



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES**

**FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y CIENCIAS  
DEL MAR**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE  
INGENIERÍA PESQUERA**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO  
PESQUERO**

**Identificación de cepas bacterianas cultivables  
presentes en *Scomber japonicus peruanus* salada  
utilizando un fragmento del gen 16S ARNr. Tumbes,  
2018**

PRESENTADO POR:

**Br ISABELI PULACHE ROQUE**

TUMBES, PERÚ

2018



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES**

**FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y CIENCIAS  
DEL MAR**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE  
INGENIERÍA PESQUERA**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO  
PESQUERO**

**Identificación de cepas bacterianas cultivables  
presentes en *Scomber japonicus peruanus* salada  
utilizando un fragmento del gen 16S ARNr. Tumbes,  
2018**

PRESENTADO POR:

**Br ISABELI PULACHE ROQUE**

TUMBES, PERÚ

2018



## **DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD**

Yo, ISABELI PULACHE ROQUE, declaro que los resultados reportados en esta tesis, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo, declaro (hasta donde tengo conocimiento) no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto al que se reconoce como tal a través de citas bibliográficas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, también que, la redacción de esta investigación es producto de nuestro trabajo con la dirección y apoyo de nuestro asesor de investigación y jurado calificador, en cuanto a la concepción y al estilo de la presentación o a la expresión escrita.

---

**Br. ISABELI PULACHE ROQUE**

# ACTA DE REVISIÓN Y DEFENSA DE TESIS

## RESPONSABLES

Br. ISABELI PULACHE ROQUE

---

EJECUTOR

Dr. OSCAR AUGUSTO MENDOZA NEYRA

---

ASESOR

## JURADO DICTAMINADOR

Mg. MAGNO EGO MENDOZA DIOSES

---

PRESIDENTE

Mg. ALBERTO ORDINOLA ZAPATA

---

SECRETARIO

Dr. TESSY PERALTA ORTIZ

---

VOCAL

## **AGRADECIMIENTO**

A DIOS todo poderoso por su amor infinito y por ser mi roca fuerte para cumplir mis metas trazadas.

A mi familia por darme su apoyo incondicional y por ser el motor de mi constante superación.

Al Dr. Oscar A. Mendoza Neyra, por aceptar ser mi asesor, por su generosidad y la oportunidad de recurrir a su experiencia científica en un marco de confianza, afecto, amistad y valiosas sugerencias fundamentales para concretar este trabajo.

A los miembros del jurado: Mg. Ego Mendoza Dioses, Dra. Tessy Peralta Ortiz y al Mg. Alberto Ordinola Zapata por sus aportes y recomendaciones que hicieron posible el logro del presente trabajo. Debo enfatizar un especial agradecimiento al Mg. Alberto Ordinola Zapata y a la Dra. Enedia Vieyra Peña quienes en todo momento estuvieron orientándome para poder realizar la presente investigación.

A mi eterno compañero por su constante apoyo durante la ejecución de mi investigación.

A las Instituciones por su colaboración en el desarrollo de esta tesis: Universidad Nacional de Tumbes e Instituto del Mar del Perú (Imarpe).

A todos los docentes de la Escuela Académica Profesional de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Tumbes.

Quiero decirles a todos ustedes, gracias, ¡MUCHAS GRACIAS, POR SU APOYO!



## **DEDICATORIA**

En memoria a mi amado padre  
Juan Pulache Saavedra y querida  
abuela Isabel Guerrero que desde  
el cielo siempre guían mi camino,  
a mi Madre y hermanos, pilares  
fundamentales en mi vida

## TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
Resumen .....	xiv
Abstract .....	xv
I. INTRODUCCIÓN .....	16
II. ANTECEDENTES .....	18
2.1. Trabajos previos .....	18
2.2. Preservación tradicional del pescado .....	19
2.3. Salado del pescado .....	20
2.4. Caballa ( <i>Scomber japonicus peruanus</i> ) .....	23
2.5. Bacterias presentes en el salado .....	24
2.6. Identificación de bacterias .....	24
2.7. Identificación genómica de bacterias .....	25
2.8. Identificación genómica mediante el gen 16S ARNr .....	25
III. MATERIAL Y MÉTODOS .....	27
3.1. Materiales .....	27
3.2. Métodos .....	28
3.2.1. Ubicación del lugar de ejecución de la investigación .....	28
3.2.2. Obtención de caballa salada .....	29
3.2.3. Determinación de la humedad y cloruros .....	29
3.2.4. Aislamiento de cepas bacterianas .....	31
3.2.5. Bacterias en el músculo de caballa mediante secuenciamiento de un fragmento del gen 16S ARNr .....	32

IV.	RESULTADOS .....	35
	4.1. Análisis del porcentaje de humedad en el músculo de los ejemplares de caballa salada ..	35
	4.2. Análisis del porcentaje de cloruros en el músculo de los ejemplares de caballa salada ..	35
	4.3. Apariencia externa, textura y olor de la caballa salada .....	36
	4.4. Características de las colonias bacterianas aisladas del músculo de caballa salada .....	37
	4.5. Identificación de cepas bacterianas aisladas de caballa salada .....	38
V.	DISCUSIÓN .....	39
VI.	CONCLUSIONES .....	41
VII.	RECOMENDACIONES .....	42
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	43

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Calificación de calidad de la caballa salada de acuerdo a sus características organolépticas .....	23
Tabla 2. Dilución y tipo de siembra durante los meses junio, agosto y setiembre del 2018 en los ejemplares de caballa utilizados en el presente estudio .....	32
Tabla 3. Volumen de reactivos para preparar el <i>mix</i> necesario para una reacción de la PCR .....	33
Tabla 4. Programación del termociclador (basado en Perez 2005) .....	34
Tabla 5. Análisis del porcentaje de humedad presente en el musculo de los ejemplares de caballa provenientes del mercado modelo de Tumbes, en los meses muestreados .....	35
Tabla 6. Concentración de NaCl en el músculo de ejemplares de caballa salada .....	35
Tabla 7. Especies bacterianas identificadas en caballa salada según búsqueda de su secuencia nucleótida en GenBank .....	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Ubicación geográfica del lugar donde se llevó a cabo la investigación, Puerto Pizarro-Tumbes, Perú .....	28
Figura 2. Apariencia externa de ejemplares de caballa salada ..	36
Figura 3. Textura de los ejemplares de caballa salada .....	36
Figura 4. Olor de los ejemplares de caballa salada .....	37

# Identificación de cepas bacterianas cultivables presentes en *Scomber japonicus peruanus* salada utilizando un fragmento del gen 16S ARNr. Tumbes, 2018

Br. Isabeli Pulache Roque<sup>1</sup>

Dr. Oscar Augusto Mendoza Neyra<sup>2</sup>

## RESUMEN

La presente investigación se desarrolló en la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Tumbes, durante los meses de junio agosto y setiembre de 2018. Tuvo como objetivo identificar genómicamente las bacterias cultivables presente en la caballa comercializada en el mercado modelo de Tumbes, utilizando un fragmento del gen 16S ARNr. Inicialmente se aplicó un análisis microbiológico convencional y luego se realizó una PCR, para enviar a secuenciar los fragmentos amplificados. Los resultados encontrados y comparados con la base de datos del Genbank y que estuvieron entre 98 y 100% de similitud fueron: *Staphylococcus* sp., *Halomonas* sp., *Staphylococcus* sp., *Staphylococcus equorum*, *Salinivibrio* sp., *Staphylococcus* sp., *Staphylococcus nepalensis*, *Staphylococcus equorum*, *Salinivibrio* sp., *Staphylococcus equorum*. El promedio de humedad del músculo reportada fue de: Junio (62,73±3,02%), Agosto (62,72±10,34%) y Setiembre (47,71±5,53%); mientras que para el cloruro de sodio fue de: Junio (12,62±4,92%), Agosto (15,31±3,01%), Setiembre (11,87±4,67%). La apariencia externa fue: 36% normal, 50% brillante y 14% pálida. La textura fue: blanda 44%, firme 40% y flácida 16%. El olor fue de: fresco 70% y rancio 30%.

