

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS HALOTOLERANTES AISLADAS DEL PROCESO DE SALADO-MADURADO DE *Engraulis ringens* (Jenyns, 1842) “ANCHOVETA”

CHARACTERIZATION OF HALOTOLERANT BACTERIA ISOLATED FROM THE MATURE-SALTED PROCESS OF *Engraulis ringens* (Jenyns, 1842) “ANCHOVETA”

Roxana Céspedes-Chombo^{1,2,3}, Amparo Iris Zavaleta³, Susana Calderón-Toledo^{3,4}, Cynthia Esquerre-Huallpa³ y Miguel Albrecht-Ruiz¹

Resumen

El objetivo de esta investigación fue caracterizar bacterias halotolerantes aisladas del proceso de salado-madurado de *Engraulis ringens* provenientes de una empresa pesquera de Chimbote (Perú). Para ello, se recolectaron tres muestras de pescado al inicio y término del proceso. Se aislaron 14 bacterias halotolerantes, 12 aisladas en medio con NaCl al 5% y dos al 10%. Se evaluó su capacidad de crecimiento a temperaturas de 4 a 50 °C y de 2.5 a 12.5% de NaCl, así como su actividad bioquímica con las pruebas de oxidasa, ureasa, indol, utilización de citrato, fermentación de carbohidratos, hidrólisis de almidón, caseína y gelatina, y su sensibilidad a penicilina, cloranfenicol, gentamicina, tetraciclina, rifampicina, sulfametoxazol/trimetoprima, estreptomycin, ácido nalidíxico y novobiocina. El 71% de las cepas creció entre 25 y 44 °C y hasta 10% de NaCl, y presentaron actividad proteolítica y amilolítica. La caracterización molecular se realizó amplificando los genes ribosómicos 16S, los que se secuenciaron y analizaron mediante los programas BioEdit y BLASTn. De esta caracterización se obtuvieron los géneros *Bacillus* (2), *Staphylococcus* (6), *Oceanobacillus* (1), *Salinococcus* (1), *Psychrobacter* (2) y *Sporosarcina* (2). Cinco géneros de bacterias halotolerantes aisladas (*Bacillus*, *Oceanobacillus*, *Salinococcus*, *Psychrobacter* y *Sporosarcina*) fueron de procedencia marina y no patógenas ni indicadoras de contaminación. Al contrario, se identificaron cepas del género *Staphylococcus*, como BH1 que presentó sensibilidad solo al ácido nalidíxico, mientras que BH14 fue resistente a todos los antimicrobianos. Por lo tanto, es necesario implementar medidas que garanticen la inocuidad de las anchoas.

Palabras clave: *Engraulis ringens*, anchoas, bacterias halotolerantes, sensibilidad microbiana, *Staphylococcus*.

Abstract

The objective of this research was to characterize halotolerant bacteria isolated from the ripened salty process of *Engraulis ringens* from a fishing company at Chimbote (Peru). For this, three fish samples were collected at the beginning and at the end of the process. 14 halotolerant bacteria were isolated, 12 from medium containing 5% NaCl and two from 10% NaCl. Its growth capacity was evaluated from 4 to 50 °C and 2.5 to 12.5% NaCl, as well as its biochemical activity by oxidase, urease, indole and citrate tests, carbohydrate fermentation, hydrolysis of starch, casein and gelatin, and sensitivity to penicillin, chloramphenicol, gentamicin, tetracycline, rifampicin, sulfamethoxazole/trimethoprim, streptomycin, nalidixic acid, and novobiocin. 71% of strains grew from 25 to 44 °C, up to 10% NaCl, and showed proteolytic and amylolytic activities. The molecular characterization was carried out by amplification and sequencing the 16S ribosomal genes and these were analyzed using BioEdit and BLASTn programs. From this characterization, the genera *Bacillus* (2), *Staphylococcus* (6), *Oceanobacillus* (1), *Salinococcus* (1), *Psychrobacter* (2) and *Sporosarcina* (2) were obtained. Five genera of isolated halotolerant bacteria (*Bacillus*, *Oceanobacillus*, *Salinococcus*, *Psychrobacter* and *Sporosarcina*) were of marine origin, they are non-pathogenic or no pollution indicators. Conversely, BH1 strain of *Staphylococcus* showed sensitivity only to nalidixic acid, while BH14 was resistant to all antimicrobials. Therefore, it is necessary to implement measures that ensure the safety of anchovies.

Key words: *Engraulis ringens*, anchovies, halotolerant bacteria, microbial sensitivity, *Staphylococcus*.

Introducción

La maduración de anchoas en salazón es una actividad tradicional en países mediterráneos, la cual

utiliza a *Engraulis encrasicolus* (boquerón europeo) como insumo. En las últimas décadas, la captura de esta especie disminuyó por la sobrepesca y el cambio

climático, por lo que fue reemplazada por *E. anchoita* y *E. ringens* (MAGRAMA, 2017).

