especies de peces y la interna presente en tan solo el 6% (Patzner, 2008) de las especies registradas.

En el caso de la fecundación externa, la mayoría son ovíparos, y los huevos son liberados por la hembra al medio acuático donde son fertilizados con espermatozoides por el macho en el momento oportuno. En el caso de la fertilización interna, los espermatozoides son depositados en el receptáculo espermático de la hembra, mediante un órgano accesorio denominado gonopodio que garantiza la fecundación cuando los óvulos de la hembra están maduros (Wootton y Smith, 2014). Esta fecundación la llevan a cabo peces vivíparos, en la cual los peces nacen como crías vivas, y por otro lado peces ovovivíparos en los cuales la hembra pone los huevos que permanecen dentro de su organismo. En lugar de expulsarlos, las crías maduran en el interior de las madres y una vez que los huevos eclosionan, salen al exterior.

En los peces, los lípidos son la principal fuente de energía para su crecimiento, especialmente durante el desarrollo embrionario, incluso para su desarrollo neural (Sargent et al., 1993).

Existe gran variación en la composición lipídica en las diferentes especies de peces (Kris-Etherton et al., 2000), la cual depende de diversos factores bióticos y abióticos, como madurez, género, tamaño, y profundidad de las especies (Ghaddar y Saoud, 2012; Kris-Etherton, Op. cit., 2000)

Algunos de los principales factores que desempeñan un papel fundamental en el perfil lipídico de las especies son: la temperatura del ambiente en el que viven (Dey, Buda, Wiik, Halver y Farkas, 1993), su alimentación pudiendo atribuirse a la composición lipídica del plancton que consumen (Steffens, 1997), y la variación estacional (Halver, 1980).

El pescado se puede clasificar en tres grandes grupos según el porcentaje lipídico de su cuerpo, siendo: pescados azules o grasos con un contenido de grasa superior al 5%, semigrasos entre el 2 y 5% de grasa corporal y blancos o magros con menos de un 2% del contenido de grasa total del individuo (Castro-González y Miranda-Becerra, 2010). Dicha clasificación podría influir en la carga microbiana de las diferentes especies además de su diversidad bacteriana, lo cual va a ser parte del objeto de estudio de este trabajo.

Microorganismos

Las bacterias son ubicuas en todos los hábitats que sostienen la vida en la Tierra, los diferentes tipos de ambientes albergan comunidades bacterianas muy diferentes (Sullam et al., 2012). Se ha demostrado que factores como la salinidad (Lozupone y Knight, 2007), el pH (Fierer y Jackson, 2006; Chu et al., 2010), interacciones ecológicas (Steele et al., 2011) y estacionalidad (Gilbert et al., 2009, 2012) son determinantes de la vida bacteriana libre en el medio. Las bacterias no solo viven en ambientes externos de forma libre e independiente, sino que también se asocian con huéspedes eucariotas.

Por lo tanto hay que tener en cuenta la relación que confieren estas cuando se asocian a sus hospedadores. Algunas como *V. fischeri*, *P. phosphoreum*, *P. leiognathi*, son especies marinas bioluminiscentes y establecen una simbiosis

mutualista con numerosos peces teleósteos, consiguiendo así ambos un beneficio mutuo (Martín et al., 2010). Por el contrario, la mayoría de las bacterias que causan enfermedades en los peces marinos son patógenas oportunistas, estas se encuentran presentes como parte de la microbiota normal de agua marina, causando enfermedad en sus hospedadores.

Los peces tienen poblaciones considerables de bacterias en su piel, branquias, huevos y tractos gastrointestinales (Cahill, 1990). Sus principales bacterias colonizadoras son aerobias, anaerobias y anaerobias facultativas obligadas, y comprenden los *phylum Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Actinobacteria*, y *Verrucomicrobia*, siendo los tres primeros los más importantes (Wang et al., 2017; Llewellyn et al., 2014).

Albergan una estimación aproximada de 10^7 a 10^{11} bacterias/g de contenido intestinal. *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes* representan hasta el 90% de la microflora intestinal (Nayak, 2010; Ingerslev et al., 2014), demostrándose que la familia *Vibrionaceae*, perteneciente al *phylum Proteobacteria* comprende hasta el 70% de las lecturas secuenciadas (Sullam, op. cit.).

El género *Pseudomonas* comprendido dentro del *phylum Proteobacteria*, está asociado con enfermedades infecciosas en peces (Cahill, op. cit.). Están implicados en procesos infecciosos como patógenos secundarios, invasores de peces comprometidos por otros patógenos, principalmente *P. fluorescens*, en salmones y truchas (Hatai et al., 1975).

Dentro del *phylum Firmicutes* uno de los géneros comunes es *Clostridium botulinum*, es un Bacilo Gram positivo que crece en ambientes de bajo contenido en oxígeno, es decir, son anaeróbios. Es comensal en los intestinos de peces marinos y de agua dulce. Esta bacteria produce una potente neurotoxina paralítica (Bean y Griffin, 1990). De las siete toxinas botulínicas reconocidas tipos (A-G), el tipo E está involucrado en la mayoría de los casos de enfermedades humanas relacionadas con el consumo de pescado, aunque los tipos A y B están ocasionalmente implicados (Barrett et al., 1977).

Flavobacterium psychrophilum pertenece al *phylum Bacteroidetes*. Es una bacteria Gram negativa que afecta a varias especies de salmón y trucha de agua dulce

(Duchaud et al., 2007). Produce enzimas que degradan colágeno, fibrinógeno, caseína, gelatina, elastina y extracto de músculo de pescado, llegando a degradar el sulfato de condroitina (Otis, 1984; Ostland et al., 2000).

A una temperatura entre 3-15°C produce brotes de enfermedad. La presencia de esta bacteria en los huevos de salmónidos y la transmisión vertical resultante de los reproductores a la progenie sugieren que este patógeno obligatorio de los peces se ha extendido a través del Comercio Internacional de peces vivos y huevos de pescado (Holt et al., 1993).

Se han encontrado similitudes entre las bacterias presentes en el intestino de individuos del mismo orden, sugiriendo especialización y coevolución entre estas y sus hospedadores (Roeselers et al., 2011). Se contrasta esta información con el estudio de Sullam et al. (2012), en el cual se ha demostrado que los niveles tróficos, el hábitat y posiblemente la filogenia del huésped juegan un papel importante en conformar las comunidades microbianas de estos. Un gran porcentaje de las especies bacterianas intestinales se han especializado para mantener una relación de mutualismo con los peces.

Enfermedades de origen alimentario

Según la FAO el pescado es una parte importante de la dieta de muchos países y contribuye con el 19 % de la oferta mundial de proteínas de origen animal (FAO, 2005; Béné et al., 2007). En los últimos 40 años, la ingesta mundial per cápita de pescado ha aumentado, en promedio, de 9 a 16 kg. (Ryder y Ababouch, 2005).

El consumo habitual de pescado presenta grandes ventajas nutricionales, por ello hay que tener en cuenta la posibilidad de que sea un vehículo de organismos agentes de infecciones e intoxicaciones alimentarias. Se sabe que los pescados y mariscos son de los primeros en las listas de alimentos relacionados con enfermedades de origen alimentario (Dillon y Patel, 1992).

Los productos de la pesca son vehículo de muchas de las bacterias patógenas que causan enfermedades en el hombre a través de los alimentos. Un riesgo asociado al consumo de pescado es el causado por microorganismos como bacterias. Las bacterias patógenas humanas transmitidas por el pescado se pueden dividir en dos grupos: uno constituido por géneros y especies cuyo hábitat natural es el agua,

siendo las especies de *Vibrio* los principales vinculados (*Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Plesiomonas shigelloides*, *Edwardsiella*, y *Aeromonas* móviles), y otro que incluye bacterias presentes en el agua pero procedentes de contaminación de origen fecal y/o asociadas con el procesado y la manipulación posterior del pescado como *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*.

El pescado es un producto altamente perecedero, puede sufrir alteraciones endógenas, debido a la actividad de enzimas lipasas que actúan sobre las grasas o alteraciones de origen exógeno donde participan activamente bacterias efectuando procesos de degradación (Ward y Hackney, 2012).

Alasalvar et al., (2001), manifiestan que el deficiente contenido de hidratos de carbono en el pescado dificulta su conservación, ya que las bacterias lácticas que inhiben la proliferación de gérmenes patógenos no tienen casi sustrato nutritivo para desarrollarse.

Debido a la facilidad y rapidez con la que suceden las alteraciones en el pescado tras su captura, se han diseñado diferentes métodos de conservación. Siendo el objetivo fundamental ofrecer al consumidor un producto de alta calidad nutricional y libre de patógenos (Aubourg et al., 2007). Los diferentes métodos de conservación son muy variados desde la aplicación de frío, calor y, hasta los que se basan en la reducción de la cantidad de agua (Altieri et al., 2005).

El método más utilizado es el de conservación del pescado por frío, dependiendo de la intensidad de frío pueden ser pescados frescos o refrigerados en los cuales la temperatura oscila entre -1 y 6°C, con la gran ventaja de que su valor nutritivo es muy elevado (Madrid et al., 1999).

Mediante la aplicación de frío encontramos además la conservación de pescados por congelación en los que su temperatura varía desde -16 a -25 °C. Según la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), es importante resaltar que la eficacia de la congelación depende de la temperatura y tiempo en el cual alcanza dicha temperatura. Se recomienda que la congelación se lleve a cabo a una temperatura igual o inferior a -20°C durante 7 días, para garantizar la eficacia del tratamiento. Otra variante la conforman los pescados ultracongelados que en menos

de dos horas alcanzan de 0 a -5°C, para después llegar hasta una temperatura de -16 a -35°C (Madrid Op. cit.).

Otro método de conservación consiste en la aplicación de calor. Por un lado mediante el ahumado del pescado, que consiste en someter el pescado a la acción de productos procedentes de la combustión incompleta de maderas autorizadas de primer uso, pudiendo mezclarlas con distintas proporciones de plantas aromáticas inofensivas. El humo posee sustancias bactericidas como la creosota y metanal, lo que unido a la deshidratación de este y la refrigeración hacen casi imposible el desarrollo bacteriano (Sanz, 2004).

Por otro lado mediante la cocción del pescado, se calienta a elevadas temperaturas entre 80 y 95°C durante 10 a 20 minutos, se destruyen así las enzimas y bacterias presentes, y finalmente, mediante modificación y enlatado en atmósferas modificadas (Madrid, Op. cit.).

Por último encontramos dos métodos basados en la reducción de agua. El salazón que consiste en la penetración de sal dentro del producto de forma que, esta absorbe la humedad y provoca una deshidratación parcial impidiendo el desarrollo de microorganismos (Sanz, Op. cit.).

Liofilización, es la reducción del contenido de agua mediante congelación o sublimación, aplicando sistemas de vacío ya que el hielo al vacío y a temperatura inferior a -30°C, pasa de estado sólido a gaseoso. Es una de las técnicas que menos afecta al valor nutricional del alimento, pero es una técnica muy costosa (Velásquez, 2013).

Tanto en la Directiva 91/493/CEE del Consejo, de 22 de julio de 1991, como en la comisión del 29 de enero de 2004 (2004/109/CE), vienen recogidos los requisitos por la que se fijan las normas sanitarias aplicables a la producción y a la puesta en el mercado de los productos pesqueros desde su captura.