Palabras clave: *Scomber japonicus*, pescado salado, genómica, bacterias.

---

<sup>1</sup> Estudiante de la Escuela Profesional de Ingeniería Pesquera de la Universidad Nacional de Tumbes

<sup>2</sup> Profesor de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Tumbes

Identification of culturable bacterial strains present in salted *Scomber japonicus* peruanus using a fragment of the 16S rRNA gene. Tumbes, 2018

Br. Isabeli Pulache Roque<sup>1</sup>

Dr. Oscar Augusto Mendoza Neyra<sup>2</sup>

## ABSTRACT

The present research was developed in the Faculty of Fishing Engineering and Marine Sciences of the National University of Tumbes, during the months of June, August and September, 2018. Its objective was to genetically identify the culturable bacteria present in the mackerel commercialized in the market model of Tumbes, using a fragment of the gene 16S rRNA. Initially a conventional microbiological analysis was applied and then a PCR was performed, to send the amplified fragments to be sequenced. The results found and compared with the Genbank database and which were between 98 and 100% similarity were: *Staphylococcus* sp., *Halomonas* sp., *Staphylococcus* sp., *Staphylococcus equorum*, *Salinivibrio* sp., *Staphylococcus* sp., *Staphylococcus nepalensis*, *Staphylococcus equorum*, *Salinivibrio* sp., *Staphylococcus equorum*. The muscle moisture average reported was: June (62.73±3.02%), August (62.72±10.34%) y September (47.71±5.53%); while for sodium chloride it was: June (12.62±4.92%), August (15.31±3.01%), September (11.87±4.67%). The external appearance was: 36% normal, 50% bright and 14% pale. The texture was: soft 44%, firm 40% and flaccid 16%. The smell was: fresh 70% and rancid 30%.

Keywords: *Scomber japonicus*, salty fish, genomics, bacteria.

---

<sup>1</sup>Student of the Professional School of Fishing Engineering of the National University of Tumbes

<sup>2</sup>Teacher at the Faculty of Fisheries Engineering and Marine Sciences of the National University of Tumbes

Thesis presented to obtain the professional title of Fisheries Engineer  
National University of Tumbes  
Faculty of Fisheries Engineering and Marine Sciences  
Professional School of Fishing Engineering  
Street Los Ceibos S/N Puerto Pizarro, Tumbes-Perú  
Email: royspu55@gmail.com

## I. INTRODUCCIÓN

*Scomber japonicus peruanus* (Jordan y Hubbs 1925), es un pez cosmopolita conocido con el nombre común de caballa que se localiza, en el Pacífico Americano, y se desembarca en todas las caletas del litoral peruano desde Sechura hacia el sur, siendo la tercera especie más desembarcada en el Perú (INEI 2014). Gran parte de la captura de esta especie se procesa como salado y se comercializa en lugares donde existe fuerte demanda, como en Tumbes, donde además de ser vendida en el mercado local, también se exporta al Ecuador, lugar en el que es muy apreciada. La caballa salada se comercializa sin envasar por lo que está expuesta a diversos agentes contaminantes, tanto físicos, químicos o biológicos (insectos, roedores o microorganismos) de presentarse tales contaminantes el producto deja de ser apto para el consumo humano, según las exigencias de calidad del *Codex Alimentarius* desarrollado por la FAO-OMS (1963).

En pescado salado, se ha reportado la presencia de bacterias como: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp*, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus faecium* (Romero-Jarero, y Negrete-Redondo 2011; Escobar y Hernández. 2012).

*Scomber japonicus peruanus* es la tercera especie más desembarcada en el Perú y se comercializa en gran parte en forma de salado artesanal por lo que está expuesta a múltiples contaminantes biológicos entre ellos las bacterias, algunas de las cuales son patógenas para el ser humano. Este producto es comercializado en Tumbes en forma artesanal y existe el riesgo de que porte bacterias patógenas; sin embargo, hasta la fecha no se había realizado un estudio para determinar que cepas bacterianas se hallan presentes en éste recurso.

En el mercado de abastos y lugares de expendio de productos hidrobiológicos de la ciudad de Tumbes, no existe un adecuado manipuleo y almacenamiento para su posterior venta, de los productos pesqueros entre ellos la caballa. De tal manera que llegue al consumidor, en condiciones saludables que garanticen una



buena calidad. En tal sentido se recomienda hacer un uso adecuado del control organoléptico para asegurar la calidad del producto antes de su proceso y su posterior almacenaje.

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivos los siguientes:

### **Objetivo general**

Identificar las cepas bacterianas cultivables presentes en la caballa comercializadas en el mercado de Tumbes, utilizando un fragmento del gen 16S ARNr.

### **Objetivos específicos**

1. Aislar y cultivar bacterias de caballa (*Scomber japonicus peruanus*) salada comercializada en el mercado de Tumbes.
2. Identificar, utilizando un fragmento del gen 16S ARNr, las bacterias cultivables aisladas de la caballa (*Scomber japonicus peruanus*) salada comercializada en el mercado de Tumbes.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Trabajos previos

Con respecto a la evaluación microbiana halófila en especies saladas, Grau et al. (2003), manifiestan que la caracterización de la microflora halófila contaminante presente en muestras de análisis de pescado seco salado elaborado artesanalmente en el Estado de Sucre, reveló una elevada contaminación microbiana en todas las muestras analizadas ( $5,3 \times 10^6$  UFC/g). Encontrando presencia de *Pseudomonas salinaria* y *Pediococcus halophilus*.

Con respecto al salado de merluza (*Merluccius gayi peruanus*), López y Dávila (2005), compararon tres procedimientos de salado de merluza en pila seca, pila húmeda y deshidratación osmótica al vacío. En las muestras saladas, se determinó la evolución del contenido de sal, el contenido de agua, el recuento de microorganismos aerobios viables, estafilococos, mohos y la actividad de agua. Se encontró que la población de microorganismos decae rápidamente en las muestras tratadas con deshidratación osmótica al vacío. Concluyendo que el salado con la inhibición por la deshidratación osmótica al vacío, se produce dentro de las cinco primeras horas, de 7,83 UFC/g a 4,45 UFC/g, en comparación a las reducciones de 7,6 UFC/g por las técnicas de pila seca y pila húmeda en el mismo período, probablemente por la reducción de la disponibilidad de agua en las muestras saladas. El tratamiento de deshidratación osmótica al vacío incide durante el período de razón constante en la velocidad de destrucción de hongos (0,3183), quintuplicando su efecto comparado al de pila seca (0,065) y al de pila húmeda (0,0693), probablemente, por efecto del vacío, se quintuplica la velocidad de destrucción de estafilococos en pila seca (0,0281) y se duplica la de pila húmeda (0,0732).