En Perú, *Engraulis ringens* es la principal especie exportada debido a su buena adaptación, con utilidad en la producción de harina y aceite de pescado (Bouchon *et al.*, 2010); sin embargo, la producción de “anchoas” se ha incrementado en la última década, comercializándola en barriles o como semiconservas. Así, su elaboración tradicional se inicia con el eviscerado del pescado fresco para, después, ser colocado en barriles, alternando capas de pescado y sal, en proporción de 4:1, y ser madurado de 4 a 8 meses.

La calidad se determina por condiciones biológicas intrínsecas del espécimen, tales como tamaño y contenido graso; sin embargo, son determinantes la manipulación del pescado después de su captura y la exposición a temperaturas inadecuadas, por el potencial riesgo de contaminación microbiológico o por histamina, previo al proceso de maduración (Zugarramurdi *et al.*, 2004).

En consecuencia, durante la maduración de las anchoas, se han reportado diferentes poblaciones microbianas con requerimientos salinos obligatorios y facultativos, entre ellas bacterias ácido lácticas, enterobacterias, estafilococos y levaduras, que afectan las características organolépticas y la seguridad alimentaria del producto final (Czerner *et al.*, 2011; Verdos *et al.*, 2018). En esta investigación, se caracterizaron bacterias halotolerantes aisladas del proceso de maduración de anchoveta en salazón, utilizando métodos bacteriológicos y moleculares, con el fin de estimar la calidad microbiológica del producto y aportar sobre su seguridad alimentaria.

Materiales y métodos

Recolección de muestras

Se recolectaron 12 muestras, seis al inicio (marzo) y seis al término (octubre) de un mismo lote del año 2017, del proceso de salado-madurado de la anchoveta (*Engraulis ringens*) proveniente de una empresa pesquera de Chimbote (Perú), las cuales se transportaron en recipientes a 4 °C hasta su análisis antes de las 24 h.

Recuento y aislamiento

Los métodos utilizados fueron los descritos por Kim *et al.* (2015). Para el homogenizado de la muestra se utilizó 50 g de muestra con 450 ml de agua peptonada (0.5% de peptona y NaCl al 3% (p/v)). Se realizó la siembra para el recuento en placas conteniendo agar tripticasa de soya con 5 y 10% de NaCl (w/v) incubadas a 25 °C por 4 días.

Para el aislamiento bacteriano se seleccionaron las colonias morfológicamente diferentes de los muestreos al inicio de la maduración en marzo y a su término en octubre, las que se sembraron en agar tripticasa de soya mediante las condiciones anteriormente mencionadas. A las cepas aisladas se les realizaron las pruebas

fisiológicas, análisis bioquímicos, sensibilidad antimicrobiana y caracterización molecular.

Pruebas fisiológicas

La capacidad de crecimiento de las bacterias a concentraciones de 2.5, 5, 7.5, 10 y 12.5% de NaCl se realizó en caldo agua de sales suplementado con extracto de levadura al 0.5%. La tolerancia a diferentes temperaturas se determinó en agar tripticasa de soya a 4, 25, 35, 44 y 50 °C por uno a cuatro días.

Pruebas bioquímicas

Se realizaron en medios sólidos y líquidos conteniendo NaCl al 5% (w/v) las pruebas de presencia de oxidasa y ureasa, producción de indol, utilización de citrato y fermentación de carbohidratos (glucosa, sacarosa, salicina y lactosa).

Hidrólisis de sustratos

Se realizaron en medios sólidos conteniendo NaCl al 5%. Se determinó la hidrólisis del almidón con la observación de halos claros alrededor del crecimiento bacteriano después de añadir solución de yodo. La hidrólisis de caseína y gelatina en placa se observó por la aparición de un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano.

Sensibilidad microbiana

Como medio base se usó agar Müeller-Hinton conteniendo 5% de NaCl, se inoculó 0.1 ml de la bacteria a una OD₅₅₀ = 0.5. Después, se colocaron los discos de los antimicrobianos, según el método descrito por Rani *et al.* (2017). Los antimicrobianos utilizados fueron: penicilina 10 U/IE, cloranfenicol 30 µg, gentamicina 10 µg, tetraciclina 30 µg, rifampicina 5 µg, sulfametoxazol/trimetoprima 25 µg, estreptomina 10 µg, ácido nalidíxico 30 µg, novobiocina 5 µg. Las placas se incubaron a 35 °C por 24 h. Luego se realizó la lectura de los halos de inhibición y se correlacionó con la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Caracterización molecular