Resistencia a antibióticos

La resistencia de las bacterias frente a antibióticos es un problema que afecta a la salud animal y humana. Grupos de expertos científicos tanto del Instituto de Medicina, la Sociedad Americana de Microbiología y la Organización Mundial de la

Salud han expresado preocupación acerca del incremento global de las resistencias. En la pérdida de sensibilidad a un antibiótico intervienen varios factores que son, la prevalencia de genes de resistencia (que determinan proteínas que protegen a las bacterias de los efectos de los fármacos) y la difusión del uso de antibióticos. Si la microbiota de una comunidad carece de genes que confieren resistencia contra un antibiótico, este podrá eliminar con éxito toda la infección, pero si en la microflora existen genes de resistencia y la comunidad hace uso persistente de un antibiótico, las bacterias que escapan a la erradicación por ese fármaco harán acto de presencia y proliferarán, además la resistencia puede propagarse a lugares distantes. Los antibióticos son necesarios para el control de las infecciones bacterianas, pero pueden tener efectos indeseables sobre la ecología microbiana, pudiendo producir cambios en las proporciones de las bacterias sensibles y resistentes a los antibióticos, tanto en el individuo sometido al tratamiento como a la comunidad en general (Buitrago et al., 2001).

4. OBJETIVOS

El objetivo fundamental de este trabajo es determinar la carga microbiana de distintas variedades de pescado, realizar un recuento e identificación de los microorganismos hallados en dichas muestras, y testar las bacterias aisladas frente a antibióticos específicos.

Los objetivos específicos han sido los siguientes:

1. Realizar un estudio comparativo de la cantidad y diversidad de microorganismos presentes en las diferentes variedades de pescados atendiendo a su porcentaje lipídico.
2. Determinar la presencia de bacterias resistentes o multiresistentes a diferentes antibióticos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material

- Preparación de medios de cultivo: agua destilada, balanza de precisión, medios de cultivo deshidratados (TSA, TSB, MRSA, EMB, KAA y Vogel-Johnson), matraces Erlenmeyer, tubos de ensayo, gradilla, algodón hidrófobo, papel de aluminio, cinta de autoclave, autoclave, baño termostático, pipeta graduada, propipeta, placas Petri, cámara frigorífica (Fig. 1A y B).
- Preparación de la solución salina: agua destilada, balanza, cloruro sódico, frasco de cristal, gradilla, micropipeta, puntas de micropipeta estériles, Falcon con faldón y Eppendorf de 1,5ml (Fig. 1C).

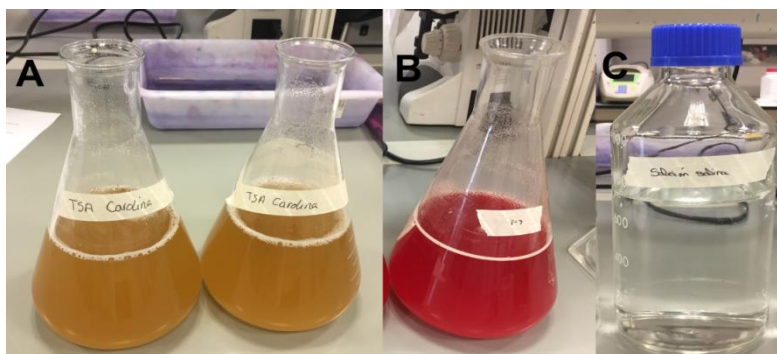


Fig. 1. Preparación de medios de cultivo y solución salina. **A**, medio de cultivo general hidratado (TSA). **B**, medio de cultivo selectivo hidratado (V-J). **C**, solución salina.

- Procesado de las muestras: balanza, bisturí, bolsas estériles, homogeneizador Stomacher® 80 Biomaster, tubos Falcon con faldón estériles.
- Siembra de muestras: mechero Bunsen, placas, micropipeta, puntas estériles, asa de Digrafsky y estufa de cultivo de 30°C y 37°C.
- Tinción Gram: cubeta, puente de tinción, portaobjetos, cultivo con muestra, agua destilada, asa de siembra, Cristal Violeta, Lugol, etanol 96%, Safranina, aceite de inmersión y microscopio óptico (Fig. 2).

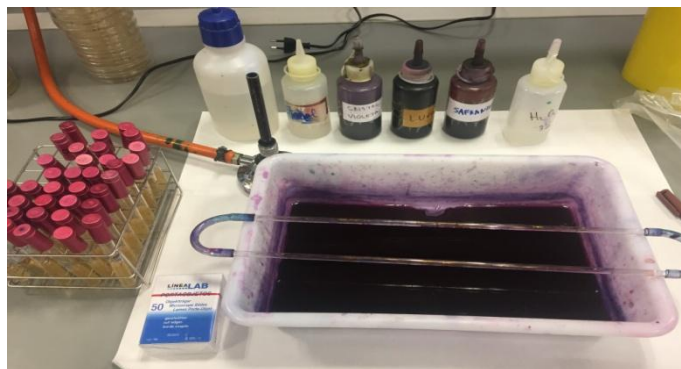


Fig. 2. Material utilizado para la tinción de Gram.

- Prueba de la Catalasa: asa de siembra, portaobjetos y peróxido de hidrogeno (H_2O_2).
- Antibiograma: placas Petri con medio de cultivo (Müller-Hinton), discos de antibióticos (Ampicilina, Eritromicina, Gentamicina), pinzas, tubos con diluciones de bacterias, escobillones (Fig. 3).

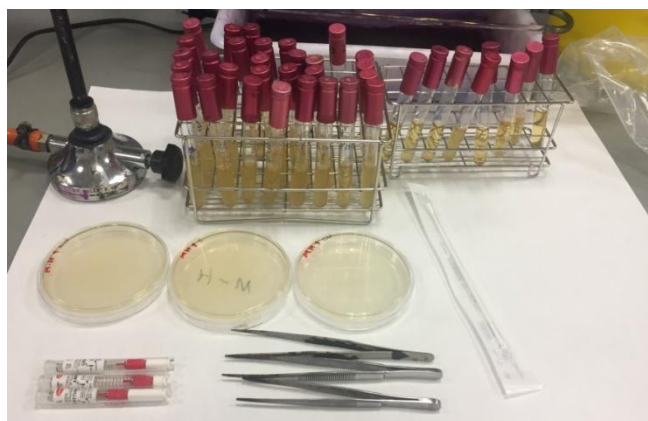


Fig. 3. Material utilizado para la ejecución del antibiograma.

5.2. Métodos

5.2.1. Medios de cultivo, composición y preparación

Se preparan diferentes medios de cultivo donde se van a sembrar los diferentes alimentos objeto de estudio; no selectivos (TSA y TSB) y selectivos (MRSA, KAA, VJ y EMB). Todos ellos deshidratados y procedentes del mismo fabricante Scharlab, S.L. (Barcelona), para que no haya alteraciones en los resultados.

5.2.1.1. Medios de cultivo no selectivos

Agar Triptona y Soja (TSA)

Es un medio nutritivo general sólido producido por la digestión enzimática de peptonas de soja y caseína. Permite el crecimiento de microorganismos exigentes y poco exigentes nutricionalmente, incluyendo bacterias aeróbicas y anaeróbicas. La aportación de caseína y peptonas de soja le aporta un valor nutritivo importante, gracias al suministro de nitrógeno orgánico. Lo que permite un crecimiento rápido de gran variedad de microorganismos.

Se recomienda para detectar y hacer el recuento de una amplia gama de microorganismos como pueden ser: Estreptococos, Pneumococos, Brucella, Corinebacterias, Erysipelothrix y Pasteurella. Es muy útil para comparar el crecimiento observado en este medio de control, con su crecimiento en los diferentes medios selectivos.

Composición del medio (g/L)

Peptona de caseína..... 15,0

Peptona de soja..... 5,0

Cloruro sódico..... 5,0

Agar..... 15,0

pH final a 25°C, 7,3 ±0,2

Preparación

El fabricante indica que 40g de medio de cultivo (TSA) deben disolverse en un litro de agua destilada. Para la preparación se utilizaron 32g de medio de cultivo y se homogeneizaron con 800 ml de agua destilada. Preparando así dos matraces de 800ml que fueron utilizados posteriormente.

Caldo de Triptona y Soja (TSB)

Es un medio de cultivo general líquido altamente nutritivo. Permite el crecimiento de la mayor parte de microorganismos tanto aeróbicos como facultativos aún cuando sus requerimientos sean notables. Debido al alto contenido en vitaminas de la peptona de soja, el desarrollo de Brucella, Pasteurella y Estreptococos es

perfectamente viable, aun cuando se puede favorecer más con la atmósfera enriquecida en CO₂. En condiciones de anaerobiosis este caldo soporta perfectamente bien el crecimiento de bacteroides y clostridios.

Es muy útil para los ensayos de sensibilidad por diluciones sucesivas, por su gran capacidad para soportar el crecimiento de casi todos los organismos.

Peptona de caseína..... 17,0

Peptona de soja..... 3,0

Cloruro sódico..... 5,0

Fosfato dipotásico..... 2,5

Dextrosa..... 2,5

pH final a 25°C, 7,3 ±0,2

Preparación

Siguiendo las instrucciones del etiquetado se deben suspender 30 gramos del medio en un litro de agua destilada. Haciendo los cálculos para la preparación de 150 mililitros se pesa la cantidad de 4,5 gramos de medio de cultivo y se disuelve. Finalmente se distribuye con una pipeta en tubos de ensayo, 3 ml en cada uno.

5.2.1.2. Medios de cultivo selectivos

Agar Eosina-Azul de Metileno (EMB)

Contiene una mezcla de peptonas y presenta dos carbohidratos, lactosa y sacarosa. Este medio de cultivo permite una diferenciación clara entre colonias de organismos fermentadores de lactosa y aquellos que no lo son. El contenido de eosina y azul de metileno inhiben en cierto grado organismos Gram positivos. La presencia de sacarosa permite para algunos miembros del grupo coliforme fermentarla con más facilidad que la lactosa. Las colonias lactosa positiva son entre azules y moradas con brillo metálico o poseen centros oscuros con periferias transparentes incoloras. Las que son negativas en lactosa o sacarosa se observan incoloras o rosa pálido transparentes.

Medio extraordinariamente versátil que se utiliza para la diferenciación de *E. coli* y *Enterobacter aerogenes* pero también ha mostrado gran eficacia en el diagnóstico rápido de *Candida albicans*.

Composición (g/L)

Peptona..... 10,000

Lactosa..... 10,000

Fosfato dipotásico..... 2, 000

Eosina amarilla..... 0, 400

Azul de metileno..... 0,065

Agar..... 15,000

pH final a 25°C, 6,90 ±0,2

Preparación

Siguiendo las instrucciones del fabricante se necesitan 37,5 gramos del medio disueltos en un litro de agua destilada. Puesto que se utiliza un matraz con 800 ml de agua destilada, se necesitan 30 gramos del medio de cultivo.

Kanamicina esculina azida Agar (KAA)

Es un medio selectivo para la detección, y enumeración de estreptococos del grupo D (*Enterococcus*, *Streptococcus faecalis*) de Lancefield. El sulfato de kanamicina y la azida sódica inhiben el crecimiento de bacterias acompañantes. Si los estreptococos hidrolizan la esculina del medio se producen zonas negras alrededor de las colonias a partir de la formación de compuestos fenólicos de hierro negro derivados de productos de hidrolisis de hierro ferroso y esculina.

Estos microorganismos son muy resistentes a las condiciones adversas por lo que se consideran buenos indicadores para valorar las condiciones higiénicas y de conservación de los alimentos.

Composición (g/L)

Triptona.....20,00

Extracto de levadura.....5,00

Cloruro sódico.....5,00

Citrato disódico.....1,00

Esculina.....1,00

Citrato férrico amónico.....0,50

Azida sódica.....0,15

Kanamicina sulfato.....0,02

pH final a 25°C, 7,0 ±0,2

Preparación

El etiquetado comercial indica que se deben disolver 33 gramos del medio en un litro de agua destilada. Ajustando los cálculos para 800 ml de agua destilada, se añadieron 26,4 gramos de medio de cultivo.

Vogel-Johnson Agar (VJ)

Medio sólido de alta selectividad para el aislamiento e identificación de estafilococos, según la norma ISO 22718.