Basti et al. (2006) estudiaron productos tradicionales en Irán, pescado salado y ahumado en frío, 28 peces *Alosa kessleri* del mar caspio y 39 carpas plateadas (*Hypophthalmichthys molitrix*) fueron examinados usando pruebas bacterianas estandarizadas, 40 *liza aurata* (lisa) y 20 ahumados de *H. molitrix* comprados de un mercado de pescado fueron también probados. *Listeria monocytogenes*

fueron superiores a  $1 \times 10^2$  UFC/g en 2,6% de las carpas plateadas no ahumadas, en 5,1% de las carpas ahumadas, en 20% de las carpas adquiridas en el mercado y en 10% de *L. aurata*; *Vibrio parahaemolyticus* fue encontrado en 21,4% de *A. kessleri* fresco, en 7,1% de *A. kessleri* ahumado, 5% de carpas plateadas del mercado, en 35% de *L. aurata* fresca y en 50% de *Alosa kessleri* salada. Para 7,5% *L. aurata* fresca y en 2,5% de *Alosa kessleri* salada, *V. parahaemolyticus* fueron mayores que  $1 \times 10^2$  UFC/g *Escherichia coli* y *Salmonella dublin* fueron obtenidas en 30,8% y 2,6% de *H. molitrix*, respectivamente. Ningún coliforme ni *Salmonella* spp. fueron detectados en pescado salado y ahumado. *Staphylococcus aureus* fue mayor que  $1 \times 10^5$  UFC/g fueron obtenidos en 55% de las carpas plateadas obtenidas en el mercado y 10% de *Alosa kessleri* salada. De ello, concluyeron que el consumo de estos peces, ya sea crudo o semicrudo puede contribuir a enfermedades alimenticias en Irán.

## **2.2. Preservación tradicional del pescado**

Balbuena (2014), refiere que el salazonado de los alimentos cárnicos como el pescado es un método de conservación que se ha utilizado desde tiempos remotos como alternativa de conservación durante periodos más prolongados para su consumo. Esta técnica consiste en generar dentro del producto condiciones inadecuadas para el desarrollo de microorganismos. La alta concentración de sal alrededor del pescado dan como resultado una transferencia osmótica, provocando la salida de agua de la carne y la penetración de la sal en el producto, impidiendo por la alta concentración de la misma el crecimiento de la microflora que causa el pudrimiento de pescado.

Los métodos tradicionales de conservación son denominados métodos de curado porque se basan en reducir el contenido de agua aplicando sal, vinagre o compuestos del humo. Los métodos de curados más comunes son: el ahumado, salado y secado. El ahumado es una de las técnicas más antiguas de conservación que permite obtener un producto agradable mediante el humo que se obtiene por combustión de la madera con un limitado aporte de aire.

En general los alimentos son perecederos, por lo que necesitan ciertas condiciones de tratamiento, conservación y manipulación. Su principal causa de deterioro es el ataque por diferentes tipos de microorganismos (bacterias, levaduras y mohos) (Gamboa 2010, citado por Escobar y Hernández 2012). Según Hoffmann (2005) citado por Llaro (2018), manifiesta que el ahumado tiene como propósito el aumento de la capacidad de conservación y la modificación adecuada de la textura, el aspecto (color), el aroma y el sabor de los alimentos. El secado es otro método de conservación que se basa en reducir la humedad mediante un ambiente bajo en humedad relativa, cual puede ser un sencillo secado al aire libre, usando el calor solar para evaporar el agua, y el viento para eliminar dicho vapor, también existen otros métodos más avanzados como el secado al vacío (aprovecha la mayor velocidad de evaporación al estar a bajas presiones), la liofilización que es un secado mediante bajas temperaturas y vacío (Rodríguez 2010).

El proceso de salado tiene como objeto deshidratar o eliminación de agua del músculo del producto. Este proceso es afectado por cambios de estructuras tisulares, viscosidad del fluido del tejido, etc. Una buena preservación va a depender del tiempo tomado para que la concentración de la sal dentro del pescado, llegue al mínimo requerido para detener la autólisis y retardar el crecimiento microbiano (López y Dávila 2005).

### **2.3. Salado del pescado**

Moya (2012) citando a Hall (2001), menciona que el objetivo del proceso del salado es asegurar la penetración de la sal y que sea lo bastante rápido para disminuir la actividad de agua de forma similar en las partes más profundas de la carne.

Conociendo que la sal introducida en el músculo del pescado ayuda a preservarlo de los procesos de descomposición bacteriana, así como del retardo de la actividad enzimática, pero también se conoce que de manera paralela ocurren otras formas de deterioro que no pueden ser controladas por la técnica de salado. La más importante es la oxidación de la grasa, en especial cuando se

trata de especies pelágicas, que se produce cuando el producto salado entra en contacto permanente con el oxígeno del aire, ocurriendo cambios no deseables como el color de la carne y la generación de olores desagradables, así como sabores rancios, que no tan solo dañan las características sensoriales del producto sino que su consumo podría en el largo plazo ser dañino para la salud (León 2011).

El proceso de salado o reducción de la actividad del agua del pescado por extracción, como ocurre en la simple deshidratación, se produce cuando se aumenta la concentración de solutos. La sal común es más efectiva, inocua, corriente y barata que otros solutos alimenticios como el azúcar, incluso aunque esté presente en relativamente pequeñas concentraciones. Sin embargo, la estabilidad por largo tiempo de los productos curados se alcanza únicamente cuando la concentración de sal en la carne alcanza el grado de saturación (Rodríguez y Ramírez 2007).

La sal común (cloruro de sodio), es un compuesto natural que se origina por evaporación del agua de mar. Es un compuesto que se usa como agente preservante, debido a su capacidad de inhibir o eliminar bacterias de descomposición. Sin embargo, al estado natural es húmeda, contiene tierra, bacterias, hongos y una serie de impurezas, que podrían originar a los productos a los cuales es aplicada resulten con deficiente calidad y de corta vida de conservación. Procesadores de pescado salado saben que al ser usada de manera directa el pescado puede adquirir coloraciones rojizas debido a microorganismos halófilos, seguido de olores abombados, con la presencia visible de mohos después de un corto tiempo de almacenamiento (Kristbergsson y Oliveira 2016).

El contenido de sal en los pescados salpresos o salados ligeros no sería suficiente para prevenir el desarrollo de bacterias y por tanto no garantizaría una vida larga en el almacenamiento. Los pescados medianamente salados presentan mejor resistencia al ataque de bacterias y pueden al igual que los salpresos absorber agua y aumentar de peso cuando son remojados para su desalado. Con respecto a la inocuidad en pescados altamente salados, solo las

bacterias y hongos halófilos contenidos en la sal contaminada, podrían constituir un problema técnico (León 2011).

La materia prima utilizada en el Perú para el procesamiento de productos salados es de dos tipos: peces grasos y peces magros. Entre las especies grasas se puede mencionar a caballa, jurel, sardina, bonito, lisa, anchoveta para anchoa, entre otras, siendo los productos resultantes los denominados propiamente salados húmedos; asimismo, entre las especies magras de mayor uso se puede citar a los tiburones (azul, diamante, martillo, zorro, tollos) y la merluza, las cuales están siempre relacionadas con la elaboración de productos salados - secos denominados tipo bacalao (Gallo 2004). Por otro lado, este autor señala que, cualesquiera que sean las especies utilizadas, es muy importante que presenten un alto grado de frescura, como consecuencia del uso adecuado de hielo u otro sistema de conservación, tanto a nivel artesanal como industrial. Si se parte de materia prima en estado de descomposición se obtendrán productos de mala calidad y apariencia, con una consiguiente vida corta de almacenamiento. Por eso que es muy importante mantener la cadena de frío desde que el pescado es capturado, debiendo éste permanecer con hielo una vez llegado a planta y almacenado, si fuera posible, a temperaturas de refrigeración, para ir siendo retirado gradualmente, de acuerdo al avance del proceso.

Para el Instituto Tecnológico Pesquero del Perú (ITP) (2001), los requisitos químicos para un buen salado de pescado son: Humedad (43 a 52%), Cloruro de sodio (18 a 22%). Asimismo, clasifican la calidad de la caballa de acuerdo a sus características organolépticas (tabla 1).