La extracción de ADN genómico se realizó por medio del método de solventes orgánicos (Canales *et al.*, 2014). Los genes ribosómicos 16S se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando los cebadores 16SF:5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3', 16SR:5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'. El volumen de reacción (25 µl) contenía: KCl 50 mM, Tris/HCl 10 mM, tritón X-100 0.1% (v/v), MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 200 µM, cebadores 20 pmoles de c/u, Taq ADN-polimerasa 1U y ADN 50 ng. Los genes amplificados fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 1% con buffer TBE 1X. Después, fueron secuenciados utilizando los cebadores antes mencionados, así como 1100R:5'-AGGGTTGCGCTCGTTG-3'. Para su análisis, se utilizaron los programas BioEdit para alinear las secuencias y BLASTn para buscar similitud con las secuencias de GenBank mediante el algoritmo BLAST.

Resultados y discusión

Recuento y aislamiento de bacterias halotolerantes

Las muestras fueron analizadas mediante el método APHA para bacterias halotolerantes y los recuentos se expresaron en Unidades Formadoras de Colonias (UFC/g). Así, a mayor tiempo de maduración de las anchoas, el recuento de bacterias halotolerantes se incrementó en el medio conteniendo NaCl al 5% (Tabla 1), mientras que al 10% el número fue menor. Según Czerner & Yeannes (2014), durante la primera semana del madurado se produce una pérdida de agua cercana al 25%, así como un aumento del contenido de sal de 15 a 20% y una disminución del pH entre 5.60 a 5.75. Los autores sostienen que estos valores fisicoquímicos permanecen constantes hasta el final del proceso y que favorecen el crecimiento de bacterias halotolerantes y halófilas. Además, durante el madurado, las bacterias halófilas moderadas y extremas se adaptan gradualmente al medio a medida que se incrementa la disponibilidad de nutrientes debido a procesos proteolíticos de las anchoas. Este proceso adaptativo puede explicar el aumento de 220 a 920 UFC/g observado en los medios de cultivo conteniendo NaCl al 5%. Los recuentos de bacterias halotolerantes provenientes de muestras de ambos barriles obtenidos al final del proceso fueron menores a 10^5 UFC/g que, según Gram & Huss (1996), podrían impartir olores desagradables, dependiendo de la biota.

Tabla 1. Recuento de bacterias halotolerantes del proceso de salado-madurado de anchovetas provenientes de Chimbote, año 2017.

N° Barril	marzo		octubre	
	Recuento de bacterias halotolerantes (UFC/g)			
	A	B	A	B
1	220	28	920	72
2	360	31	970	85

Concentración salina del medio de aislamiento: A, NaCl 5%; B, NaCl 10%.

La selección de las bacterias aisladas de las muestras de anchoas en salazón fue realizada bajo el criterio de diferencias morfológicas de las colonias. En consecuencia, se seleccionaron 14 bacterias halotolerantes (BH), de las cuales 12 (BH1, BH2, BH6, BH11, BH12, BH12.2, BH14, BH16, BH17, BH18, BH19 y BH20) fueron aisladas del medio conteniendo 5% de NaCl, y dos cepas (BHE11 y BHE12) fueron aisladas del medio con 10% de NaCl. Así, las 14 cepas seleccionadas fueron purificadas mediante pasajes sucesivos y sujetas a tinción Gram, pruebas bioquímicas y tolerancia salina y térmica.

Pruebas fenotípicas y bioquímicas

Las bacterias seleccionadas mostraron diferente morfología celular. Entre estas, nueve fueron cocos Gram positivos, tres bacilos Gram positivos y dos cocos Gram negativos. Las colonias predominantes fueron de color crema, con forma circular, con borde

definido y con superficie lisa. Además, algunos aislados formaron colonias con bordes irregulares. Las pruebas de oxidasa, ureasa, indol, citrato y fermentación de carbohidratos mostraron perfiles variables (Tabla 2). Ninguna de las cepas aisladas requirió NaCl para crecer, sin embargo, tuvieron tolerancia salina entre 10.0 a 12.5% (Figura 1). Entre estas, 11 cepas crecieron en un amplio rango de salinidad de entre 0 y 10%, y tres mostraron halotolerancia hasta 12.5%. Además, las cepas BH6 y BH16 crecieron entre 25 a 50 °C y BHE11 creció entre 4 y 44 °C.

De las bacterias aisladas, el grupo dominante fue el de los cocos Gram positivos, halotolerantes (64%). Estos hallazgos están en concordancia con lo descrito por Pons *et al.* (2005), quienes reportaron que la población de cocos Gram positivos permaneció constante, alcanzando 10^3 UFC/g durante el proceso de salado-madurado de *E. encrasicolus*. Por el contrario, el recuento bacteriano en medio con 10% de NaCl fue menor.

