

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA
UNAN – LEON
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

ESCUELA DE INGENIERIA DE LOS ALIMENTOS



TEMA: EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL PROTECTA TWO Y PROTECTA OX SOBRE LA SALMONELLA TYPHI EN PENAUES VANNAMEI.

TESIS: PARA OPTAR AL TITULO DE LICENCIADO EN TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

PRESENTADO POR:

Br. ALEXIS JOSE HERNANDEZ SILVA

TUTOR:

LIC. GUADALUPE VARGAS, UNAN – LEÓN

ASESOR:

Dr. JORGE LUIS AREAS, EMPRESA CAMANICA S.A.



LEÓN, NICARAGUA, JULIO 25 DEL 2002

DEDICATORIA

A Dios sobre todas las cosas que es la fuente infinita de sabiduría, Por concederme vida, paciencia y por darme todo el medios necesario para llegar a concluir una etapa más en mi Vida.

A mi Padre Luis Reinaldo Hernández Ojeda, por todo el apoyo brindado en el momento preciso, como sólo un Padre puede hacerlo con sus hijos, a quien le digo hoy que sus esfuerzos no han sido en vano y que además espero haberle respondido satisfactoriamente.

A mi Madre María Esperanza Silva Hernández una persona muy importante y especial, pilar fundamental de mi vida, quien se olvida de sí misma para dedicarse a nosotros sus hijos ella que pacientemente obedeció la voluntad de Dios y como un instrumento en sus manos me concebí y dedico su vida a cuidarme desde mis primeros años, regalándome sus sabios consejos para llegar a ser una persona de bien para la sociedad.

A mis Hermanas: María Yessenia Hernández Silva, Conny Francisca Hernández Silva, Maritza Isabel Hernández Silva, quienes me apoyaron en el momento preciso a como fuese posible.

También para alguien especial que aprecio: Martha Vianney Somarriba Chavarria que con su amor y cariño siempre estuvo a mi lado, en aquellos momentos más difíciles y que supo comprenderme.

A mi hija: Alexandra Vianney Hernández Somarriba, quien amó mucho y es mi motivo para seguir luchando.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios primeramente por darme la fuerza de seguir luchando en la vida.

Quiero agradecerles al Dr. Jorge Luis Areas de la empresa CAMANICA S.A por su colaboración y apoyo con todos los recursos necesarios, teóricos y prácticos que me brindó durante la realización del estudio.

A la Lic. Guadalupe Vargas de la UNAN-LEON por dedicar parte de su valioso tiempo y sin egoísmo orientarme para la aplicación metodología y científico - técnico, y a todas aquellas personas que de una u otra forma estuvieron involucrados con el apoyo de este estudio y que sin su ayuda este trabajo no se hubiese concluido.

183.256
c.2

W
42
H557e
2002

ÍNDICE

Página.

I Resumen.....	1
II. Introducción.....	2
III. Antecedentes.....	4
IV. Marco Teórico.....	5
V. Justificación.....	24
VI. Hipótesis.....	25
VII. Objetivos.....	26
VIII. Metodología.....	27
IX. Resultado.....	29
X. Discusión.....	37
XI. Conclusión.....	38
XII. Recomendaciones.....	39
XIII. Bibliografía.....	40
XIV. ANEXOS.....	42
Glosario.....	56

I-RESUMEN

El presente estudio experimental se realizó en la empresa CAMANICA S.A. y tiene como objetivo comprobar la efectividad antimicrobiana del protecta two y protecta ox en la eliminación de *Salmonella ssp* en camarón *Penaeus Vannamei*, a temperatura ambiente (31°C), específicamente el poder de ataque sobre *Salmonella typhi*. La evaluación se realizó en varias corridas (n=36) que correspondieron a diferentes tratamientos, teniendo como variable independiente de estudio; la concentración de los agentes antimicrobianos, tiempo de contacto, temperatura y como variable dependiente; el nivel de crecimiento bacteriano posterior al tratamiento a los que fueron medidos por los métodos de la F.D.A (11).Obteniendo como resultados una efectividad de 100% con el protecta two (2%) y protecta ox (5%) a partir de los 5 minutos de contacto, habiendo comprobado la hipótesis del estudio: " El producto será totalmente libre de *Salmonella typhi* después del tratamiento con los protecta a las concentraciones two2%y ox 5% por 30 minutos", especificaciones de uso recomendadas por los fabricantes para su uso en camarón *Penaeus Vannamei*.