Tabla 1. Calificación de calidad de la caballa salada de acuerdo a sus características organolépticas

FACTOR DE CALIDAD	SALADO CALIDAD "A"	SALADO CALIDAD "B" (Aceptable)	SALADO MALA CALIDAD (No apto)
<b>OLOR</b>	Agradable, propio, característico a pescado salado, típico de su especie, sin olores extraños.	Agradable, propio, característico ha pescado salado, típico de su especie, ligeros olores extraños a rancidez.	Desagradable, fuerte, rancio, pútrido, nauseabundo, en descomposición externa e interna.
<b>APARIENCIA</b>	Piel rugosa, brillante, corte uniforme, sin restos de órganos internos, espinas adheridas, sin escamas.	Piel rugosa, algo opaca, corte uniforme, pequeños residuos de vísceras, espinas no muy adheridas presencia de algunas escamas.	Desagradable sin brillo, corte no uniforme, con restos de órganos internos y sangre, espinas completamente separadas del músculo, con presencia de escamas.
<b>COLOR</b>	Propio agradable a la vista, característico piel grisácea, metálico, músculo pardo claro, algo translucido.	Propio agradable a la vista, característico, piel grisácea metálico algo opaco, músculo pardo, claro u opaco.	Zonas amarillentas en la superficie en la cavidad ventral, músculo pardo oscuro, rojizo.
<b>TEXTURA</b>	Tejido muscular muy firme y fuertemente adherido al tejido óseo.	Tejido muscular muy firme y fuertemente adherido al tejido óseo.	Tejido muscular muy blanco, pastoso, desprendimiento muy fácil del músculo.
<b>SABOR (PESCADO SALADO)</b>	Agradable, característico a mar y ligeramente salado	Agradable característico a mar ligeramente salado.	Desagradable, rancio, picante y podrido

#### 2.4. Caballa (*Scomber japonicus peruanus*)

La caballa es una especie pelágica, de cuerpo fusiforme e hidrodinámico. Su coloración en el dorso es verde-botella y está ornamentado con muchas líneas gruesas, onduladas y verticales formando dibujos caprichosos. Viven en ambientes relativamente cálidos, con rangos de temperatura del agua que oscilan entre 14 °C y 23 °C, salinidad entre 34,80 ‰ y 35,25 ‰, oxígeno disuelto entre 2,0 mg/L a 6,0 mg/L, pero prefiere temperaturas de 15 °C a 19 °C y salinidades de 34,9 ‰ a 35,2 ‰. En el Perú se distribuyen a lo largo de toda la costa sobrepasando las 100 millas marinas de distancia a la costa, limitada por el frente de penetración de aguas oceánicas y/o por las isothermas que limitan esas masas de agua. Es uno de los peces que se procesa con mayor frecuencia como salado, pero este procesamiento se da en forma artesanal por lo que posiblemente sea frecuente encontrar en éste bacterias que puedan deteriorarlo o que puedan ser patógenas para el consumidor (León 2011).

## **2.5. Bacterias presentes en el salado**

La alteración de los productos salados se debe casi exclusivamente al crecimiento bacteriano. Existen bacterias halotolerantes así como halófilas que se desarrollan en los productos salados, el predominio de determinado grupo de bacterias depende de varios aspectos tales como del pH, temperatura, presión, oxígeno; y se sabe que la principal fuente de contaminación bacteriana proviene de la misma sal utilizada en el proceso. Las bacterias halófitas tienen propiedades proteolíticas y generan olores desagradables, ablandamiento de la carne con lo que el producto es rechazado (Grau et al. 2003).

Por su parte Escobar y Hernández (2012) mencionen en su investigación sobre Análisis de bacterias patógenas en Sardina Salada-Seca, con base a los niveles de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp*, *Escherichia coli* detectados en el proceso artesanal de la “sardinas” la cantidad de muestras superan el límite máximo permisible.

## **2.6. Identificación de bacterias**

Ordinola y Peralta (2014), refieren que las técnicas de identificación de bacterias han ido evolucionando con el tiempo, y que actualmente se cuenta con tres alternativas principales para realizarla, los cuales son métodos de identificación bioquímica, genómica y mediante perfiles peptídicos. La identificación bioquímica de bacterias se basa en la identificación de los productos bioquímicos resultado del metabolismo de las bacterias. Existen muchas pruebas que implican generalmente la observación del cambio que producen en un sustrato las enzimas de la bacteria, este cambio normalmente es visualizado por el viraje de coloración de un indicador, por la producción de gas, por el crecimiento bacteriano al aprovechar el sustrato entre otras; la identificación mediante perfiles peptídicos, es una técnica muy reciente que usa la espectrometría de masas para la identificación de proteínas (gemelamente ribosomales) que permiten distinguir cepas bacterianas distintas, esta técnica aprovecha el poco tiempo necesario para obtener resultados con el



espectrómetro de masas: la identificación genómica sin embargo, es a la fecha la más precisa contra la cual se compara el resto de métodos.

## **2.7. Identificación genómica de bacterias**

La identificación genómica permite una mayor precisión al comparar los genomas completos de las bacterias (hibridación ADN-ADN); sin embargo; esto es costoso y laborioso, por lo que, no puede usarse rutinariamente en la identificación (Pascual et al. 2010; Janda, and Abbott 2007), es por ello que la comparación de ciertos genes constitutivos (que se expresan en todas las células bacterianas) son los candidatos más habituales para servir como fuente importante en la identificación, dentro de estos últimos el más utilizado actualmente es el gen 16S ARNr (Ordinola y Peralta 2014).

## **2.8. Identificación genómica mediante el gen 16S ARNr**

Rodicio y Mendoza (2004), definen al gen 16S ARNr como una sección del ADN que codifica para un polirribonucleótido de aproximadamente 1500 nt, a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica. La amplificación de un fragmento del gen 16S ARNr se obtiene en un termociclador, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Como sustrato se utiliza normalmente ADN purificado a partir de un cultivo puro bacteriano. Para la amplificación del gen 16S ARNr, las regiones conservadas facilitan el diseño de oligonucleótidos iniciadores (20 nt, aproximadamente). Cuando se pretende amplificar el gen 16S ARNr prácticamente completo, se utilizan iniciadores diseñados en base a secuencias conservadas próximas a los extremos 5' y 3' del gen, que originan amplicones de 1500 pb, aproximadamente.

El estudio del gen 16S ARNr con propósito de identificación requiere además de la PCR, que se encarga de clonar miles de copias del gen en estudio, que

conduce a conocer la secuencia de nucleótidos que lo conforman, dicha secuencia es comparada contra bases de datos genómicas, por ejemplo GenBank que acumulan millones de secuencias de ADN para diferentes genes y organismos a fin de poder identificar la secuencia más similar que se conoce a que especie pertenece (Dulanto 2013).

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. MATERIALES

- 50 ejemplares de *S. japonicus peruanus*
- 500 g de agar TSA
- 100 placas Petri
- 5 asas de col
- 5 asas de barrido
- 1 mechero Bunsen
- 1 caja de guantes
- 10 matraces de 50 ml
- 5 matraces de 1000 ml
- 1 micropipeta con rango de 100 a 1000  $\mu$ l
- 1 micropipeta con rango de 20 a 200  $\mu$ l
- 1 micropipeta con rango de 10 a 100  $\mu$ l
- 1 micropipeta con rango de 0,5 a 10  $\mu$ l
- 500 puntas de 1000  $\mu$ l
- 500 puntas de 200  $\mu$ l
- 500 puntas de 10  $\mu$ l
- 1 caja de mascarillas
- 1 autoclave
- 1 centrifuga de 15 000 rpm
- 1 balanza analítica con precisión de 0,0001 g
- 1 equipo de baño maría
- 1 bureta con soporte universal
- 1 termómetro
- 2 rollos de parafilm
- 1 gotero
- 1 caja de tecnopor
- 10 unidades de papel filtro whatman 41
- 6 rollos de papel aluminio
- 3 galoneras de agua destilada

- 50 microtubos de 1,5 ml
- 50 microtubos de 0,2 ml
- 10 tubos Falcon de 50 ml
- 3 rollos de papel toalla

### 3.2. MÉTODOS

#### 3.2.1. Ubicación del lugar de ejecución de la investigación

La investigación se realizó en los laboratorios de Tecnología Pesquera y Biología Molecular de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar (FIPCM) de la Universidad Nacional de Tumbes (UNTUMBES) ( $3^{\circ}30'17,50''$  S y  $80^{\circ}23'36,35''$  O) y en los laboratorios de Tecnología Pesquera y Biología Molecular del Departamento Académico de Acuicultura de la UNTUMBES (figura 1).