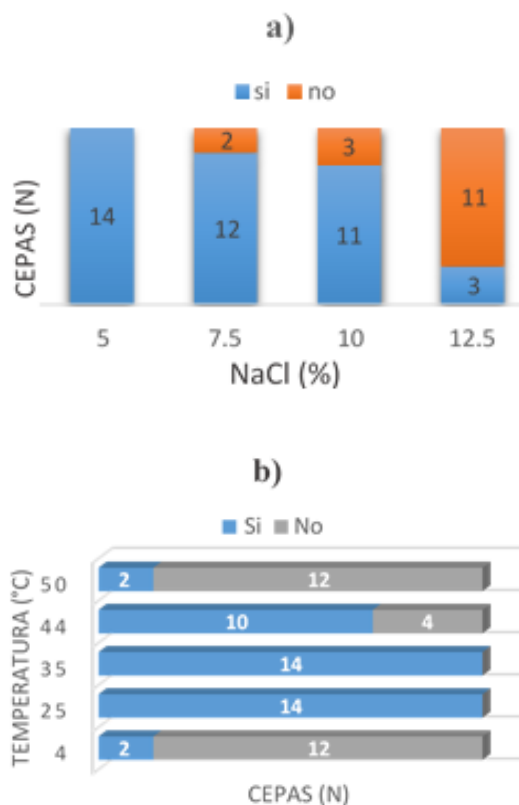


Figura 1. Tolerancia salina (a) y térmica (b) de bacterias halotolerantes aisladas del proceso de salado-madurado de anchovetas provenientes de Chimbote / Perú.

Por otro lado, la actividad enzimática microbiana sobre las fracciones lipídicas y proteicas del pescado contribuyen al desarrollo de las características sensoriales de las anchoas. Por ejemplo, la lipólisis

libera ácidos grasos libres susceptibles a oxidación cuyos productos contribuyen al aroma de las anchoas, mientras que las enzimas proteolíticas generan péptidos y aminoácidos, responsables de la textura característica del producto madurado. Por lo tanto, las actividades lipolítica y proteolítica dependen de la microbiota de las anchoas, la cual influye en las características bioquímicas deseables para el madurado. Sin embargo, las bacterias formadoras de indol están relacionadas con la producción de sabores desagradables; este caso se presentó en 11 bacterias aisladas (Tabla 2). El 57% (8) de las cepas fueron proteolíticas, específicamente siete cocos y un bacilo, ambos Gram positivos. En este aspecto, Czerner & Yeannes (2014) reportaron que las bacterias proteolíticas fueron el 5% del total de bacterias aisladas durante el proceso de madurado de *E. anchoita*. Asimismo, Perez *et al.* (2018) estudiaron las comunidades microbianas de halófilos del madurado de *E. anchoita* y determinaron que el 25% eran proteolíticas.

La formación de indol es una característica bioquímica indeseable de la biota del proceso de salado-madurado de anchoas debido a que este compuesto podría impartir sabor y olores desagradables al producto (Perez *et al.*, 2020). Las pruebas bacteriológicas evidenciaron que esta actividad enzimática fue compartida por el 78% de bacterias aisladas. Sin embargo, no se puede determinar si esta actividad es favorecida bajo las condiciones fisicoquímicas existentes en el proceso productivo. Además, nueve aislados hidrolizaron almidón, de los cuales seis fueron cocos Gram positivos, dos cocos Gram negativos y un bacilo Gram positivo.

En la caracterización bioquímica de las bacterias halotolerantes aisladas, estas mostraron perfiles hidrolíticos y acidificación de azúcares variados y disimiles entre sí, lo cual fue descrito previamente por Tanasupawat *et al.* (2010), quienes reportaron bacterias halotolerantes y halófilas moderadas en salsa de pescado tailandés (“pla-ra”), donde reconocieron seis grupos taxonómicos con mayor presencia de bacilos Gram positivos de características variables en la acidificación de azúcares.

Sensibilidad antimicrobiana

Con respecto a las pruebas antimicrobianas se determinaron ocho perfiles de sensibilidad. La cepa BH14 fue resistente a todos los antimicrobianos y BH1 sensible solo a ácido nalidíxico. Al contrario, las cepas BH12.2 y BH17 fueron sensibles (Tabla 3). Asimismo, en la Figura 2 se observa que 13 cepas presentaron sensibilidad al ácido nalidíxico, así como alta tasa de resistencia a novobiocina. Por tanto, a pesar de la similitud de características morfológicas, existen diferencias excepcionales que brindan al agente antimicrobiano capacidad de inhibir el crecimiento. De igual forma, Elyasifar *et al.* (2019), al identificar bacterias halófilas entre *Bacillus*, *Halobacillus* y *Virgibacillus*, señalaron baja sensibilidad a

gentamicina y resistencia a rifampicina y tetraciclina, como se obtuvo para las cepas BH1, BH6, BH12, BH14, BH19 y BH20, que indican multiresistencia. Por otro lado, Puig *et al.* (2019) determinaron un patrón de multiresistencia para cloranfenicol, eritromicina y tetraciclina de *Staphylococcus* aislado de pescado, comprometiendo pérdidas en la producción y seguridad alimentaria.