La presencia del cloruro de litio, de la glicocola y del telurito potásico inhiben casi totalmente a la microbiota acompañante, mientras que los estafilococos apenas se ven afectados, ya que si bien pueden reducir el telurito a telurio, el litio puede ejercer alguna acción que queda perfectamente compensada por el efecto regenerador de la glicocola. Los estafilococos aparecen por lo general como colonias negras por el telurito reducido sobre un medio de color rojo, los no fermentadores de manitol, y con un halo amarillo los fermentadores.

Composición (g/L)

Peptona de caseína..... 10,000

Extracto de levadura..... 5,000

Manitol..... 10,000

Fosfato dipotásico..... 5,000

Cloruro de litio.....	5,000
Glicina.....	10,000
Rojo de fenol.....	0,025
Agar.....	15,000

pH final a 25°C, 7,2 ±0,2

Preparación

Teniendo en cuenta el etiquetado del envase se necesitan 60 gramos del medio y 20 mililitros de Telurito al 1% para la preparación de 1 litro del mismo. Se hacen los cálculos y para un matraz con 800 mililitros de medio, se rehidratan 30 gramos de medio de cultivo con agua destilada y se añade 16 ml de Telurito.

MRS Agar

Medio de cultivo sólido para bacterias del ácido láctico según de Man, Rogosa y Sharpe, de acuerdo con la normas ISO y los métodos IFU.

La adición de magnesio, manganeso y acetato, junto con el polisorbato facilitan en gran forma el crecimiento de los bacilos lácticos, incluso las especies más exigentes, como *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus fermenti*. El citrato de amonio, a un pH bajo, inhibe la mayoría de los microorganismos, pero permite el crecimiento de *Lactobacilli*. El fosfato dipotásico y el acetato de sodio son agentes amortiguadores para mantener un pH bajo.

Composición (g/L)

Peptona enzimática de caseína.....	10,00
Extracto de carne.....	10,00
Extracto de levadura.....	4,00
D(+)-Glucosa.....	20,00
Acetato sódico.....	5,00
Citrato triamónico.....	2,00
Sulfato magnésico.....	0,20

Sulfato manganeso..... 0,05

Fosfato dipotásico..... 2,00

Polisorbato 80..... 1,08

Agar.....14,00

pH final a 25°C, 5,7 $\pm$ 0,2

Preparación

El etiquetado del envase indica que por cada litro de agua destilada hay que añadir 62 gramos de medio de cultivo. En nuestro caso se pesan 49,6 gramos del medio y se suspenden en 800 mililitros de agua destilada.

Preparación de medios

Todos los medios se prepararon siguiendo las instrucciones del fabricante (Scharlab, 2019). Se pesaron y diluyeron con agua destilada en un matraz Erlenmeyer, se taparon con algodón hidrófobo y papel de aluminio para su posterior esterilización en el autoclave durante 15 minutos a 121°C y 1 atmósfera de presión. Posteriormente los matraces se introdujeron en un baño termostático para bajar su temperatura a 50°C y poder distribuir su contenido en placas Petri, 13 ml en cada una de ellas. El medio TSB, ya que es líquido, se distribuyó en tubos de ensayo, 3 ml en cada uno. Se dejaron atemperar 24 horas a temperatura ambiente y después se conservaron en una cámara frigorífica entre 0-5°C hasta su utilización.

5.2.1.3. Solución salina

Se utiliza como diluyente para ajustar la turbidez de suspensiones de células bacterianas y así mantener la integridad y viabilidad de ellas, con el fin de obtener una concentración adecuada para la observación al microscopio y determinar el recuento celular.

Se prepararon un frasco de cristal de 700 ml y un matraz Erlenmeyer de 50 ml con solución salina al 0,9%. Se ajustaron los cálculos, y se diluyeron 6,3 gramos de NaCl en los 700 mililitros de agua destilada del frasco, y en el matraz se suspendieron 0,45 gramos de NaCl con 50 ml de aguas destilada. A continuación el matraz de 50

ml se distribuyó en Eppendorf con 0,9 ml de la mezcla, para la realización posterior de diluciones seriadas de las muestras.

Los 50 tubos Eppendorf bien cerrados junto con el frasco de cristal se esterilizaron en el autoclave, al igual que las puntas de pipeta y los medios de cultivo.

Al finalizar la esterilización, el frasco de 700ml de solución salina se repartió en 10 Falcon con faldón (45ml), para su posterior utilización en el homogeneizado de las muestras.

5.2.2. Muestras y procesado

Para el estudio se seleccionaron y procesaron 10 muestras de diferentes especies de pescado, procedentes del mismo establecimiento comercial: merluza (*Merluccius merluccius*), bacaladilla (*Micromesistius poutassou*), lubina (*Dicentrarchus labrax*), dorada (*Sparus aurata*), tintorera (*Prionace glauca*), jurel (*Trachurus trachurus*), salmón (*salmo*), sardina (*Sardina pilchardus*), caballa (*Scomber scombrus*), boquerón (*Engraulis encrasicolus*), que son consideradas de importancia comercial.

En este estudio las diferentes especies se han clasificado atendiendo a su porcentaje graso, por lo que encontramos en primer lugar pescado magro o blanco: bacaladilla y merluza, seguido de pescado semigraso: dorada, lubina y tintorera, y finalmente pescado graso o azul: boquerón, caballa, jurel, salmón y sardina.

Las muestras recolectadas se trasladaron al laboratorio de microbiología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de Jaén.

El procesado de las diferentes muestras se realizó en condiciones asépticas. Con un bisturí estéril se realizó un corte lateral desde la aleta dorsal hasta la caudal, del cual se extrajeron 5 gramos de piel y musculo del pescado. Los cuales se homogeneizaron con 45mL de solución salina 0,9% en una bolsa estéril con un homogeneizador (Stomacher 80 Biomaster, Seward Ltd). Esta mezcla se trasladó a un tubo Falcon y se consideró como solución madre o dilución cero.

5.2.3. Siembra en placas

Para llevar a cabo la siembra de las diferentes muestras se realizaron diluciones seriadas a partir de la solución madre de cada alimento. Para ello se utilizaron Eppendorf preparados anteriormente con 0,9 ml de solución salina estéril. Las

diluciones se prepararon añadiendo con una micropipeta 100 μ l de la dilución cero, en uno de los Eppendorf con solución salina y se homogeneizaron, obteniendo así la dilución -1, que se preparó por duplicado. A partir de la dilución -1 se pipetearon 100 μ l y se introdujeron en otro Eppendorf obteniendo así la disolución -2. Esto se repitió varias veces, obteniendo las diluciones -3 y -4, siendo esta última la más diluida (Figura 4). Después de cada dilución se cambió la punta de la micropipeta para evitar arrastrar bacterias de la dilución anterior, más concentrada.

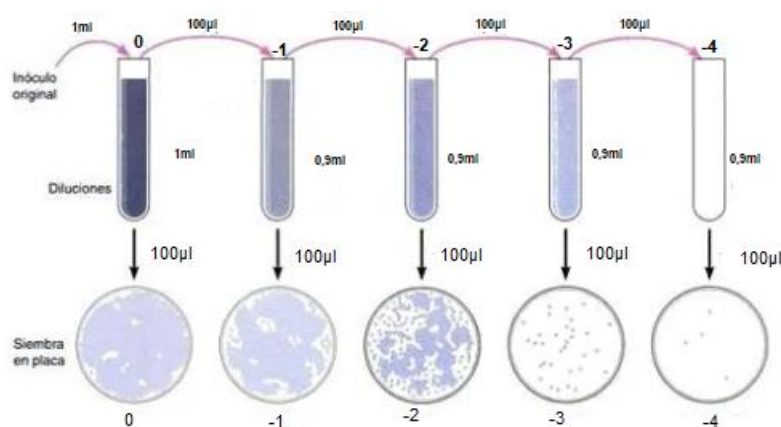


Fig. 4. Representación de las diluciones seriadas realizadas.

Este proceso se realizó con cada una de las 10 muestras, obteniendo un total de un tubo Falcon (dilución 0) y 5 Eppendorf por cada una de ellas (-1,-1,-2,-3,-4).

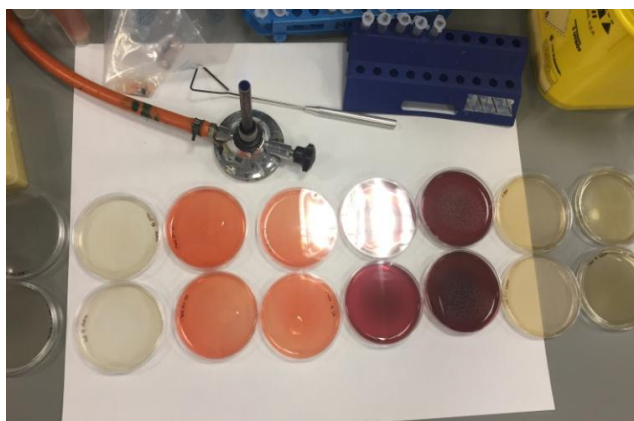
Después de realizar las diluciones seriadas se realizó la siembra de estas, en los medios de cultivo. Se tomaron 100 microlitros de dilución y se depositaron en las placas correspondientes, extendiéndolos con un asa de Digralsky, llevando a cabo una siembra en superficie para su posterior cuantificación. Se realizó desde la más diluida a la más concentrada sin la necesidad de cambiar la punta de la pipeta ni esterilizar el asa de Digralsky y trabajando en todo momento en condiciones de esterilidad con un mechero Bunsen.

La siembra en el medio de cultivo general (TSA) se realizó desde la dilución 0 a la -4, es decir, 0,-1,-2,-3,-4. En cuanto a los medios selectivos (EMB, KAA, VJ, MRS), se realizó la siembra de las diluciones 0 y -1 (Tabla 1). Todas las siembras se realizaron por duplicado para reducir al máximo el margen de error.

Tabla 1. Medios de cultivo con sus correspondientes diluciones en siembra.

Medios de cultivo/ diluciones				
TSA	EMB	KAA	VJ	MRS
0	0	0	0	0
-1	-1	-1	-1	-1
-2				
-3				
-4				

Se obtuvieron un total de 26 placas sembradas por muestra, 10 de medio general (TSA) y 16 de medios selectivos (Figura 5). Una vez sembradas dichas placas se incubaron en una estufa a 37°C durante 48 horas, excepto las placas del medio MRS que se incubaron a 30°C, ya que es la temperatura óptima de crecimiento para las bacterias lácticas (Forbes, 2009). Las placas se guardaron en la estufa boca abajo para evitar su evaporación y obtener un crecimiento bacteriano eficiente.

**Fig. 5.** Placas con medios selectivos preparadas para la siembra.

5.2.4. Recuento de colonias

Tras haber realizado la siembra e incubación, 48 horas después se realizó el recuento bacteriano. Se empezó por las primeras muestras que fueron sembradas, es decir, el primer alimento y así consecutivamente.

Se llevó a cabo una observación macroscópica placa por placa del aspecto (color y morfología) de las diferentes colonias presentes en cada medio de cultivo.

El recuento consiste en la enumeración de las UFC (Unidades Formadoras de Colonias) presentes en una unidad de peso, en un gramo si es un alimento sólido, como en mi caso. Para ello se utiliza la siguiente fórmula:

$$\frac{UFC}{g} = \frac{n^{\circ} \text{ de colonias} \times \text{factor de dilucion} \times 10}{Volmen}$$

El recuento se debe realizar en la placa que corresponda a la dilución en la que el crecimiento bacteriano se encuentre entre 30 y 300 colonias.

El factor de dilución (FD) es la inversa de la dilución (D) donde se haya efectuado el recuento (Si $D = 10^{-3} \rightarrow FD = 10^3$).