Figura 1. Ubicación geográfica del lugar donde se llevó a cabo la investigación, Puerto Pizarro-Tumbes, Perú

### 3.2.2. Obtención de caballas saladas

Se adquirieron cada 15 días, 10 caballas saladas expandidas en el mercado de Tumbes, hasta completar los 50 ejemplares. Las caballas compradas fueron tomadas al azar, a fin de poder adquirir tantos productos aparentemente buenos así como deteriorados.

Las caballas fueron llevadas en un depósito estéril y aséptico hasta el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar.

### 3.2.3. Determinación de humedad y cloruros

#### A) Humedad

Para la determinación de la humedad, se tomó una muestra del músculo de la caballa de alrededor de 5 g, la cual se pesó en papel aluminio y se llevó a la estufa a 105 °C por un lapso de 3 a 4 h. La muestra fue retirada de la estufa y transferida a un desecador hasta que se enfriara. Se procedió a obtener el porcentaje de humedad mediante la fórmula:

$$\%Humedad = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100$$

Donde:

m<sub>1</sub>: Peso del recipiente de papel aluminio

m<sub>2</sub>: Peso del recipiente + la muestra antes del secado (en gramos)

m<sub>3</sub>: Peso del recipiente + la muestra desecada (en gramos)

#### B) Cloruro de sodio

##### 1) Extracción de una muestra de músculo de pescado:

Con un bisturí se extrajo una muestra de aproximadamente 2 g del músculo del pescado salado. Luego se pesó en una balanza digital y se procedió a anotar el peso correspondiente.

A continuación la muestra anterior fue triturada en un vaso de precipitación agregándosele 100 ml de agua destilada para homogenizar el contenido, tratando de que el músculo se disgregue completamente para que suelte todo el NaCl que contenía, filtrándose el contenido en un filtro whatman, para separar el músculo triturado del líquido. Se dejó decantar por un minuto.

Se tomó 10 ml del líquido y diluyó en 100 ml de agua destilada (dilución 1:10, factor dilución  $f = 1/10$ ), luego con un gotero, se agregó una gota de solución al 1% de fenolftaleína (Si la muestra quedó en color rosa, estuvo lista para titular, caso contrario si quedó transparente se agregó gota a gota solución 0,1 N de NaOH hasta que la solución se tornó ligeramente rosa), acto seguido se agregó una gota de solución al 5% de cromato de potasio, la solución debió tomar un tono amarillo.

## **2) Preparación de la bureta y carga de la solución 0,1 N de $\text{AgNO}_3$ :**

Una bureta se cargó con una solución de 0,1 N de  $\text{AgNO}_3$ , hasta un valor exacto en la escala de la bureta, anotándose este valor como el volumen inicial ( $V_i$ ).

## **3) Titulación del NaCl:**

Se colocó el vaso de precipitados con la muestra de NaCl obtenido del músculo del pescado salado (del paso 1). en un soporte universal debajo de la bureta.

Luego con la bureta se agregó gota a gota la solución de  $\text{AgNO}_3$ , observándose primero la formación de un precipitado blanquecino de cloruro de plata ( $\text{AgCl}$ ) y finalmente la titulación terminó al producirse un precipitado color rojo ladrillo de cromato de plata ( $\text{Ag}_2\text{CrO}_4$ ). Anotándose el volumen final de la solución en la escala de la bureta ( $V_f$ ).

El gasto ( $G$ ) se determinó por diferencia entre el volumen final e inicial ( $V_f - V_i$ ).

#### 4) Cálculo de la concentración de NaCl en el músculo de pescado:

Para obtener la concentración de NaCl se utilizó la siguiente fórmula:

$$C_{NaCl} = \frac{G (ml) \times N_{AgNO_3} \times PM_{NaCl} \times 100}{1000 \times W_p(g) \times f}$$

Donde;

$C_{NaCl}$ : Concentración porcentual de NaCl en el músculo del pescado

$G (ml)$ : Gasto en mililitros

$N_{AgNO_3}$ : Normalidad de la solución de nitrato de plata = 0,1 N

$PM_{NaCl}$ : Peso molecular o peso fórmula del cloruro de sodio = 58,5 g

$f$  : Factor de dilución de la solución de cloruro de sodio = 1/10

#### 3.2.4. Aislamiento de cepas bacterianas

De cada caballa se extrajo una muestra entre 0,5 g y 1 g de músculo, se colocó cada muestra en un tubo falcon de 15 ml previamente esterilizado, las muestras se homogenizaron utilizando un macerador metálico estéril, se agregó 5 ml de solución salina 10%. Los pesos de las muestras de músculo sembrados directamente se observan en la tabla 2. A partir de esta mezcla y sin realizar diluciones, se sembraron por barrido inóculos de 100 µl en placas Petri con TSA y se dejó incubar a temperatura ambiente por 24 horas, una vez obtenidas las colonias se tomó una muestra de cada colonia formada y se volvió a sembrar en placas con agar TSA nuevamente a fin de obtener una cepa bacteriana purificada.

Una vez obtenidas las cepas purificadas se guardaron en medio sólido (TSA) para posteriormente poder realizar la extracción de ADN de las diferentes cepas que se han obtenido.

Tabla 2. Muestra sembrada durante los meses de junio, agosto y setiembre del 2018 en los ejemplares de caballa utilizados en el presente estudio.

<b>Mes</b>	<b>Ejemplares</b>	<b>Peso muestra(g)</b>
Junio	15	0,952 a 0,9763
Agosto	20	0,45 a 0,58
Setiembre	15	0,0509 a 0,0575

### **3.2.5. Bacterias en el músculo de caballa mediante secuenciamiento de un fragmento del gen 16S ARNr**

#### **1) Extracción del ADN:**

Se realizó siguiendo el protocolo de extracción de ADN por ebullición y que consistió en:

Se tomó una placa Petri la que se cultivó en TSA con 15% de NaCl, una cepa bacteriana aislada de la caballa, la que se dejó crecer por 72 h. Se tomó un microtubo de centrifuga y se taró, luego se retiró las colonias bacterianas de la placa petri y se transfirieron al tubo, hasta que se obtuvo una masa de colonias con peso entre 14 a 20 mg. Se añadió al microtubo, 800 µl de solución fisiológica (0,85% de NaCl) y se suspendió las colonias bacterianas en la misma. Se centrifugó a 10 000 rpm por 2 min, luego se retiró el sobrenadante invirtiendo el microtubo. A continuación se añadió al microtubo, 500 µl de solución de buffer de fosfato salino (PBS) 1X, nuevamente se resuspendió las colonias en dicha solución, posteriormente se llevó a centrifugación a 10 000 rpm por 2 min retirándose el sobrenadante por inversión del microtubo. Posteriormente se añadió 200 µl de solución de tris EDTA (TE) 1X, nuevamente se resuspendió las colonias en dicha solución para lo cual se hizo uso de un vórtex. El microtubo fue llevado a baño maría a temperatura de ebullición (95 a 100 °C) por 10 min, luego se colocó en congelación a -20 °C por 5 min. El microtubo se llevó a centrifugación a 10 000 rpm por 2 min. Finalmente, se tomó 10 µl del



sobrenadante y se llevó a un nuevo microtubo de centrifuga y se le añadió 90 µl de agua ultra pura. Este microtubo fue llevado a congelación a -20 °C en un congelador.