Tabla 3. Perfiles de sensibilidad de bacterias halotolerantes aisladas del proceso de salado-madurado de anchoetas provenientes de Chimbote.

Perfil	Antimicrobianos	Cepa sensible*
I	NAL	BH1
II	SMX-TMP, STR, NAL	BH6
III	CLOR, SMX-TMP, NAL	BH19, BH20, BHE12
IV	CLOR, TET, RIF, SMX-TMP, NAL	BHE11, BH11
V	CLOR, TET, RIF, SMX-TMP, NAL, STR	BH12, BH18
VI	CLOR, TET, SMX-TMP, NAL, STR, NOV	BH2
VII	PEN, CLOR, TET, RIF, SMX-TMP, STR, NAL, NOV	BH 16
VIII	PEN, CLOR, GEN, TET, RIF, SMX-TMP, STR, NAL, NOV	BH12.2, BH 17

PEN: penicilina, CLOR: cloranfenicol, GEN: gentamicina, TET: tetraciclina, RIF: rifampicina, SMX-TMP: sulfametoxazol/trimetoprima, STR: estreptomycin, NAL: ácido nalidíxico, NOV: novobiocina.

*. cepa BH14 fue resistente a todos los antimicrobianos analizados.

Caracterización molecular

El análisis de las secuencias parciales de los genes ribosómicos 16S indicó la presencia de los géneros *Staphylococcus*, *Salinicoccus*, *Psychrobacter*, *Bacillus*, *Oceanobacillus* y *Sporosarcina* (Tabla 4). Estudios relacionados con el género *Sporosarcina* indican que la mayoría de especies han sido aisladas de mares o ambientes. Así, presentan un rango óptimo de crecimiento entre 20 a 30 °C y salinidad (< 15% de NaCl) acorde con las características de las cepas BHE12 y BH18 (The Editorial Board, 2015). Por otro lado, *Oceanobacillus* comprende 24 especies y tolera NaCl hasta 21%, con crecimiento óptimo entre 6 a 8%, acorde con BH11 (Liu & Yang, 2014). *Salinicoccus*, otro género identificado, presenta cerca de 70 genes asociados a la osmorregulación, con una salinidad óptima del 10%, similar a BHE11 (Yi-Guang *et al.*, 2008; Hyun *et al.*, 2013). *Psychrobacter* ha sido aislado de diversos ecosistemas donde algunos pueden tolerar hasta 12% de NaCl y 40 °C, lo cual estuvo dentro del rango de crecimiento para las cepas BH17 y BH12.2 (Romanenko *et al.*, 2004). Otro género fue *Staphylococcus*, caracterizado por su alta adaptabilidad a bajas temperaturas debido al engrosamiento de su pared, así como halotolerancia. Esto se debe a que aproximadamente 90 genes regulan el estrés salino con

mecanismos entre engrosamiento de su pared y prolina como osmoprotector (Onyango & Alreshidi, 2018; Das *et al.*, 2020). Estos datos explican el comportamiento de las cepas BH1, BH6, BH12, BH14, BH19 y BH20, que presentaron diferentes perfiles de adaptabilidad a bajas temperaturas y salinidad. No obstante, las cepas BH2 y BH16 identificadas como *Bacillus* sp. demostraron tolerancia a 50 °C ligada a una mayor esporulación como mecanismo de adaptabilidad de este género (Carlin *et al.*, 2010).

Tabla 4. Porcentaje de similitud de la secuencia parcial de los genes ribosómicos 16S de bacterias halotolerantes aisladas del proceso de salado-madurado de anchovetas provenientes de Chimbote.

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

*, cepas bacterianas aisladas al término de la maduración, las restantes a su inicio.

Por tanto, la presencia de cepas de *Staphylococcus* multirresistentes indica la adaptabilidad metabólica, así como la necesidad de no solo controlar el proceso de salado-madurado, sino adoptar nuevas medidas de control antes de su comercialización. Finalmente, la NTP 204.056:2006 (revisada el 2013) para anchoas en salazón y envasadas (INDECOPI, 2013) y la Resolución de SANIPES N° 057-2016-SANIPES-DE (SANIPES, 2016) señalan el control de diversos microorganismos, entre mesófilos y hongos; sin embargo, no contemplan los parámetros permisibles para bacterias halotolerantes, siendo estas importantes por su impacto en la inocuidad alimentaria. Tal es el caso del género *Staphylococcus*, el cual estuvo presente al inicio y término del proceso de salado-madurado de las anchoas. Al respecto, Huss (1997) indica que el pescado puede ser contaminado con *Staphylococcus* a través de manipuladores, utensilios o a partir del ambiente de trabajo. Por ello, es importante considerar el estudio de las bacterias halotolerantes durante el proceso de salazón de las anchoas.