El volumen siempre es 0,1 ml ya que en cada placa se depositaron 100 microlitros de cada dilución para la siembra.

Hay que tener en cuenta que en cada muestra se hizo una dilución previa al homogeneizar los 5 gramos de muestra con 45 ml de solución salina, lo que hace que tengan una dilución previa de 1:10 ($\times 10$).

5.2.5. *Identificación de colonias*

Para la identificación de las diferentes colonias observadas en los distintos medios de cultivo, donde se han sembrado los alimentos objetos de estudio, se va a realizar una tinción de Gram y la prueba de la catalasa. Las placas seleccionadas para esto han sido las que presentaban un crecimiento entre 30 y 300 colonias, pero si por el contrario no alcanzaban un máximo de 30 colonias se seleccionaba la placa más próxima a este número.

Tinción de Gram

El objetivo de esta tinción es clasificar las bacterias en Gram positivas o Gram negativas (Figura 6), así como evaluar su morfología (cocos, bacilos o cocobacilos) y tipo de agrupación (parejas, tétradas, racimos o cadenas).

La pared celular de las bacterias Gram negativas está constituida por una capa fina de peptidoglicano y una membrana celular externa, mientras que las bacterias Gram positivas poseen una pared celular gruesa constituida por peptidoglicano, pero no cuentan con membrana celular externa. La tinción de Gram se basa en colocar como colorante primario cristal violeta, el cual tiene afinidad con el peptidoglicano de la pared bacteriana. Posteriormente, se coloca lugol, el cual sirve como mordiente e impide la salida del cristal violeta por la formación de un complejo cristal violeta-yodo que satura los espacios del peptidoglicano de la pared bacteriana. En seguida, se coloca alcohol etílico, el cual deshidrata la pared bacteriana y cierra los poros de la

misma, también destruye la membrana externa de las bacterias Gram negativas debido a que ésta es soluble a la acción de solventes orgánicos, como el alcohol etílico. Las bacterias Gram positivas, al contener una gran cantidad de peptidoglicano, retienen con mayor fuerza este complejo, mientras que las Gram negativas no lo pueden retener por tener menos cantidad de peptidoglicano. Por último, se coloca safranina, la cual funciona como un colorante secundario o de contraste y sirve para teñir las bacterias que no pudieron retener el complejo cristal violeta-yodo. Como resultado, las bacterias Gram + se van a observar de color violeta mientras que las bacterias Gram – se observaran teñidas de color rosa. Una vez realizada la tinción dichas muestras se observaron en un microscopio óptico al aumento 100x y con una gota de aceite de inmersión.

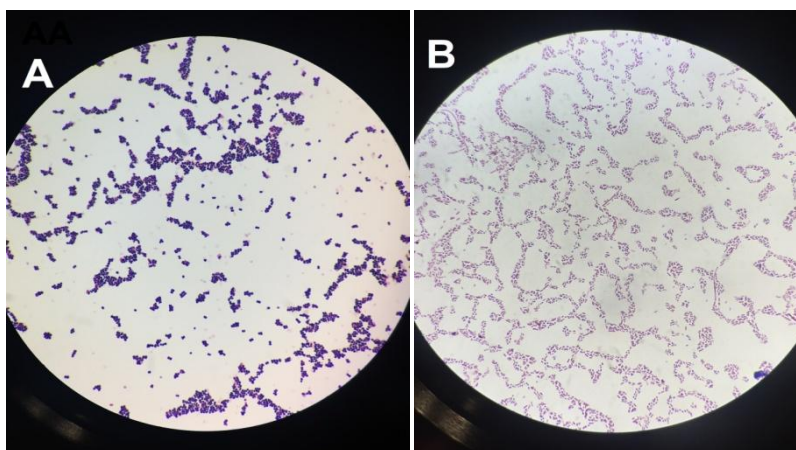


Fig. 6. Bacterias teñidas observadas al microscopio. **A.** Gram positivas. **B.** Gram negativas.

Prueba de la catalasa

El peróxido de hidrógeno es el producto final del metabolismo oxidativo de los carbohidratos. La acumulación de peróxido es muy tóxica para los microorganismos, por lo que la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas exceptuando a *Streptococcus sp.* producen una enzima llamada catalasa que degrada el peróxido de hidrógeno produciendo agua y oxígeno gas.

A las colonias elegidas se les realizó la prueba de la catalasa, la cual pone en manifiesto la presencia o ausencia de este enzima. La realización de la prueba se hizo sobre un portaobjetos en el cual se colocó una gota de H_2O_2 , se flameó el asa de siembra y se seleccionó la colonia de interés, extendiéndola después sobre la gota de peróxido.

Si se produce efervescencia, es decir, liberación de O_2 quiere decir que la prueba se considera positiva y que el enzima catalasa está presente en la bacteria testada. Si por el contrario no se produce efervescencia, la prueba es negativa.

5.2.6. *Antibiograma*

Tiene como objetivo evaluar la respuesta de un microorganismo frente a uno o varios antimicrobianos, como antibióticos en mi caso; y traducir en una primera aproximación su resultado como factor predictivo de la eficacia de estos.

Antes de realizar el antibiograma, se realizó la preparación del inóculo. En los tubos de ensayo preparados previamente con medio de cultivo general líquido (TSB), se sembraron las bacterias seleccionadas y se incubaron en una estufa durante 18 horas a 37°C. Hasta alcanzar una densidad celular aproximada de 0,5 según la escala de MacFarland (Fig. 7).

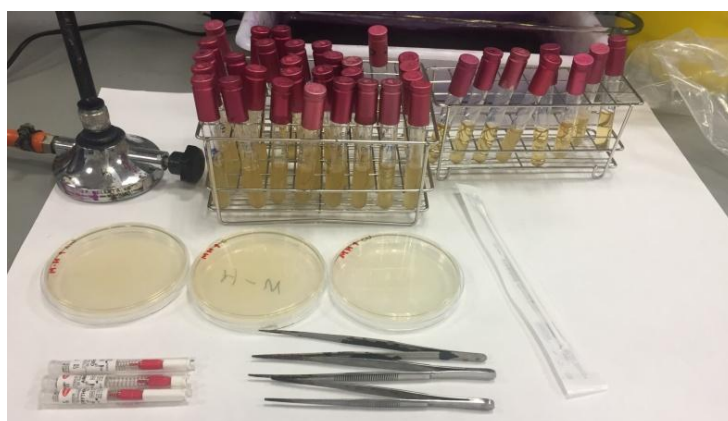


Fig. 7. Tubos con el inóculo y discos de antibiótico.

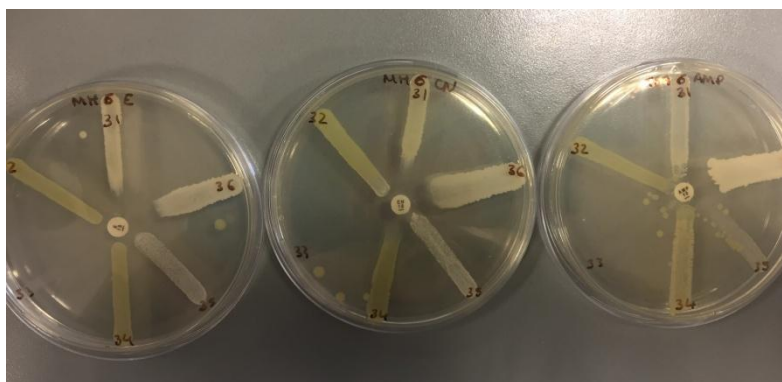
Trascurridas las 18 horas de incubación los tubos se sometieron a agitación en un Vortex entre 10 y 15 segundos. Con un escobillón impregnado en suspensión bacteriana se inocularon las placas de Müller-Hinton, en forma de estrella, sembrando 6 cepas en cada una, e insertando un disco de antibiótico en el centro de cada placa.

Se seleccionaron 36 cepas, en cada placa se sembraron 6 cepas. Esas 6 cepas tuvieron que sembrarse por triplicado, ya que hubo que testar 3 antibióticos en cada una de ellas (Tabla 2), procedentes de la misma marca Oxoid™. Este proceso se realizó con las 36 cepas, lo que sumaron un total de 18 placas, es decir, 6 placas por triplicado con los tres diferentes antibióticos.

Tabla 2. Concentración de los distintos antibióticos utilizados.

Abreviatura	Antibiótico	Concentración (µg)
AMP	Ampicilina	10
CN	Gentamicina	10
E	Eritromicina	15

Tras 18-24 horas de incubación a 37°C, se realizó una lectura del crecimiento macroscópicamente (Fig. 8).

**Figura 8.** Resultado del crecimiento bacteriano sujeto a tres discos de antibióticos diferentes.

6. RESULTADOS

Los resultados obtenidos van a ser expuestos en 3 partes. Una primera parte dedicada al recuento de UFC que nos va a permitir conocer la carga bacteriana, una segunda parte de identificación de los diferentes microorganismos presentes con el fin de determinar la diversidad bacteriana y, por último, una tercera parte en la que vamos a testar las posibles resistencias a antibióticos que ofrecen las bacterias seleccionadas.

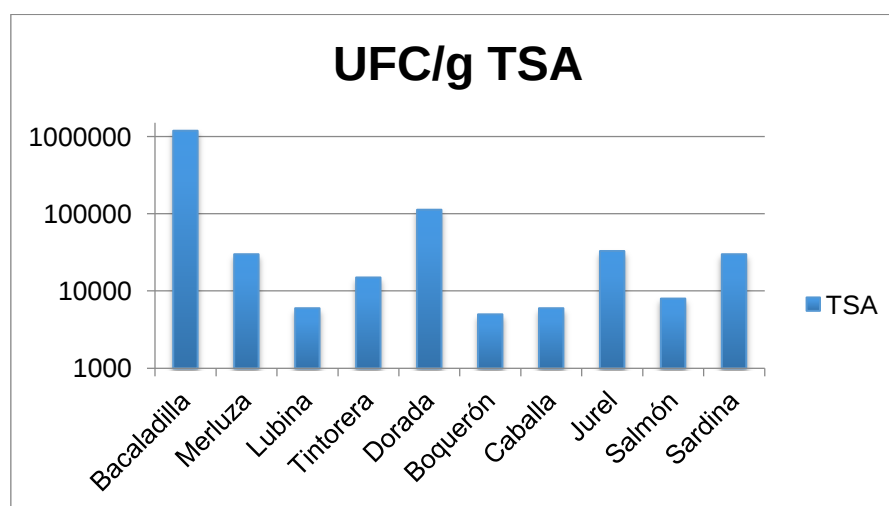
6.1. Recuento microbiano de las colonias

La siguiente tabla (Tabla 3) recoge los datos de las UFC/g obtenidas en cada alimento y en los diferentes medios de cultivo.

Tabla 3. UFC/g obtenidas en cada alimento en los correspondientes medios de cultivo.

	TSA	EMB	KAA	VJ	MRS
Bacaladilla	$1,19 \times 10^6$	$3,4 \times 10^4$	4×10^2	$7,4 \times 10^3$	$1,39 \times 10^4$
Merluza	3×10^4	3×10^3	2×10^2	$3,1 \times 10^3$	$4,7 \times 10^3$
Lubina	6×10^3	$2,4 \times 10^3$	0	$5,4 \times 10^3$	$1,62 \times 10^4$
Tintorera	$1,5 \times 10^4$	1×10^2	6×10^2	$1,06 \times 10^4$	$1,02 \times 10^4$
Dorada	$1,13 \times 10^5$	$7,1 \times 10^4$	0	6×10^2	$1,2 \times 10^3$
Boquerón	5×10^3	5×10^2	2×10^2	2×10^2	3×10^2
Caballa	6×10^3	$2,5 \times 10^3$	1×10^2	3×10^2	$1,1 \times 10^3$
Jurel	$3,3 \times 10^4$	2×10^3	0	2×10^4	$1,2 \times 10^3$
Salmón	8×10^3	2×10^2	4×10^2	$1,4 \times 10^3$	2×10^3
Sardina	3×10^4	$1,9 \times 10^3$	0	2×10^2	$2,1 \times 10^3$

Para determinar la carga microbiana de las diferentes especies atendemos al crecimiento bacteriano en el medio de cultivo general TSA, el cual, como se ha mencionado anteriormente, permite el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos.