## 2) Amplificación del fragmento del gen 16S ARNr

Se utilizaron como *primers* para la amplificación del gen 16S ARNr, los empleados por Pérez (2005) que produjeron un amplicón de alrededor de 1465 pb de tamaño, los cuales fueron:

*Primer forward*: 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC-3').

*Primer reverse*: 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3').

La amplificación se realizó preparando una solución *mix* para realizar la reacción de PCR, teniendo en cuenta el número de cepas bacterianas a las cuales se les extrajo el ADN. A estos se adicionó una reacción más para el control negativo y otra para el control positivo. El volumen de *mix* (mezcla de reactivos) para realizar la amplificación se obtuvo multiplicando el número de reacciones antes calculado por los volúmenes de reactivos que se especifican en la tabla 3.

Tabla 3. Volumen de reactivos para preparar el *mix* necesario para una reacción de la PCR

Reactivo	Volumen(µl)
Agua ultra pura	8,25
Solución buffer 2X premix GeneOne (incluye dNTPs, pero no incluye MgCl <sub>2</sub> ) cat N° S113	12,50
MgCl <sub>2</sub> (10 mM)	2,50
<i>Primer forward</i> 27F	0,50
<i>Primer reverse</i> 1492R	0,50
<i>Taq</i> polimerasa (5 U/ µl)	0,25
<b>Total</b>	<b>24,50</b>

La amplificación del ADN se realizó en un termociclador programado como se aprecia en la tabla 4:

Tabla 4. Programación del termociclador (basado en Pérez 2005)

<b>Fase</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Número de ciclos</b>
Pre desnaturalización	94	1 min	1
Amplificación			30
Desnaturalización	94	30 s	
Hibridación	50	40 s	
Polimerización	68	30 s	
Polimerización final	68	7 min	1

Luego de haber concluido la etapa de amplificación, extrajeron los microtubos de 0,2 ml del termociclador.

Se preparó gel de agarosa al 2%, para lo cual se añadió 2 g de agarosa en 100 ml de buffer de tris, ácido acético y EDTA (TAE) a una concentración 1X (24,2 g de tris, 5,71 ml ácido glacial acético y 3,72 g de EDTA en 100 ml de agua ultra pura), a esta mezcla se agregó 5 µl de bromuro de etidio.

El gel de agarosa fue colocado en la cubeta del equipo de electroforesis que contenía alrededor de 1000 ml de TAE 1X.

Se preparó los amplicones para la migración mezclando 1 µl de tampón de depósito y 9 µl de cada amplicón. Los amplicones así preparados fueron depositados en cada uno de los pozos del gel. También se colocó en uno de los pozos un marcador de peso molecular de 3000 pb.

Se encendió el equipo de electroforesis y se permitió migrar al ADN a 68 V durante 40 a 45 min.

Luego de este lapso, los geles fueron colocados en un transiluminador UV, y se realizaron fotografías digitales del mismo, para determinar si la amplificación del fragmento del gen de interés fue exitosa.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Análisis del porcentaje de humedad en el músculo de los ejemplares de caballa salada

La humedad promedio del músculo de los ejemplares de caballa se muestra en la tabla 1, teniendo un mínimo de 32,13% y un máximo de 70,94 %.

Tabla 5. Análisis del porcentaje de humedad presente en el musculo de los ejemplares de caballa provenientes del mercado modelo de Tumbes, en los meses muestreados.

Mes de muestreo	N° de ejemplares	Humedad (%) (Promedio±DS)
Junio	15	62,73±3,02
Agosto	20	62,72±10,34
Setiembre	15	47,71±5,53

### 4.2. Análisis del porcentaje de cloruros en el músculo de los ejemplares de caballa salada

Los cloruros presentes en el músculo de los ejemplares de caballa se muestran en la tabla 2: los valores promedio de cloruro de sodio en los ejemplares estuvieron entre 11,87% y 15,31%, con un rango de concentraciones entre 5% y 25,5%.

Tabla 6. Concentración de NaCl en el músculo de ejemplares de caballa salada

Mes de muestreo	N° de ejemplares	Porcentaje de NaCl (%) (Promedio±DS)
Junio	15	12,62±4,92
Agosto	20	15,31±3,01
Setiembre	15	11,87±4,67

### 4.3. Apariencia externa, textura y olor de la caballa salada

La apariencia externa de las caballas se muestra en la figura 2, un 36% de los ejemplares mostraron una apariencia normal, mate y sin características aceitosas; sin embargo el 50% de los ejemplares mostraron una apariencia brillante la misma que se produce por la presencia de grasas o aceites en su superficie. Finalmente un porcentaje menor (14%) mostró una apariencia pálida con coloración opaca y deslucida (figura 2).

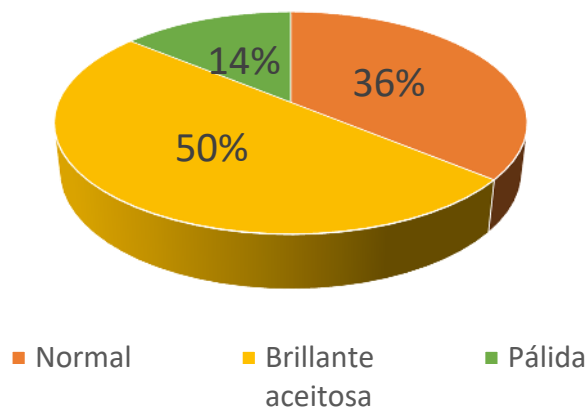


Figura 2. Apariencia externa de ejemplares de caballa salada.

La textura de los ejemplares analizados se mostró mayormente blanda (44%), seguida de firme (40%) y en menor proporción flácida (16%) (figura 3).

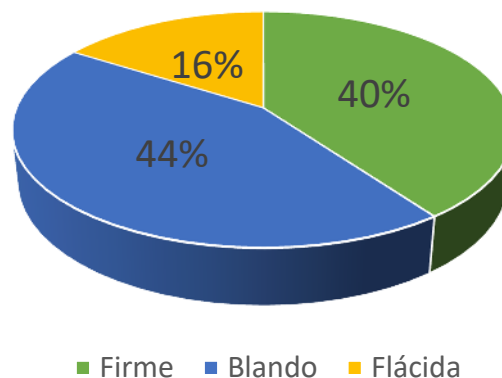


Figura 3. Textura de los ejemplares de caballa salada.

En cuanto al olor de los ejemplares de caballa salada, en su mayoría se mostraron fresco (70%) y en menor proporción rancio (30%) (figura 4).

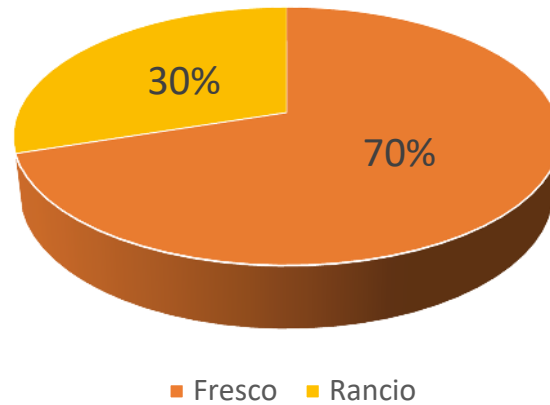


Figura 4. Olor de los ejemplares de caballa salada.

#### **4.4. Características de las colonias bacterianas aisladas del músculo de caballa salada**

Se extrajo 100 UFC de 50 ejemplares durante los meses junio, agosto y setiembre, observándose las siguientes características: tuvieron forma circular, color crema y crema oscuro con un diámetro de 0,5 a 4,0 mm, esto indica que las colonias posiblemente correspondieron a un número reducido de cepas bacterianas.