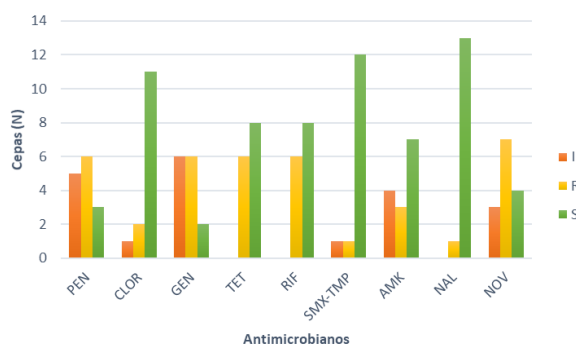
Conclusiones

Del proceso de salado-madurado de anchovetas provenientes de una empresa de anchoas de Chimbote

/ Perú, se aislaron 14 bacterias halotolerantes; estas fueron agrupadas en los géneros *Bacillus* (2), *Staphylococcus* (6), *Salinicoccus* (1), *Oceanobacillus* (1), *Psychrobacter* (2) y *Sporosarcina* (2). La mayoría de bacterias presentaron diferentes actividades enzimáticas, así como tolerancia salina hasta 10% y térmica hasta 44 °C.

Los géneros bacterianos identificados, a excepción de *Staphylococcus*, tienen como hábitats ambientes marinos, no son patógenas y no son indicadores de contaminación, según la regulación de la Comunidad Europea y el FDA.

Las cepas de *Staphylococcus* aisladas presentaron multirresistencia, por lo cual es necesario adoptar medidas de control en el proceso de salado-madurado del pescado.



PEN: penicilina, CLOR: cloranfenicol, GEN: gentamicina, TET: tetraciclina, RIF: rifampicina, SMX-TMP: sulfametoxazol/trimetoprima; STR: estreptomicina, NAL: ácido nalidíxico, NOV: novobiocina. Diámetro del halo S: 21-34 mm, I: 17-20 mm, R: 6-16 mm.

Figura 2. Recuento de bacterias halotolerantes, con sensibilidad antimicrobiana, aisladas del proceso de salado-madurado de anchovetas procedentes de Chimbote / Perú.

Agradecimientos

A FONDECYT-CONCYTEC por el financiamiento otorgado.

Literatura citada

- Bouchon M., Mori J., Peña C., Espinoza P., Hutchings L., Buitrón N., Perea A., Goicochea C. & Messie M. 2010. Biología de la anchoveta peruana, *Engraulis ringens* Jenyns. Boletín IMARPE, 25(1-2): 23-30. <http://biblioimarpe.imarpe.gob.pe/handle/123456789/1099>.
- Canales P.E., Chávez-Hidalgo E.L. & Zavaleta A.I. 2014. Caracterización de bacterias halófilas productoras de amilasas aisladas de las Salinas de San Blas en Junín. Revista Colombiana de Biotecnología, 16(2): 150-157. DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v16n2.43763.