**Figura 9.** Gráfico con las Unidades Formadoras de Colonias de cada muestra en el medio general TSA.

A simple vista se puede apreciar una gran diferencia de carga bacteriana entre las muestras de bacaladilla, en un mayor grado, y dorada con respecto al resto (Figura 9).

El alimento que mayor carga microbiana total ha presentado es la bacaladilla con $1,19 \times 10^6$ UFC/g, seguido de la dorada $1,13 \times 10^5$ UFC/g, siendo por el contrario el boquerón el que menor carga microbiana ha presentado con 5×10^3 UFC/g, correspondiendo este último a la clasificación de pescados grasos.

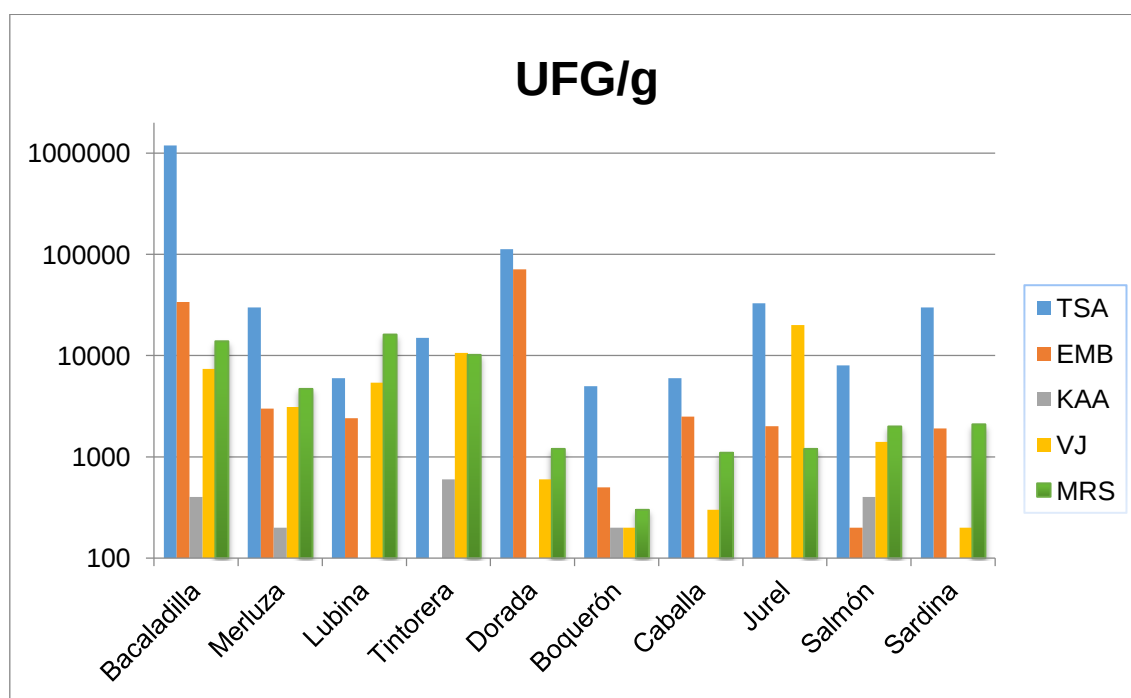


Figura 10. Gráfico con las Unidades Formadoras de Colonias de cada muestra en los diferentes medios de cultivo.

En el medio EMB (Figura 10), para el crecimiento de enterobacterias se observa que la muestra que mayor carga microbiana presenta es la dorada con $7,1 \times 10^4$ UFC/g seguida de la bacaladilla con $3,4 \times 10^4$ UFC/g y la que menor crecimiento muestra es la de tintoreta y salmón con 1×10^2 y 2×10^2 UFC/g, respectivamente.

En el medio KAA, selectivo para enterococos, ha sido el medio en el que menor crecimiento se ha observado, siendo este muy limitado, incluso llegando a ser nulo en algunos casos como en lubina, dorada, jurel y sardina, mientras que en el resto de muestras ninguno ha superado el crecimiento de 6×10^2 UFC/g, en tintoreta.

En el medio VJ, para la detección y enumeración de estafilococos patógenos, la muestra que mayor crecimiento microbiano presenta es la de jurel con 2×10^4 UFC/g, seguido de la de tintorera con $1,06 \times 10^4$ UFC/g y bacaladilla con $7,4 \times 10^3$, seguidos de la lubina y merluza. Presentando el resto un recuento inferior y perteneciendo en su mayoría al grupo de pescados azules o grasos.

En el medio MRS, que permite el crecimiento de bacterias lácticas, se observa un crecimiento microbiano elevado tanto en las muestras de pescado semigraso (lubina y tintorera), como en las de pescado blanco o magro (bacaladilla y merluza), siendo por el contrario muy bajo en el boquerón. En el resto de las muestras, es decir, pescados grasos o azules y una muestra de pescado semigraso (dorada) el recuento ha sido muy similar comprendido entre $1,1 \times 10^3$ y $2,1 \times 10^3$.

A continuación se muestra un ejemplo de un recuento realizado en placas de TSA para el cálculo posterior de UFC (Figura 11).

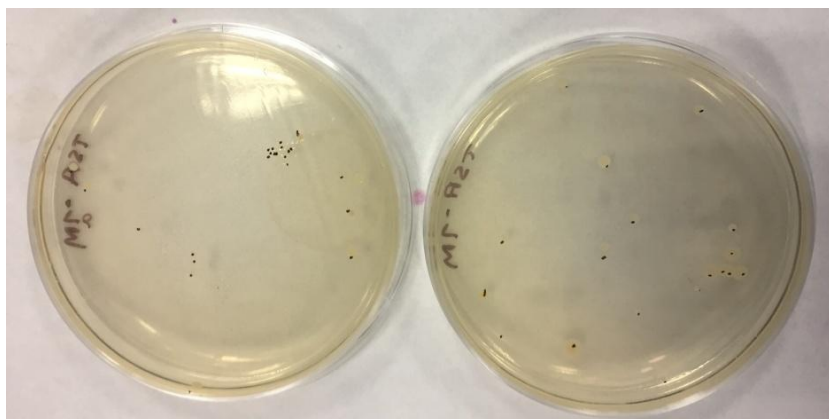


Fig. 11. Ejemplo de placas marcadas para realizar el recuento microbiano.

6.2. Diversidad microbiana

6.2.1. Características macroscópicas y microscópicas, morfología de las colonias

En el medio general, TSA, se han aislado una gran variedad de colonias de diferentes colores como blanquecinas, amarillentas, anaranjadas y transparentes todas ellas de diferentes tamaños y densidades (Fig. 12).

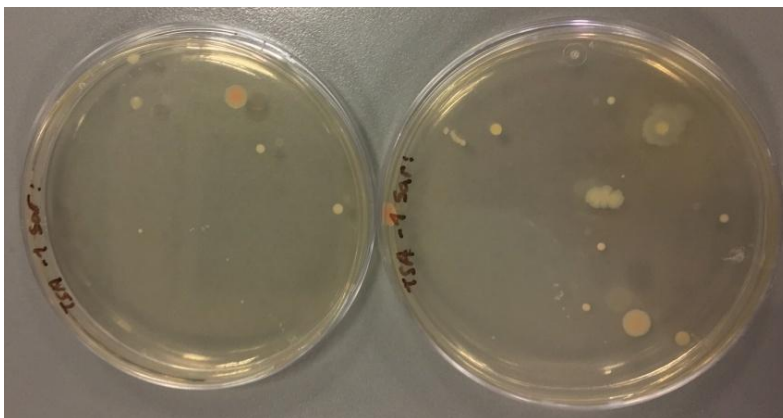


Figura 12. Colonias encontradas en el medio TSA.

En el medio EMB (Figura 13) se han observado ocho tipos de colonias: circular pequeña amarillenta, violeta convexa, rosácea rizoide muy característica de levaduras, amarilla rizoide, pequeña incolora, negra opaca, pulvinada rosácea y colonias con brillo verde metálico que pueden ser indicativas de la presencia de *Escherichia coli*.

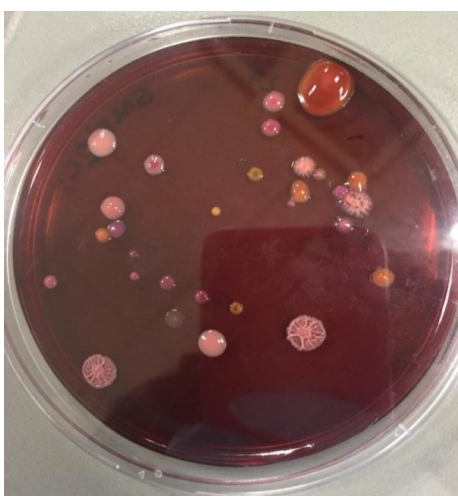


Figura 13. Crecimiento bacteriano en EMB en muestra de caballa.

En el medio KAA, todas las colonias encontradas han sido muy pequeñas, circulares y de color blanco o amarillo (Fig.14).

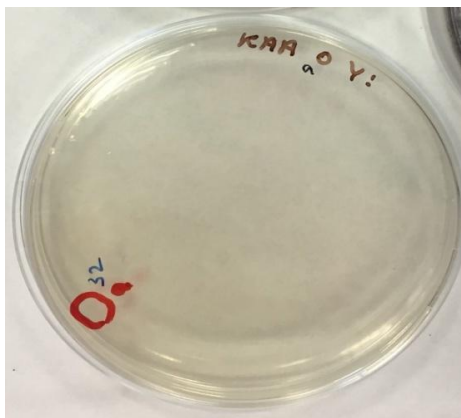


Figura 14. Ejemplo del medio KAA con una colonia muy pequeña.

En el medio VJ, se han hallado tres tipos de colonias, colonias circulares pequeñas de color negro, otras similares pero que presentan alrededor un halo de color amarillo y rara vez colonias blancas pequeñas (Fig. 15).

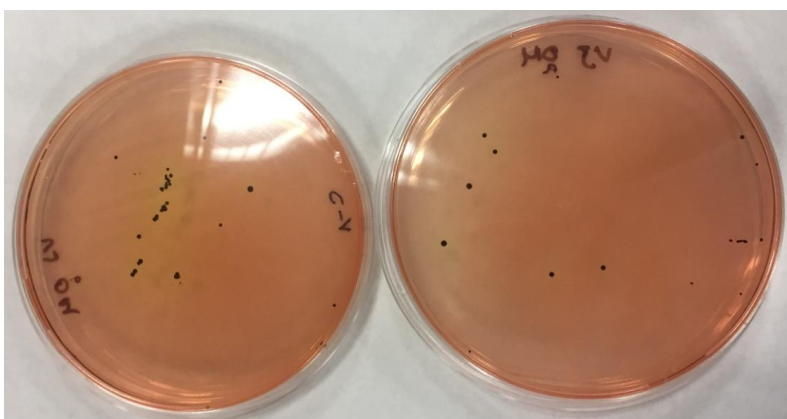


Figura 15. Colonias presentes en el medio selectivo VJ.

Por último, en el medio MRS, se han observado colonias planas opacas y blancas; y hongos filamentosos blancos (Fig. 16).