#### 4.5. Identificación de cepas bacterianas aisladas de caballa salada

En la tabla 7. se muestra las especies de las cepas bacterianas aisladas de caballa, mismas que pudieron ser identificadas mediante búsqueda de secuencias similares en la base de datos GenBank, el criterio para identificar la cepa a nivel de especie, fue que la identidad de la secuencia encontrada fuera al menos de 99%; mientras que para identificar a nivel de género, que tenga al menos una identidad de 97%; debido a estos criterios, de las 13 cepas de las que fue posible obtener secuencias de ADN, tres no pudieron ser identificadas pues su porcentaje de identidad fue muy bajo (de 81,82 a 93,85%). Las cepas que fueron posibles de identificar pertenecieron a sólo tres géneros: *Staphylococcus* (siete cepas), *Salinivibrio* (dos cepas) y *Halomonas* (una cepa). Sólo cuatro cepas pudieron ser identificadas a nivel de especie, todas ellas del género *Staphylococcus*, siendo ellas: *S. equorum* (tres cepas) y *S. nepalensis* (una cepa).

Tabla 7. Especies bacterianas identificadas en caballa salada según búsqueda de su secuencia nucleótida en GenBank

Cepa	Especie identificada	Secuencia más similar en GenBank				
		Especie	Cobertura (%)	Identidad (%)	EValue	Nº Acceso GenBank
3	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus equorum</i>	99	97,43	0,0E+00	MG598457.1
4	<i>Halomonas</i> sp.	<i>Halomonas</i> sp.	98	97,06	0,0E+00	MK256716.1
5	No identificada	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>vallismortis</i>	39	93,85	3,0E-68	AB617566.1
6	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.	100	99,73	0,0E+00	MK534048.1
8	<i>Staphylococcus equorum</i>	<i>Staphylococcus equorum</i>	100	100,00	0,0E+00	MK696401.1
9	No identificada	<i>Salinivibrio</i> sp.	100	90,26	0,0E+00	MK622852.1
10	<i>Salinivibrio</i> sp.	<i>Salinivibrio</i> sp.	100	100,00	0,0E+00	MK070917.1
11	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.	100	99,64	0,0E+00	MK534048.1
12	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	100	99,47	0,0E+00	MK602316.1
13	<i>Staphylococcus equorum</i>	<i>Staphylococcus equorum</i>	100	99,47	0,0E+00	MK696401.1
14	<i>Salinivibrio</i> sp.	<i>Salinivibrio</i> sp.	100	99,52	0,0E+00	MK070915.1
15	<i>Staphylococcus equorum</i>	<i>Staphylococcus equorum</i>	99	100	0,0E+00	NR_027520.1
16	No identificada	<i>Staphylococcus sciuri</i>	92	81,82	4E-148	CP020377.1

## V. DISCUSIÓN

Las cepas bacterianas que fueron identificadas mediante secuenciación y búsqueda en la base de datos Genbank correspondieron a géneros y especies reportados previamente como flora bacteriana halofila, como: *Staphylococcus* sp., *Staphylococcus nepalensis*, *Staphylococcus equorum*, *Salinivibrio* sp. y *Halomonas* sp. Zhang et al. (2015) y Guan, Cho and Lee (2011) han reportado presencia de varias cepas de *Staphylococcus* sp., entre ellas *S. nepalensis* y *S. equorum* en corvinas saladas y fermentadas en China así como en mariscos salados en Corea, siendo por tanto especies que forman parte de alimentos con alto contenido de sal. Adicionalmente ITP (2001) señala en su guía de calidad de caballa salada que las bacterias antes indicadas forman parte de la flora de este producto. Por su parte Jong-Hoon, Sojeong, and Do-Won (2018) mencionan que en alimentos con alto contenido de sal (30% (p/p)) fermentados identificaron *Staphylococcus equorum* como una especie dominante.

Por otra parte, *Halomonas* sp. ha sido reportada por Guan, Cho and Lee (2011) como parte de la flora bacteriana de mariscos salados en Corea, mientras que *Salinivibrio* sp. ha sido reportada por López (2017) como flora bacteriana de productos de pescado salado, así también, López-Hermoso et al. (2018) precisa que *Salinivibrio* es un género de bacterias capaces de vivir en concentraciones de NaCl de 0,5 a 20%, lo que le faculta a desarrollarse en ambientes salobres e hipersalinos y en carnes saladas. En resumen todas las especies bacterianas identificadas en esta investigación corresponden a especies presentes en productos con alto contenido de sal.

Para la presente investigación, la humedad estuvo entre  $47,7 \pm 5,53\%$  en setiembre y  $62,73 \pm 3,02\%$  en agosto, coincidiendo con lo que menciona ITP (2001), quien refiere que un buen pescado salado debe contener entre 45% a 52% de humedad. En el caso de este trabajo solo 15 de los 50 ejemplares analizados (30%) estuvieron dentro del rango manifestado por el ITP (2001), con lo que el 70% restante no tuvieron una humedad adecuada lo que hace que dichos productos reduzcan su vida en anaquel.

En el presente trabajo la concentración de cloruro de sodio en el músculo de caballa salada estuvo en un rango de  $11,87 \pm 4,67\%$  y  $15,31 \pm 3,01\%$ , valores inferiores a lo recomendado el ITP (2001) que menciona que un buen pescado salado debe contener entre 18 a 22% de cloruro de sodio. Se difiere con Spergser et al. (2003), quienes manifiestan que a 15% de NaCl, no hay crecimiento de *Staphylococcus nepalensis*, mientras que hasta un 10% si lo hay.

La apariencia de los ejemplares usados en el experimento, tuvo una clasificación de: normal 36%, brillante aceitosa 50% y pálida 14%, coincidiendo con la clasificación: calidad B, según lo reportado por el ITP (2001) quienes indican lo siguiente: piel rugosa, algo opaca, corte uniforme, pequeños residuos de vísceras, espinas no muy adheridas presencia de algunas escamas.

La textura del músculo de los ejemplares de caballa utilizados en la presente investigación, tuvieron las siguientes características: textura blanda 44%, textura firme 40% y 16% textura flácida; concordando con la calidad B con lo reportado por el ITP (2001), quien menciona una textura: tejido muscular muy firme y fuertemente adherido al tejido óseo.

En lo que refiere al olor de los ejemplares de caballa usados en el experimento, presentaron un olor a fresco 70% y un olor rancio 30%; coincidiendo con la clasificación B del ITP (2001), quien menciona lo siguiente: agradable, propio, característico a pescado salado, típico de su especie, ligeros olores extraños a rancidez.



## VI. CONCLUSIONES

1. Las cepas bacterianas que se identificaron mediante secuenciación de un fragmento del gen 16S ARNr y búsqueda en la base de datos Genbank correspondieron a las especies: *Staphylococcus* sp., *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus nepalensis*., *Salinivibrio* sp., y *Halomonas*
2. El promedio de humedad reportada de los ejemplares de caballa salada analizados fue de: Junio ( $62,73 \pm 3,02\%$ ), Agosto ( $62,72 \pm 10,34\%$ ) y Setiembre ( $47,71 \pm 5,53\%$ ); mientras que para el cloruro de sodio fue de: Junio ( $12,62 \pm 4,92\%$ ), Agosto ( $15,31 \pm 3,01\%$ ), Setiembre ( $11,87 \pm 4,67\%$ ), coincidiendo con lo reportado por el ITP (2001).
3. La apariencia externa de las caballas que se usaron en el experimento fue: 36% apariencia normal, el 50% brillante aceitosa y 14% pálida.
4. La textura de los ejemplares de caballa analizados fue: blanda 44%, firme 40% y flácida 16%.
5. El olor de los ejemplares de caballa salada analizados fue: fresco 70% y rancio 30%.