II-INTRODUCCIÓN

Históricamente Nicaragua se ha caracterizado por ser un país fuertemente agrícola y Ganadero. Actualmente, en las regiones occidentales del país específicamente en los departamentos de León y Chinandega se han venido incrementando la industria procesadora de Camarón, y en especial la especie *Penaeus Vannamei* que tienen mayor interés comercial tanto para el mercado local como internacional.

Las estadísticas en Nicaragua, muestran que el crecimiento económico del país esta íntimamente ligado con el volumen total de sus exportaciones, representando las especies de escama el 20%. En 1994, el consumo per cápita de marisco en Nicaragua fue de 5.19 Kilogramos por persona, según encuesta realizada por MEDEPESCA PRADEPESCA, actualmente para los próximos años ha habido un incremento de 6.58 Kg por Persona.(14)

Las exportaciones de camarón para el año 2001 representó 33.800.000 millones de dólares, un 29% del producto interno bruto del país, generando alrededor de 16,500 empleos directos e indirectos en área rural siendo así el tercer rubro más importante generador de divisas estable para Nicaragua.(3)

La comunidad Europea plantea en las normas OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES y la FDA como requisito sanitario para importación del camarón, la ausencia de *Salmonella ssp* para garantizar la inocuidad del producto, desde el punto de vista microbiológico, químico, y amigable con el medio ambiente durante su cultivo y procesamiento, constituyendo una limitante para los productos provenientes de Nicaragua ya que se utiliza Hipoclorito de Calcio como agente antimicrobiano, teniendo como efecto la destrucción de la capa de ozono y un poder cancerígeno, aspecto que obliga a buscar alternativas de reemplazo de dicho agente antimicrobiano para poder acceder al mercado Europeo.

El Hipoclorito de calcio, ha sido uno de los agentes más utilizados como antimicrobiano en la industria exportadora del camarón con el fin de asegurar la calidad Higiénico-Sanitaria del producto que puede ser afectada por contaminación con *Salmonella ssp* siendo estas la causa más importantes de las enfermedades diarréicas por ingesta de alimentos contaminados. Dicha contaminación puede estar asociada a muchos factores críticos como el inadecuado o mal manejo del camarón en la granja, control de agua, y/o procesamiento del mismo en la Planta.

En relación a los agentes antimicrobianos sustituto del hipoclorito de Calcio, los proveedores presentan recomendaciones de uso a diferentes concentraciones y tiempos de contacto para el logro de la eliminación de *Salmonella ssp.*, efectividad que deberá ser comprobada para verificar su calidad de funcionamiento de los mismo y evitar riesgo en su uso

Ante tal situación, se hace necesario reemplazar el uso del Hipoclorito de Calcio por otro agente antimicrobiano que posea el mismo o mayor poder bactericida por tal razón, que el presente estudio tiene como propósito probar la efectividad del Protecta Ox 5% y Protecta Two 2%, ofertado por los proveedores a través de ensayos microbiológicos de identificación de *Salmonella typhi* en la especie de *Penaeus Vannamei* y determinar qué concentración de los antimicrobianos y tiempo de contacto es el más efectivo y económicamente idóneo para ser utilizados como sustitutos del Hipoclorito de Calcio.

III-ANTECEDENTES

En 1997 se realizaron varios estudios de efectividad de agentes antimicrobianos relacionados con agentes patógenos gram-positivos y gram-negativos en salas quirúrgicas y en equipos médicos utilizando productos derivados del ácido piroleñoso al 4% y al 6% así como productos furfural al 0.5% y peróxido al 7%, gluteraldehído al 2% obteniendo una efectividad entre el 96 y 100% .(2 i).