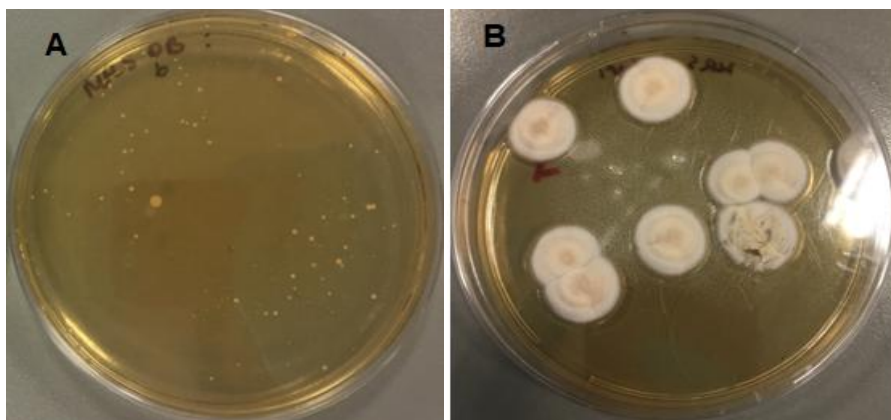
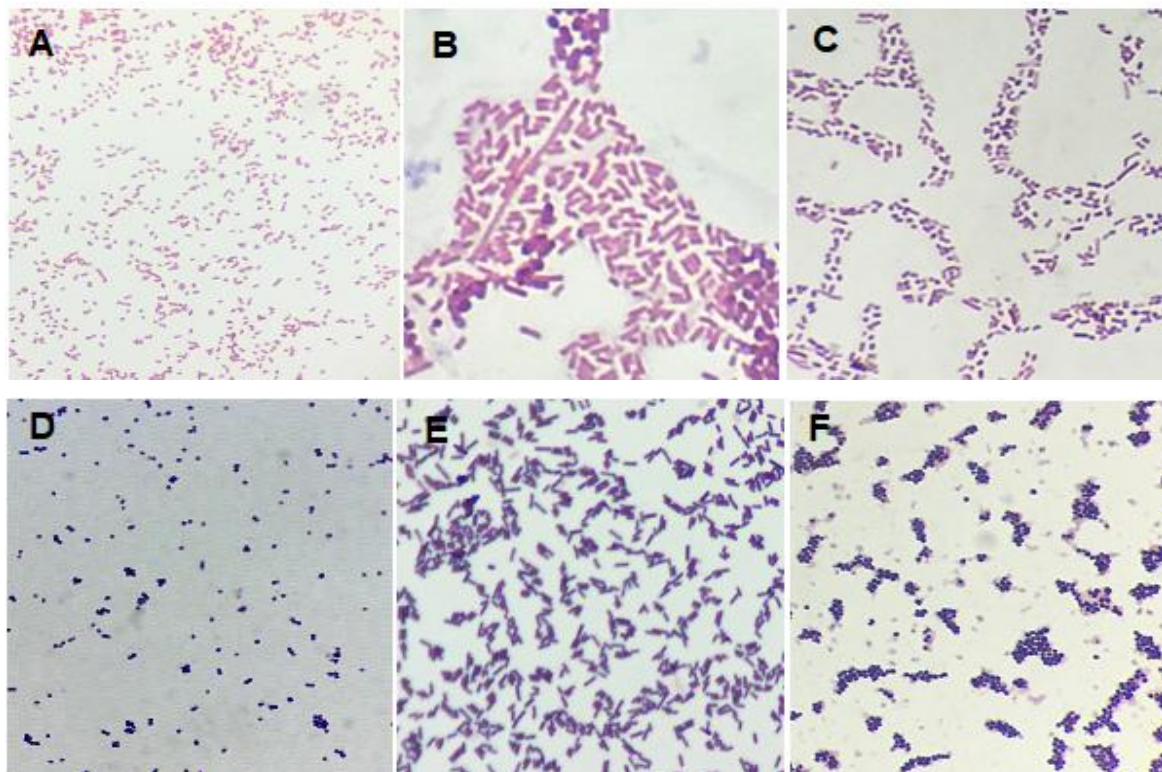


Figura 16. Colonias en MRS. **A.** Pequeñas, opacas y blancas. **B.** Hongos filamentosos.

En la siguiente imagen (Figura 17) se muestran las diferentes morfologías microscópicas observadas.



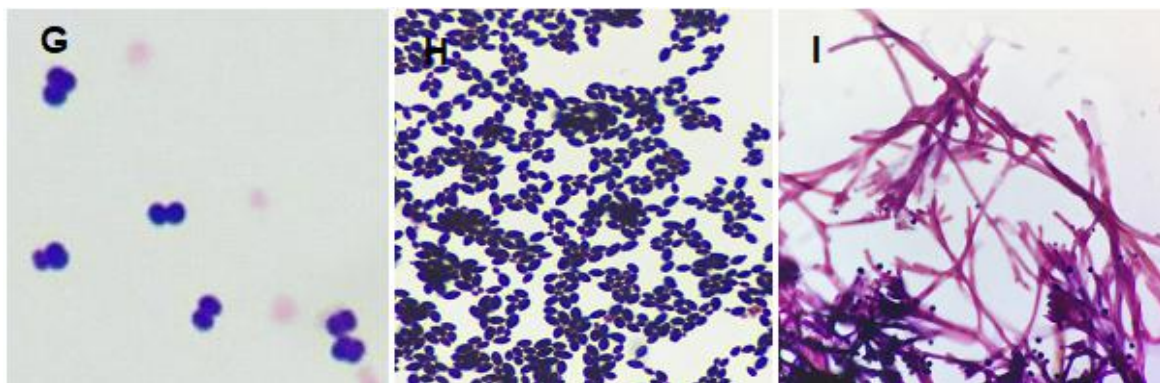


Figura 17. Morfología observada al microscopio después de la tinción de Gram. **A.** Cocos Gram -. **B.** Bacilos Gram -. **C.** Coco-bacilos Gram -. **D.** Cocos Gram +. **E.** Bacilos Gram +. **F.** Racimos de cocos Gram +. **G.** Diplococos Gram +. **H.** Levaduras. **I.** Hifas de hongos.

Los cocos Gram – (A) han sido observados en el medio MRS, tanto Bacilos como Coco-bacilos Gram – (B y C) han sido hallados en el medio EMB. Por otro lado en las bacterias Gram +, los cocos (D) se han observado en KAA, VJ Y MRS. Los bacilos de este grupo (E) han sido identificados en MRS, racimos de cocos (F) en VJ en la merluza únicamente. Diplococos Gram + (G) en KAA en el salmón. Las levaduras (H) han sido observadas en MRS en su totalidad y en un caso concreto en la tintorera en el medio VJ. Por último, los hongos (I) han sido identificados en el medio EMB en titorera y MRS en salmón.

6.2.2. Tinción de Gram y prueba de la catalasa en colonias seleccionadas

Las siguientes tablas nos muestran los resultados obtenidos en cuanto la caracterización de bacterias presentes en las diferentes especies agrupadas en pescado blanco o magro (Tabla 4), pescado semigraso (Tabla 5) y pescado azul o graso (Tabla 6). Para ello se exponen los resultados de la tinción de Gram y la prueba de la catalasa, junto con los datos de morfología anteriormente descritos, diferenciando los distintos tipos de medios de cultivo empleados.

Pescado blanco o magro

Tabla 4. Identificación de las colonias en las muestras de pescado blanco.

Alimento	Medio de cultivo	Cepas bacterianas	Morfología macroscópica	Morfología microscópica	Tinción de Gram	Prueba de la catalasa
Bacaladilla	EMB	1	Negra	Bacilos	-	-
			Incolora	Bacilos	-	-
			Rosácea convexa	Bacilos	-	-
	KAA	2	Blanca	Cocos	+	-
	VJ	3	Negra	Cocos	+	-
	MRS		Blanca filamentosa	Levaduras		
Merluza	EMB		Negra opaca	Bacilos	-	-
	KAA	4	Blanca opaca	Cocos	+	-
	VJ	5	Negra con halo amarillo	Cocos en racimos	+	-
	MRS	6	Blanca opaca	Cocos	-	-

En cuanto los resultados expuestos en la Tabla 4, referentes a las 2 especies de pescado blanco o magro objeto de estudio, se ha observado:

En la bacaladilla la presencia de Bacilos Gram - en las tres muestras seleccionadas del medio EMB, pertenecientes a colonias cuya morfología era negra, incolora y rosácea convexa. También se ha observado la presencia de Cocos Gram +, en los medios KAA y VJ, con colonias pequeñas blancas y negras, respectivamente. Finalmente se han observado levaduras, de morfología blanca filamentosa en el medio selectivo MRS.

En cuanto a la merluza se encuentran Bacilos Gram – en el medio EMB, en una colonia circular de color negra opaca. En el medio KAA se obtuvo la presencia de Cocos Gram + en colonias blancas opacas, con catalasa negativa, características propias de enterococos. También se han visualizado Cocos en racimos Gram +, en una colonia negra con un halo alrededor de color amarillo en el medio KAA, y finalmente se ha detectado la presencia de Cocos de color blanco opaco en el medio MRS.

En ambas muestras de pescados semigrasos, en todos los medios la prueba de la catalasa ha resultado negativa. Un indicio que sostiene la presencia de enterococos en el medio KAA. Al igual que en la merluza en el medio MRS la presencia de bacterias lácticas.

Pescado semigraso**Tabla 5.** Identificación de las colonias en las muestras de pescado semigraso.

Alimento	Medio de cultivo	Cepas bacterianas	Morfología macroscópica	Morfología microscópica	Tinción de Gram	Prueba de la catalasa
Lubina	EMB	7	Verde brillante	Bacilos	-	+
		8	Negra pequeña	Bacilos agrupados	-	+
	VJ	9	Negra con halo amarillo	Cocos	+	-
	MRS	10	Blanca	Levaduras		+
			Blanca filamentosa	Levaduras		+
Tintorera	EMB		Blanco filamentoso	Hongos filamentosos		+
	KAA	11	Blanca	Cocos	+	-
	VJ	12	Negra	Cocos	+	-
			Blanca	Levadura		+
	MRS	13	Incolora	Cocos en racimos	+	+
			Rosa	Levaduras		+
Dorada	EMB	15	Rosácea	Coco-bacilos	-	+
		14	Verde brillante	Bacilos	-	+
	VJ	16	Negra	Cocos	+	+
	MRS	17	Blanca filamentosa	Levaduras		+
			Blanca	Levaduras		+

En cuanto los resultados expuestos en la Tabla 5, referentes a las 3 especies de pescado semigraso objeto de estudio, se ha observado:

En la lubina, Bacilos sueltos y agrupados Gram -, en colonias de color verde brillante metalizado y negra, respectivamente, ambos en el medio selectivo EMB, con presencia de la enzima catalasa. En el medio VJ en una colonia negra rodeada con

un halo amarillo, se han observado la presencia de Cocos Gram +, con ausencia de la enzima catalasa. Finalmente se han visualizado levaduras en el medio MRS, de color blanquecino y con presencia de la enzima catalasa.

En la tintorera se han observado hongos filamentosos en una colonia blanquecina en el medio EMB, con presencia de la enzima catalasa. Se han observado Cocos Gram+ en una colonia blanquecina pequeña en el medio KAA, con ausencia de catalasa. En VJ también se han identificado Cocos Gram + en una colonia circular de color negro, sin la enzima catalasa, y levaduras presentes en una colonia blanca, con presencia de la enzima catalasa. Finalmente en el medio MRS se han visualizado Cocos en racimos Gram + y levaduras, en colonias incolora y blanca, respectivamente, ambas con la presencia de enzima catalasa.

Por último, en la dorada, en el medio EMB se han observado Coco-bacilos y Bacilos Gram -, los primeros obtenidos de una colonia rosácea y los segundos en una colonia de color verde brillante metálico. Se han identificados Cocos Gram + en una colonia negra en el medio VJ, y finalmente en el medio MRS se han identificado levaduras. Todas las colonias seleccionadas de este alimento presentan la enzima catalasa.