- Carlin F., Brillard J., Broussolle V., Clavel T., Duport C., Jobin M., Guinebrière M., Auger S., Sorokine A. & Nguyen-Thé C. 2010. Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. *Food Research International*, 43(7): 1885-1894. DOI: 10.1016/j.foodres.2009.10.024.
- Czerner M. & Yeannes M.I. 2014. Bacterial contribution to salted anchovy (*Engraulis anchoita* Hubbs and Marinini, 1935) ripening process. *J. Aquat. Food Prod. Technol.*, 23(2): 102-114. DOI: 10.1080/10498850.2012.697537.
- Czerner M., Tomás M.C. & Yeannes M.I. 2011. Ripening of salted anchovy (*Engraulis anchoita*): development of lipid oxidation, colour and other sensorial characteristics. *J. Sci. Food Agric.*, 91(4): 609-615. DOI: 10.1002/jsfa.4221.
- Das P., Behera B., Chatterjee S., Das B.K. & Mohapatra T. 2020. *De novo* transcriptome analysis of halotolerant bacterium *Staphylococcus* sp. strain P-TSB-70 isolated from East coast of India: In search of salt stress tolerant genes. *PLOS ONE*, 15: 1-28. DOI: 10.1371/journal.pone.0228199.
- Elyasifar B., Jafari S., Hallaj-Nezhadi S., Chapeland-Leclerc F., Ruprich-Robert G. & Dilmaghani A. 2019. Isolation and Identification of Antibiotic-Producing Halophilic Bacteria from Dagh Biarjmand and Haj Aligholi Salt Deserts, Iran. *Pharmaceutical Sciences*, 25(1): 70-77. DOI: 10.15171/PS.2019.11.
- Gram L. & Huss H.H. 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1): 121-137. DOI: 10.1016/0168-1605(96)01134-8.
- Huss H.H. 1997. Aseguramiento de la calidad de los productos pesqueros. Documento Técnico de Pesca N° 334. Food and Agriculture Organization (FAO). Roma. <http://www.fao.org/3/t1768s/T1768S00.htm#TOC>.
- Hyun D.W., Whon T.W., Cho Y.J., Chun J., Kim M., Jung M., Shin N., Kim J., Kim P., Yun J., Lee J., Oh S.J. & Bae J. 2013. Genome sequence of the moderately halophilic bacterium *Salinicoccus carnicancri* type strain Crm(T) (= DSM 23852(T)). *Standards in genomic sciences*, 8(2): 255-263. DOI: 10.4056/signs.3967649.
- INDECOPI. 2013. RESOLUCIÓN DE COMISIÓN DE NORMALIZACIÓN Y DE FISCALIZACIÓN DE BARRERAS COMERCIALES NO ARANCELARIAS N° 41-2013/CNB-INDECOPI. Aprueban cuatro Normas Técnicas Peruanas sobre conservas de productos pesqueros, anchoas y trucha. *Diario El Peruano*, XXX(12513): 498777-498778. <https://busquedas.elperuano.pe/download/url/aprueban-cuatro-normas-tecnicas-peruanas-sobre-conservas-de-resolucion-n-41-2013cnb-indecopi-958159-3>.
- Kim J., Enache E. & Hayman M. 2015. Halophilic and Osmophilic Microorganisms (Chapter 17). In: Salfinger Y. & Tortorello M.L. (Eds) *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. American Public Health Association. DOI: 10.2105/MBEF.0222.022.
- Liu W. & Yang S.S. 2014. *Oceanobacillus aidingensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105: 801-808. DOI: 10.1007/s10482-014-0128-1.
- MAGRAMA (Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente). 2017. *El Mercado de la anchoa*. Madrid, España.
- Onyango L.A. & Alreshidi M.M. 2018. Adaptive Metabolism in Staphylococci: Survival and Persistence in Environmental and Clinical Settings. *Journal of Pathogens*, 2018: 1092632. DOI:10.1155/2018/1092632.
- Perez S., Czerner M., Patat M.L., Zaritzky N.E., Murialdo S.E. & Yeannes M.I. 2018. Monitoring the characteristics of cultivable halophilic microbial community during salted-ripened anchovy (*Engraulis anchoita*) production. *International Journal of Food Microbiology*, 286(2): 179-189. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.013.
- Perez S., Murialdo S.E., Amezttoy I.M., Zaritzky N.E. & Yeannes M.I. 2020. New insights into halophilic prokaryotes isolated from salting-ripening anchovies (*Engraulis anchoita*) process focused on histamine-degrading strains. *Extremophiles*, 24(5): 787-796. DOI: 10.1007/s00792-020-01194-w.
- Puig Y., Leyva V., Aportela N., Camejo A. & Tejedor R. 2019. Resistencia antimicrobiana en bacterias aisladas de pescados y mariscos. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 18(3): 500-512. <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/2440>.
- Pons-Sánchez-Cascado S., Vidal-Carou M.C., Mariné-Font A. & Veciana-Nogués T. 2005. Influence of the freshness grade of raw fish on the formation of volatile and biogenic amines during the manufacture and storage of vinegar-marinated anchovies. *J. Agric. Food Chem.*, 53(22): 8586-8592. DOI: 10.1021/jf050867m.
- Rani G.N., Budumuru R. & Bandaru N.R. 2017. Antimicrobial Activity of Honey with Special Reference to Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Methicillin Sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA). *J. Clin. Diagn. Res.*, 11(8): DC05-DC08. DOI: 10.7860/JCDR/2017/30085.10347.
- Romanenko L.A., Lysenko A.M., Rohde M., Mikhailov V.V. & Stackebrandt E. 2004. *Psychrobacter maritimus* sp. nov. and *Psychrobacter arenosus* sp. nov., isolated from coastal sea ice and sediments of the Sea of Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(5): 1741-1745. DOI: 10.1099/ij.s.0.63096-0.
- SANIPES. 2016. Resolución de Dirección Ejecutiva N° 057-2016-SANIPES-DE. Aprueban Manual "Indicadores Sanitarios y de Inocuidad para los Productos Pesqueros y Acuícolas para Mercado Nacional y de Exportación". *Diario El Peruano*, XXXIII(13719): 590926-590927. http://www.sanipes.gob.pe/normativas/15_R_DE_N_057_2016_A1.pdf. <https://busquedas.elperuano.pe/normaslegales/aprueban-manual-indicadores-sanitarios-y-de-inocuidad-para-resolucion-no-057-2016-sanipes-de-1396873-1/>.
- Tanasupawat S., Chamroensaksri N., Kudo T. & Itoh T. 2010. Identification of moderately halophilic bacteria from Thai fermented fish (pla-ra) and proposal of *Virgibacillus siamensis* sp. nov. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 56: 369-379. DOI: 10.2323/jgam.56.369.
- The Editorial Board (of Bergey's Manual). 2015. *Sporosarcina*. In: Whitman W.B., Dedys S., DeVos P., Hedlund B., Kämpfer P., Rainey F.A., Trujillo M.E., Bowman J.P., Brown D.R., Glöckner F.O., Oren A., Paster B.J., Wade W. Ward N., Busse H. & Reysenbach A. (The Editorial Board) *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons. Hoboken / New Jersey. DOI: 10.1002/9781118960608.gbm00563.