## **VII. RECOMENDACIONES**

1. Hacer una evaluación metagenómica de la flora bacteriana de la caballa fresca para comparar cómo cambia dicha flora luego del proceso de salado.
2. Evaluar metagenómicamente las bacterias de otros recursos pesqueros salados que se comercializan en el mercado modelo de Tumbes.
3. Evaluar cuantitativamente la flora bacteriana indicando los límites permisibles para considerar este producto inocuo.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Balbuena, E. D (Coord.). 2014. *Manual básico sobre procesamiento e inocuidad de productos de la acuicultura*. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Plan Nacional del desarrollo de la Acuicultura Sostenible del Paraguay.
- Basti, A. A., A. Misaghi, T. Z. Salehi, A. Kamkar. 2006. "Bacterial pathogens in fresh, smoked and salted Iranian fish". *Food Control* 17(3): 183-188. ISSN 0956-7135, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.10.001>.
- Dulanto, J. R. 2013. *Identificación rápida de especies del género Vibrio asociados con el cultivo de "langostino blanco" Litopenaeus vannamei por amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)*. Tesis de Biólogo con mención en Hidrobiología y Pesquería, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/3432/1/dulanto\\_gj.pdf](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/3432/1/dulanto_gj.pdf)
- Escobar, K. E. y C. Hernández. 2012. Análisis de bacterias patógenas en Sardina Salada-Seca (Orden Clupeiformes) procesada artesanalmente en la Bahía de Jiquilisco. Para optar al grado de Licenciatura en Biología Universidad de El Salvador Facultad de Ciencias Naturales y Matemática Escuela de Biología.
- FAO-OMS (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura–Organización Mundial de la Salud). 1963. Codex alimentarius. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-home/es/>
- Gallo, M. 2004. Procesamiento de productos pesqueros salados en el Perú. Seminario Virtual de ciencias del Mar OANNES.
- Grau, C.; L. Elguezabal; O. Vallenilla y A. Zerpel. 2003. "Evaluación de la Flora Microbiana Halófila contaminante del pescado Seco-salado elaborado en el estado Sucre". Instituto Universitario de Tecnología de Cumaná, Venezuela. *Rev. Cient. FCV-LUZ*, Vol. 13 N° 4, 319-325.
- Guan, L., K. H. Cho, and J.-H. Lee. 2011. "Analysis of the Cultivable Bacterial Community in Jeotgal, a Korean Salted and Fermented Seafood, and Identification of Its Dominant Bacteria". *Food Microbiology* 28 (1): 101-113. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.09.001>.
- INEI (Instituto Nacional de Estadística e Informática). 2014. Compendio Estadístico Perú 2014. Lima, Perú: INEI. [https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones\\_digitales/Est/Lib1173/cap13/cap13.pdf](https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1173/cap13/cap13.pdf).
- ITP (Instituto Tecnológico Pesquero del Perú). 2001. *Guía para la instalación y operación de establecimientos dedicados al salado del pescado*.

- Janda, J. M. and S. L. Abbott. 2007. "16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls". *Journal of Clinical Microbiology* 45(9):2761 - 2764. <http://jcm.asm.org/content/45/9/2761.full.pdf>
- Jong-Hoon, L., H. Sojeong, and J. Do-Won. 2018. Genomic insights into *Staphylococcus equorum* KS1039 as a potential starter culture for the fermentation of high-salt foods. *BMC Genomics*, 19:136. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4532-1>.
- Kristbergsson, K. y J. Oliveira. 2016. *Traditional Foods: General and Consumer Aspects*. New York, USA: Springer Science+Business Media LLC. <https://books.google.com.pe/books?isbn=1489976485>.
- León, C. E. 2011. *Muestreo estacional del contenido graso en músculos de "caballa" *Scomber japonicus*, "jurel" *Trachurus picturatus murphy*, "lorca" *Sciaena deliciosa* y "machete" *Ethmidium maculatum chilcae**. Tesis para obtener el grado de Biología, Universidad Nacional del Callao.
- Llaro Rubiños, J. 2018. *Elaboración de trozos de bonito (*Sarda chiliensis chiliensis*) salados, deshidratados, ahumados y envasado al vacío*. Tesis para optar el título de Ingeniero Pesquero. Universidad Nacional Agraria La Molina Facultad de Pesquería.
- López, C. 2017. *Análisis filogenético y genómico del género *Salinivibrio**. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla. [https://idus.us.es/xmlui/bitstream/handle/11441/64791/Tesis\\_CLH\\_deposito.pdf?sequence=4](https://idus.us.es/xmlui/bitstream/handle/11441/64791/Tesis_CLH_deposito.pdf?sequence=4)
- López-Hermoso, C., R. R. de la Haba, C. Sánchez-Porro, and A. Ventosa. 2018. "Salinivibrio Kushneri Sp. Nov., a Moderately Halophilic Bacterium Isolated from Salterns". *Systematic and Applied Microbiology* 41 (3): 159-66. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.12.001>.
- López, L. y L. Dávila. 2005. "Salado de merluza por pila seca, húmeda y por deshidratación osmótica a vacío (*Merluccius gayi peruanus*)". *Rev. de la Facultad de Ingeniería Industrial* (8) 2: 7-14. <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/idata/article/view/6173/5363>.
- Moya Inguil, L. 2012. *Evaluación de la estabilidad oxidativa de pescado seco, salado de las especies Paco (*Piaractus Brachypomus*) y Gamitana (*Colossoma Macropomum*)*. Tesis Para optar el Título de Ingeniera en Industrias Alimentarias. Universidad Nacional Agraria de la Selva Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias.
- Ordinola, A. y T. Peralta. 2014. Identificación bioquímica, genómica y perfil peptídico usando MALDI TOF/TOF de *Vibrio* spp. aislados de *Litopenaeus vannamei* en Tumbes. 2014. Proyecto de investigación docente, Universidad Nacional de Tumbes.

- Pascual, J., M. C. Maciá, D. R. Arahal, E. Garay and M. J. Pujalte. 2010. Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB* and *toxR* genes *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60:154-165 <http://ijsb.sgmjournals.org/content/60/1/154.full.pdf+html>
- Perez, L. M. 2005. *Variabilidad genética de cepas nativas de Azospirillum brasilense mediante análisis tipo PCR-RFLP del DNA 16S ribosomal*. Tesis de Maestro en Biotecnología Genómica. Instituto Politécnico Nacional. Reynosa, México.
- Rodicio, M. y M. Mendoza. 2004. "Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: Principles, methods and applications in clinical microbiology". *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 22(4): 238-45.
- Rodríguez, M. A. 2010. *Conservas de pescado y sus derivados*. Cali, Colombia: Universidad del Valle.
- Rodríguez, M. y J. Ramírez. 2007. *Manejo de sólidos y fluidos*. Universidad del Valle Tecnología en Alimentos. Colombia.
- Romero-Jarero, J. y M. Pilar Negrete-Redondo. 2011. "Presencia de bacterias gram positivas en músculo de pescado con importancia comercial en la zona del Caribe mexicano". *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82: 599-606, 2011.
- Sánchez, L. y H. Arguello. 2006. "Capacidad de bacterias halófilas para capturar sodio in vitro y su posible aplicación en biorremediación en suelos salinos-sódicos". *Nova publicación científica Colombia*. 5(2): 1-114.
- Spergser, J., M. Wieser, M. Täubel, R. A. Rossello-Mora, R. Rosengarten, and B. Hans-Jürgen. 2003. *Staphylococcus nepalensis* sp. Nov., isolated from goats of the Himalayan region. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 2007–2011 DOI 10.1099/ijs.0.02646-0
- Zhang, H. Y. Li, K. Xu, J. Wu, and Z. Dai. 2015. "Microbiological changes and Biodiversity of cultivable indigenous bacteria in Sanbao Larger Yellow Croaker (*Pseudosciaena crocea*), a Chinese Salted and Fermented Seafood". *Journal of Food Science*. doi: 10.1111/1750-3841.12818