En alimentos en relación con el protecta un estudio realizado el 20 de Agosto del 2000 por J. A. Dickens and M E. Berrang, relacionado con Alimentos: "Eficacia de un Extracto Herbal en la Calidad Microbiología de Canal del Pollo de engorde durante una Temperatura fría simulada" cuyo objetivo fue probar la eficacia del protecta two al 0.5% y al 1%, se obtuvo como resultado una efectividad del 99.07 % en relación a los totales de *Aeróbicos*, *Coliformes*, *E. Col* genérico y *Campylobacter* todos con Protecta Two (2%), que muestran una excelente efectividad.(2 i).

Según la revisión de literatura realizada, en Nicaragua, aún no se han reportado estudios sobre la efectividad del Protecta-two y protecta-ox como agente antimicrobiano en Camarón.

IV-MARCO TEÓRICO

Existen agentes utilizados para la conservación y desinfección de los alimentos, la higiene de estos alimentos muchas veces depende del agua; que es el solvente de los productos de limpieza y desinfectante y el elemento que arrastra la suciedad. El agua contiene diversas impurezas ambientales (gases disueltos, sales inorgánicas, sustancias orgánicas soluble y seres vivos) excepto el caso que se haya destilado de forma controlada. Frecuentemente, la microflora del agua contiene microorganismos, que alteran los alimentos, como las bacterias *Psicrotróficas*, que acorta la vida comercial de los productos refrigerados. La higiene alimentaría exige como requisito previo el tratamiento de las aguas con el fin de eliminar estos microorganismos nocivos(10).

La limpieza es un proceso en el que la suciedad se suspende o se disuelve, generalmente en agua, su eficacia se puede aumentar:

- a) Por aplicación de agua caliente (duchado)
- b) Por empleo de agentes limpiadores o desinfectante.

Algunos desinfectantes como los compuestos de amonio son menos eficaces sobre bacterias gram negativas que sobre las gram positivas. En realidad, permiten la sobrevivencia de algunas bacterias coliformes y Pseudomonadaceas, incluso cuando se emplea en concentraciones máximas admitidas sin efectuar un aclarado final con agua.

La actividad germicida depende de las condiciones de uso, como concentración, tiempo, temperatura, pH, dureza de las clases de aguas y cantidad de materia orgánica presente, característica de la superficie y tipos y concentraciones de microorganismo a destruir. Esto no solamente influye en la eficacia de la desinfección sino también en la rapidez con que estas soluciones rebajan la fuerza, lo que determina, con frecuencia que sea necesario repetir la operación de desinfección(10).

Algunos Productos de Limpieza Utilizado en la Industria Alimentaria.

Tipo de Agente	Concentración de uso %	Agente químico utilizado	Función	Limitaciones
Agua	100	Generalmente contiene aire disueltos y minerales soluble	Disuelve y arrastra suciedad	El agua dura deja depósito sobre la superficie
Alcali Fuerte	1-5	Hidróxido sódico Ortosilicato sódico Sesquisilicato sódico	Detergente para grasa y proteína. Resta dureza al agua por precipitación	Altamente corrosivo. Dificilmente de eliminarlo. Irritante para la piel y mucosa.
Alcali Débil	1-10	Carbonato sódico Sesquicarbonato sódico	Detergente tampón a pH 8.4	Ligeramente corrosivo. Irritante para la piel.
Ácido Inorgánico	0.5	Clorhídrico Sulfúrico Nítrico	Variación de pH. Elimina precipitado en superficie	Muy corrosivo para metales aunque puede ser parcialmente inhibido por amina, Irritante para piel y mucosa
Agente Humectante Cationico	0.15 o inferior	Compuesto de amonio cuaternario	Cierto efecto humectante, acción bactericida	Incompatible con agente humectante aniónico, inactivado por muchos minerales y otra clase de suciedad
Agente Humectante Aniónico	0.15 o inferior	Jabones Alcohol sulfatado Hidrocarburo	Humedecen la superficie	Algunos son excesivamente espumosos, y compatible con agente humectante Cationico

Los agentes antibacterianos se caracterizan por sus diversas formas de actuar sobre las células bacterianas, los productos químicos que se utilizan como desinfectantes pueden ser bactericidas, destruyendo completamente la bacteria, como también pueden ser biostático, aunque en algunos casos los desinfectantes bacteriotáticos cuando se usan en concentraciones mayores son bactericidas.