- Verdos G.I., Makrigiannis A., Tsigaras E. & Boziaris I.S. 2018. Survival of food-borne bacterial pathogens in traditional Mediterranean anchovy products. *J. Food Saf.*, 39: e12576. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfs.12576>.
- Yi-Guang C., Xiao-Long C., Wen-Jun L., Li-Hua X., Meng-Liang W., Qian P. & Cheng-Lin J. 2008. *Salinicoccus salitudinis* sp. nov., a new moderately halophilic bacterium isolated from a saline soil sample. *Extremophiles*. 12: 197-203. DOI: 10.1007/s00792-007-0116-8.
- Zugarramurdi A., Parín M.A., Gadaleta L., Carrizo G. & Lupin H.M. 2004. The effect of improving raw material quality on product quality and operating costs: a comparative study for lean and fatty fish. *Food Control*, 15(7): 503-509. DOI: 10.1016/j.foodcont.2003.08.001.

BACTERIAS HALOTOLERANTES DEL SALADO MADURADO DE *Engraulis ringens* (Jenyns, 1842)

Enero - Julio 2021

Tabla 2. Caracterización de las bacterias halotolerantes aisladas del proceso de salado-madurado de anchovetas provenientes de Chimbote / Perú.

CEPA	M O R F O L O G Í A	T I N C I Ó N G R A M	C O L O R C O L O N I A	FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS								TOLERANCIA SALINA (NaCl %)						TEMPERATURA (°C)					HIDRÓLISIS DE SUSTRATO		
				O X I D A S A	U R E A S A	I N D O L	C I T R A T O	G L U C O S A	S A C A R O S A	S A L I C I N A	L A C T O S A	0.0	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	4	25	35	44	50	A L M I D Ó N	C A S E I N A	G E L A T I N A
BH1	Coco	+	Crema	-	+	+	-	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
BH2	Bacilo	+	Crema	+/-	+/-	-	-	+/-	+/-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-
BH6	Coco	+	Crema	-	+/-	+	-	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
BH11	Bacilo	+	Rojizo	+/-	-	-	+/-	+	+	nd	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
BHE11	Coco	+	Blanco	+	+	+	-	-	nd	nd	nd	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
BH12	Coco	+	Crema	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
BH12.2	Coco	-	Crema	+	-	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
BHE12	Coco	+	Crema	+	+	+	+	+	+	nd	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
BH14	Coco	+	Crema	-	-	+	-	+	+	-	+/-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
BH16	Bacilo	+	Crema	+/-	+/-	-	+	+	nd	+	nd	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
BH17	Coco	-	Crema	+/-	-	+	+/-	nd	nd	nd	nd	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
BH18	Coco	+	Blanco	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
BH19	Coco	+	Crema	-	+/-	+	-	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
BH20	Coco	+	Crema	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+

Pruebas: +, positiva; -, negativa; +/-, variable; nd, no determinado. Tamaño de halo de hidrólisis (mm): -, 0; +, ≤ 5; ++, > 6; +++, >15.

¹ Laboratorio de Microbiología / Dirección de Investigación, desarrollo, innovación y transferencia tecnológica / Instituto Tecnológico de la Producción. Carretera a Ventanilla Km 5.2, Callao, Perú.

² rcespedes@itp.gob.pe.

³ Laboratorio de Biología Molecular / Facultad de Farmacia y Bioquímica / Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Jr. Puno 1002, Lima 1- Perú.

⁴ susana.calderon2@unmsm.edu.pe.