Pescado azul o graso

Tabla 6. Identificación de las colonias en las muestras de pescado graso.

Alimento	Medio de cultivo	Cepas bacterianas	Morfología macroscópica	Morfología microscópica	Tinción de Gram	Prueba de la catalasa
Boquerón	EMB	18	Rosácea transparente	Bacilos	-	+
			Rosa pulvinada	Bacilos	-	+
			Rosácea rizoide	Bacilos	-	+
	KAA	19	Blanca	Cocos	+	-
	VJ		Negra	Cocos	+	+
	MRS		Blanca filamentososa	Levaduras		+
Caballa	EMB		Rosácea elevada	Coco-bacilos	-	-
		20	Rosácea	Bacilos	-	+

			rizoide			
			Rosa claro plana	Bacilos	-	-
			Violeta	Bacilos	-	-
	KAA	21	Amarillenta	Coco-bacilos	-	-
	VJ	22	Negra con halo	Coco-bacilos	-	+
	MRS	23	Blanca filamentosa	Levadura		+
Jurel	EMB	24	Rosa	Bacilos	-	-
		25	Violeta	Bacilos	-	+
	VJ	26	Negra	Cocos	+	+
	MRS	27	Blanquecina	Cocos	+	-
Salmón	EMB	28	Rosácea elevada	Coco-bacilos	-	-
	KAA	29	Blanca	Diplococos	-	-
	VJ	30	Negra	Cocos	+	-
	MRS		Blanca filamentosa	Hongos		+
			Blanca opaca	Cocos	+	+
Sardina	EMB		Violeta	Bacilos	-	-
		31	Rosácea elevada	Bacilos	-	-
			Amarilla	Bacilos	-	+
	VJ	32	Negra pequeña	Cocos en racimo	+	+
	MRS	33	Rosácea	Bacilos	+	+
			Rosácea	Bacilos	+	-

En cuanto los resultados expuestos en la Tabla 6, referentes a las 5 especies de pescado azul o graso objeto de estudio, se ha observado:

En el boquerón se encuentran Bacilos Gram –, en el medio EMB, aislados en diferentes colonias que eran: rosácea transparente, rosa pulvinada y rosácea rizoide. También se ha identificado la presencia de Cocos Gram+, de morfología

blanquecina en el medio KAA, y en VJ en una colonia negra. Se han identificado levaduras en una colonia blanquecina filamentosa en el medio MRS. La prueba de la catalasa ha salido positiva en todas las colonias mencionadas anteriormente, a excepción de la del medio KAA.

En la caballa se han observado Coco-bacilos y Bacilos Gram -. Los Coco-bacilos Gram -, también han estado presentes en el medio KAA y VJ, en el primero en una colonia de color amarillento y con ausencia de catalasa, y en el segundo medio en una colonia negra con un halo amarillo y con la enzima catalasa. Por último en el medio MRS se han identificado levaduras con presencia de catalasa.

En el jurel se han visualizado Bacilos, Gram -, en una colonia rosa y otra violeta, la primera con ausencia de la enzima catalasa y la segunda con la presencia de esta en el medio EMB. Se han observado Cocos Gram + en el medio VJ y MRS, en el primer medio en una colonia de color negra y con catalasa positiva, y en el segundo en una blanquecina y sin catalasa.

En el salmón, en una colonia rosácea en el medio EMB se han identificado Coco-bacilos Gram -, sin la enzima catalasa. Se ha hallado la presencia de diplococos, han sido los únicos observados, en el medio KAA en una colonia blanca y con ausencia de la enzima catalasa. En el medio VJ se han visualizado Cocos Gram +, en una colonia negra con catalasa negativa. Finalmente en el medio MRS se han observado Hongos y cocos Gram +, con la enzima catalasa.

Por último, en la sardina, se han identificado Bacilos Gram – en el medio EMB, en tres colonias con morfología diferente: violeta, rosácea y amarillenta, presentando esta última la enzima catalasa. También se han observado Bacilos en el medio MRS, pero en este caso Gram +, en una colonia estaba presente la enzima catalasa y en la otra no. Y finalmente en el medio VJ se han visualizado Cocos en racimo Gram , en una colonia negra circular en los que estaba presente la enzima catalasa.

6.3. Resistencia frente a antibióticos

Los parámetros que indican si las cepas bacterianas presentan sensibilidad (S) o resistencia (R) frente a un antibiótico son los siguientes.

Ampicilina: $S \geq 1,7$ cm; $R \leq 1,3$ cm

Gentamicina: $S \geq 1,2$ cm; $R \leq 1,5$ cm

Eritromicina: $S \geq 1,3$ cm; $R \leq 2,3$ cm

Tabla 7. Representación de las diferentes cepas bacterianas seleccionadas ensayadas frente a tres antibióticos (S= -; R= +)

	Cepas bacterianas	Ampicilina (AMP)	Gentamicina (CN)	Eritromicina (E)
Bacaladilla	1	+	+	+
	2	+	+	+
	3	+	+	+
Merluza	4	+	-	+
	5	+	-	-
	6	+	-	-
Lubina	7	+	+	+
	8	+	+	+
	9	-	+	+
	10	+	+	+
Tintorera	11	+	+	+
	12	+	+	+
	13	+	+	+
Dorada	14	+	+	+
	15	+	+	+
	16	+	+	+
	17	+	+	+
Boquerón	18	+	-	+
	19	+	+	+
Caballa	20	+	+	+
	21	+	+	+
	22	+	+	+
	23	+	+	+
Jurel	24	+	+	+
	25	+	(bacteriostático)	+
	26	+	+	+
	27	+	+	(bacteriostático)
Salmón	28	-	+	-
	29	+	(bacteriostático)	+
	30	+	+	-
Sardina	31	+	+	+
	32	+	+	+
	33	-	(bacteriostático)	+

En la Tabla 7 se puede observar de forma general la elevada resistencia que ofrecen las cepas bacterianas seleccionadas, frente a la ampicilina y eritromicina, y con una disminución muy leve frente a gentamicina. A continuación, en la Figura 19, se encuentran dichos datos representados gráficamente de forma más exacta.

Un aspecto importante a remarcar es el efecto bacteriostático (Figura 18) que han presentado la cepa 21 frente ampicilina; 24, 27, 28, 29 y 32 frente gentamicina; y la cepa 26 frente eritromicina, ya que en las placas se podía observar de manera macroscópica como el antibiótico inhibía el crecimiento de la bacteria, pero no en su totalidad.

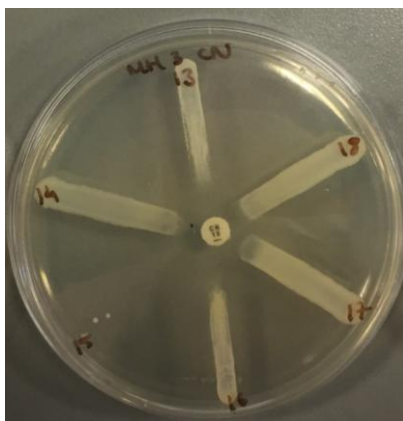


Figura 18. En esta placa se observa el efecto bacteriostático en el número 17 que se corresponde con la cepa 24.

También cabe destacar que el 100% de bacterias aisladas han presentado resistencia a alguno de los antibióticos utilizados.

La Figura 19 muestra el porcentaje de bacterias resistentes a los tres antibióticos utilizados en este estudio: ampicilina, gentamicina y eritromicina. De estos tres, la mayor prevalencia de resistencia se ha detectado con ampicilina (91%), seguido de eritromicina (85%) y con el valor mínimo, la gentamicina (82%).

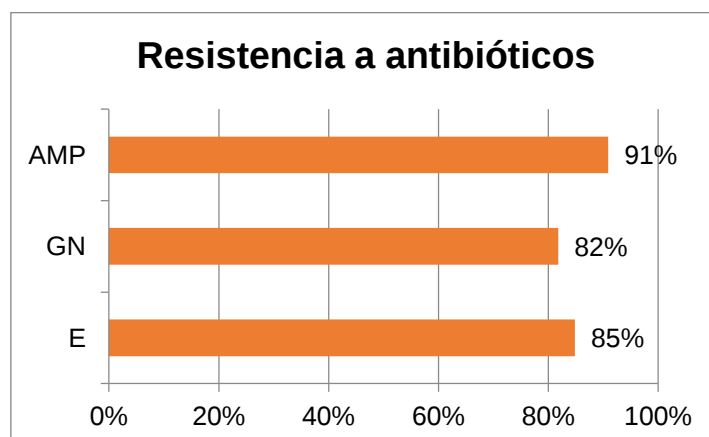


Figura 19. Gráfica con los porcentajes de bacterias resistentes a los antibióticos testados.

7. DISCUSIÓN

Entre las medidas adoptadas figura el Reglamento (CE) n.º 2073/2005 de la Comisión del 15 de noviembre de 2005, por el que se aprueban los criterios microbiológicos de los diferentes productos de la pesca frescos, salpseudados, refrigerados y congelados, implanta que el recuento de colonias aerobias mesófilas ($31^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) debe ser como máximo $10^6/\text{g}$, mientras que el de enterobacterias totales tiene que ser inferior a $10^3/\text{g}$. En el caso de *sighella* y *salmonella* debe de haber ausencia en una muestra de 25 gramos.

Según la FAO los límites microbiológicos máximos recomendados para productos pesqueros frescos es $10^7/\text{g}$ de recuento de aerobios por placa.

Como se puede observar, los datos obtenidos en este estudio del recuento total de mesófilos en el medio TSA (Figura 9), la bacaladilla, perteneciente al grupo de pescados magros, es la única muestra que no se encuentra dentro de los parámetros establecidos por el B.O.E., al sobrepasar levemente el límite establecido. Lo que quiere decir que se trata de un producto contaminado. El resto de los alimentos entran dentro del límite establecido por este Reglamento con respecto al recuento total de bacterias mesófilas.

Sin embargo, el límite del recuento total de mesófilos según la FAO es superior, $10^7/\text{g}$, por lo tanto todas las muestras analizadas en este estudio se encuentran dentro de este margen, consideradas por esta, libres de contaminación.

En cuanto a los valores de enterobacterias, aisladas en el medio de cultivo EMB, según el criterio del Reglamento del 15 de noviembre de 2005, el límite máximo es de 10^3 UFC/g, siendo este valor superado en la mayoría de los alimentos exceptuando tres de ellos, que son, tintorera, boquerón y salmón (Figura 10). Agrupando los alimentos según el porcentaje lipídico podemos destacar una mayor carga bacteriana, de 10^2 unidades de diferencia, en pescados magros y semigrasos respecto a pescados grasos.

Los enterococos, aislados en el medio de cultivo KAA, son un género de bacterias del ácido láctico, en las cuales el límite máximo se encuentra en 10^2 UFC/g. Los alimentos que superan dicho límite son bacaladilla, merluza, tintorera, boquerón y salmón, quedando la caballa por debajo del límite máximo permitido, y en el resto de alimentos ha habido ausencia de crecimiento.

Con respecto a los estafilococos, aislados en el medio de cultivo VJ, el valor máximo es 10^3 UFC/g, según UNE-EN ISO 6888-1:2000/A2:2019, el cual es superado en ambas muestras de pescados magros, bacaladilla y merluza; en dos muestras de pescados semigrasos, lubina y tintorera; y por último en pescados grasos en jurel y salmón. Los pescados grasos presentan de forma general una menor cantidad de estafilococos que los magros y semigrasos, los cuales presentan una cantidad similar entre sí.

En el caso de las bacterias lácticas, aisladas en el medio de cultivo MRS, el límite establecido se encuentra en 10^2 . Cabe destacar que se ha mostrado un elevado crecimiento, superando el límite establecido en todas las muestras. En pescados grasos el crecimiento ha sido menor con respecto a magros y semigrasos, en los cuales ha sido muy similar.

En cuanto al apartado de antibióticos, como bien dicen Buitrago et al., (2001), la resistencia a antibióticos es un problema que existe en la actualidad y que está teniendo fuertes repercusiones. En este estudio se han testado tres antibióticos, ampicilina, gentamicina y eritromicina frente a 33 cepas bacterianas seleccionadas. En ampicilina se ha obtenido un 91% de cepas que presentan resistencia, le sigue la eritromicina con un 85% y finalmente la gentamicina con un 82%.

El 70% de las cepas seleccionadas presentan multiresistencia frente a los tres antibióticos testados, por lo que sería interesante continuar con este estudio desde

el punto de vista molecular para tratar de determinar la posible presencia de genes de resistencia a antibióticos.

8. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos se pueden establecer las siguientes conclusiones:

1. Las colonias mesófilas totales de todas las muestras de los alimentos se encuentran dentro de los límites establecidos por la FAO, y según el Reglamento del 15 de noviembre de 2005, la bacaladilla es el único alimento que excede el valor máximo, considerándose como contaminado.
2. No existen diferencias significativas en cuanto la carga bacteriana entre los diferentes alimentos atendiendo a su clasificación según su porcentaje lipídico.
3. Siete de los diez alimentos analizados superan el límite establecido para enterobacterias en pescado. Estos son los siguientes, bacaladilla, merluza, lubina, dorada, caballa, jurel y sardina.
4. En cuanto a enterococos, cinco de los diez alimentos analizados superan el límite establecido. Estos son: bacaladilla, merluza, tintorera, boquerón y salmón.
5. Bacaladilla, merluza, lubina, tintorera, jurel y salmón han superado los niveles establecido para estafilococos, los que mayor abundancia de estas bacterias han presentado son pescados semigrasos y por el contrario los que menor, los grasos.
6. La abundancia de bacterias lácticas por encima del límite establecido ha estado presente en todos los alimentos, siendo, de forma general, en menor grado en los pescados grasos respecto a los pescados magros y semigrasos, los cuales presentan cantidades similares entre sí.
7. El 100% de bacterias aisladas han presentado resistencia a uno o varios de los antibióticos testados, de las cuales el 70% presenta multiresistencia a los tres de forma simultánea.

9. BIBLIOGRAFÍA

- (Ron, F., William, E., Jon D. F. (2020). California Academy of Sciences: *Institute for Biodiversity Science and Sustainability*. Recuperado de <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>).
- Alasalvar, C., Taylor, K. D. A., Öksüz, A., Garthwaite, T., Alexis, M. N., Grigorakis, K. (2001). Freshness assessment of cultured sea bream (*Sparus aurata*) by chemical, physical and sensory methods. *Food chemistry*, 72(1), 33-40.
- Altieri, C., Speranza, B., Del Nobile, M. A., Sinigaglia, M. (2005). Suitability of bifidobacteria and thymol as biopreservatives in extending the shelf life of fresh packed plaice fillets. *Journal of applied microbiology*, 99(6), 1294-1302.
- Aubourg, S. P., Quitral, V., Larraín, M. A., Rodríguez, A., Gómez, J., Maier, L., Vinagre, J. (2007). Autolytic degradation and microbiological activity in farmed Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during chilled storage. *Food Chemistry*, 104(1), 369-375.
- Barrett, D. H., Eisenberg, M. S., Bender, T. R., Burks, J. M., Hatheway, C. L., Dowell Jr, V. R. (1977). Type A and type B botulism in the North: first reported cases due to toxin other than type E in Alaskan Inuit. *Canadian Medical Association Journal*, 117(5), 483.
- Bean, N. H., Griffin, P. M. (1990). Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973–1987: pathogens, vehicles, and trends. *Journal of food protection*, 53(9), 804-817.
- Béné, C., Macfadyen, G., Allison, E. H. (2007). *Increasing the contribution of small-scale fisheries to poverty alleviation and food security* (No. 481). Food & Agriculture Org.
- Buitrago, J. D. R., Ramírez, N., Henao, O. A. (2001). Determinación de concentraciones inhibitorias mínimas a algunos antibióticos de las bacterias aisladas de glándula mamaria bovina en San Pedro de los Milagros, Antioquia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 14(2), 143-154.

- Cahill, M.M. (1990). Bacterial flora of fishes: a review. *Microbial Ecology*. 19, 21– 41
- Castro-González, M. I., Miranda-Becerra, D. (2010). El pescado en la dieta del paciente renal: relación fósforo: ácidos grasos n-3. *Rev Invest Clin*, 62(1), 44-53.
- Chu, H., Fierer, N., Lauber, C. L., Caporaso, J. G., Knight, R., Grogan, P. (2010). Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes. *Environmental microbiology*, 12(11), 2998-3006.
- Coward, K., Bromage, N. R., Hibbitt, O., Parrington, J. (2002). Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 12(1), 33-58.
- Dey, I., Buda, C., Wiik, T., Halver, J. E., Farkas, T. (1993). Molecular and structural composition of phospholipid membranes in livers of marine and freshwater fish in relation to temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(16), 7498-7502.
- Dillon, R. M., Patel, T. R. (1992). Listeria in seafoods: a review. *Journal of Food Protection*, 55(12), 1009-1015.
- Duchaud, E., Boussaha, M., Loux, V., Bernardet, J. F., Michel, C., Kerouault, B., ..., Bessieres, P. (2007). Complete genome sequence of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Nature biotechnology*, 25(7), 763-769.
- FAO. 2005. Increasing the contribution of small-scale fisheries to poverty alleviation and food security. *FAO Technical Guidelines for Responsible Fisheries*. No. 10. Rome, FAO. 79 pp.
- Fierer, N., Jackson, R. B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(3), 626-631.
- Forbes, B. A. (2009). *Diagnóstico microbiológico*. Ed. Médica Panamericana.
- Ghaddar, S., Saoud, I. P. (2012). Seasonal changes in phosphorus content of fish tissue as they relate to diets of renal patients. *Journal of Renal Nutrition*, 22(1), 67-71.

- Gilbert, J. A., Field, D., Swift, P., Newbold, L., Oliver, A., Smyth, T., Somerfield, P.J., Huse, S., Joint, I. (2009). The seasonal structure of microbial communities in the Western English Channel. *Environmental microbiology*, 11(12), 3132-3139.
- Gilbert, J. A., Steele, J. A., Caporaso, J. G., Steinbrück, L., Reeder, J., Temperton, B., Huse, S., McHardy, A. C., Knight, Rob., Joint, Ian., Somerfield, P., Fuhrman, J.A. Field, D. (2012). Defining seasonal marine microbial community dynamics. *The ISME journal*, 6(2), 298-308.
- Halver, J. E. (1980). Fish feed technology. RomaFAO/UNDP: *Aquaculture Development and Coordination Programme*.
- Hatai, K., Egusa, S., Nakajima, M., Chikahata, H. (1975). Pseudomonas chlororaphis as a fish pathogen. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 41(11).
- Holt, R.A., Rohovec, J.S., Fryer, J.L. Bacterial cold-water disease. in Bacterial Diseases of Fish (eds. Inglis, V., Roberts, R.J. & Bromage, N.R.) 3–22 (Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1993)
- Ingerslev, H. C., von Gersdorff Jørgensen, L., Strube, M. L., Larsen, N., Dalsgaard, I., Boye, M., Madsen, L. (2014). The development of the gut microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is affected by first feeding and diet type. *Aquaculture*, 424, 24-34.
- Kris-Etherton, P. M., Taylor, D. S., Yu-Poth, S., Huth, P., Moriarty, K., Fishell, V., Hargrove, R. L., Zhao, G., Etherton, T. D. (2000). Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. *The American journal of Clinical Nutrition*, 71(1), 179S-188S.
- Llewellyn, M. S., Boutin, S., Hoseinifar, S. H., Derome, N. (2014). Teleost microbiomes: the state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries. *Frontiers in microbiology*, 5, 207.
- Lozupone, C. A., Knight, R. (2007). Global patterns in bacterial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(27), 11436-11440.
- Madrid, A., Madrid, J. M., Madrid, R. (1999). *El pescado y sus productos derivados*. Ediciones Mundi-Prensa.

- Martín, A., Serrano, S., Santos, A., Marquina, D., Vázquez, C. (2010). Bioluminiscencia bacteriana. *Reduca (Biología)*, 3(5).
- Nayak, S. K. (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*, 41(11), 1553-1573.
- Ostland, V. E., Byrne, P. J., Hoover, G., Ferguson, H. W. (2000). Necrotic myositis of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): proteolytic characteristics of a crude extracellular preparation from *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Fish Diseases*, 23(5), 329-336.
- Otis, E. J. (1984). *Lesions of coldwater disease in steelhead trout (Salmo gairdneri): the role of Cytophaga psychrophila extracellular products* (Doctoral dissertation, University of Rhode Island).
- Patzner, R. A. (2008). Reproductive strategies of fish. In *Fish reproduction* (pp. 325-364). CRC Press.
- Roeselers, G., Mittge, E. K., Stephens, W. Z., Parichy, D. M., Cavanaugh, C. M., Guillemin, K., Rawls, J. F. (2011). Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *The ISME journal*, 5(10), 1595-1608.
- Ruiz, V. H. (2012). Peces: Generalidades sobre su biología y clasificación. Recursos pesqueros del mar de Chile. *Escuela de Ciencias del Mar, Pontificia Universidad de Valparaíso*. Valparaíso, Chile, 255-286.
- Ryder, J., Ababouch, L. (Eds.). (2005). *Fifth World Fish Inspection and Quality Control Congress: 20-22 October 2003, The Hague, Netherlands* (Vol. 1). Food & Agriculture Org.
- Sanz, J. L. A. (2004). *Procesos de cocina*. Editorial Paraninfo.
- Sargent, J. R., Bell, J. G., Bell, M. V., Henderson, R. J., Tocher, D. R., Lahlou, B., Vitiello, P. (1993). *Aquaculture: Fundamental and Applied Research*. EUA: American Geophysical Union.

- Steele, J. A., Countway, P. D., Xia, L., Vigil, P. D., Beman, J. M., Kim, D. Y., ..., Rose, J. M. (2011). Marine bacterial, archaeal and protistan association networks reveal ecological linkages. *The ISME journal*, 5(9), 1414-1425.
- Steffens, W. (1997). Effects of variation in essential fatty acids in fish feeds on nutritive value of freshwater fish for humans. *Aquaculture*, 151(1-4), 97-119.
- Sullam, K. E., Essinger, S. D., Lozupone, C. A., O'Connor, M. P., Rosen, G. L., Knight, R., Kilham S.S., Russell, J. A. (2012). Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta- analysis. *Molecular ecology*, 21(13), 3363-3378.
- Tellería, J. L. (2013). Pérdida de biodiversidad. Causas y consecuencias de la desaparición de las especies. *Memorias de la Real Sociedad Española de Historia Natural*, 10, 13-25.
- Velásquez Paccha, M. J. (2013). *Evaluación del Valor Nutricional de la Tilapia Rja (Oreochromis spp.) en Filetes Procesados por Liofilización* (Bachelor's thesis).
- Wang, A. R., Ran, C., Ringø, E., Zhou, Z. G. (2017). Progress in fish gastrointestinal microbiota research. *Rev. Aquaculture* 1–15.
- Ward, D. R., Hackney, C. A. (2012). *Microbiology of marine food products*. Springer Science & Business Media.
- Wootton, R. J., Smith, C. (2014). *Reproductive biology of teleost fishes*. John Wiley & Sons.
- “Home- Scharlab, S.L. The Lab Sourcing Group”. Revisada el 29 de abril de 2019: <http://www.scharlab.com/>