Algunas Soluciones Desinfectantes Utilizadas en la industria de Alimentos

Solución acuosa	Concentraciones máxima del ingrediente activo	Condiciones de empleo
Hipoclorito de calcio, sódico, potásico	200 de halógeno calculado en cloro	Ecurrir después del tratamiento
Ácido di y tricloroisocianuro	100 de halógeno calculado en cloro	Ecurrir después del tratamiento
Yoduro potásico	22 de yodo valorable, el nivel de componente no debe superar el mínimo preciso para obtener el efecto funcional deseado.	Ecurrir después del tratamiento
Yoduro de sodio	25 de yodo	Ecurrir después del tratamiento
Tricloromelanoína y lauril sulfato sódico	200 de cloro activo, y lauril sulfato sódico a un nivel que no exceda el mínimo requerido para que se presente el efecto funcional deseado	Se utiliza en equipo y utensilio que pueden tener contacto con los alimentos

* En el estudio solo se mencionan algunas de las sustancias como referencia que generalmente se emplea en la desinfección en la industria procesadora de alimentos.

En la industria de alimento es muy importante conocer el tipo de acción que ejercen los productos que se utilizan como desinfectantes en planta y los que se utilizan como conservadores de alimentos. La característica del efecto bactericida de los conservadores de alimento depende mucho de factores como la temperatura, tiempo de contacto, concentración, pH y Aw.

El benzoato de sodio es uno de estos conservadores de alimentos. En *Proteus Vulgaris*, el ácido benzóico es absorbido por las células microbianas que respiran bloqueando la oxidación de la glucosa y del piruvato a nivel del acetato. En este caso del *Proteus Vulgaris*, el ácido benzóico produce un aumento en la velocidad del consumo de oxígeno durante la primera parte de la oxidación de glucosa. El benzoato actúa frente a los microorganismos inhibiendo la absorción de las moléculas del sustrato por las células.

La forma no asociada es indispensable para la actividad antimicrobiana del benzoato así como también para la actividad de otros compuestos lipófilico tales como el sorbato y el propionato. En este estado de no disociado, estos compuestos, son solubles en la membrana celular y parece ser que actúa como iodofóro facilitando la filtración de protones al interior de las células y de este modo incrementa la producción de energía celular para mantener su habitual pH interno. Con la alteración de la actividad de membrana celular, el transporte de aminoácido resulta perjudicado(4).

En cuanto al efecto de los microorganismos por el SO_2 es bacteriotáctico frente a especie de *Acetobacter* frente a las bacterias acidolácticas a bajo pH, siendo eficaz a concentraciones de 100 a 200 ppm en zumo de fruta y en las bebidas. A concentraciones más elevadas es bactericida. Se ha indicado que la actividad antimicrobiana es debido al potente poder reductor de estos compuestos que les permite reducir la tensión del oxígeno hasta un valor por debajo de aquel al cual los microorganismos aeróbico son capaces de crecer, o a su acción directa sobre algún sistema enzimático. También se cree que SO_2 es un tóxico de las enzimas que inhibe el crecimiento de los microorganismos por inhibir las enzimas esenciales (4).

Los nitrito inhibe el crecimiento de *Clotridium Butulinum* por dañar las enzimas de hierro-azufre, como por ejemplo la ferredoxina, impidiendo de este modo la síntesis de trifosfato de adenocina (ATP) a partir del piruvato. Aunque la resistencia de las bacterias acidoácticas frente al nitrito no se conoce del todo su resistencia, lo cierto es que estos microorganismos carecen de ferredoxina. Los *Clotridium* contiene tanta ferredoxina como hidrogenasa, las cuales actúan en el transporte de electrones durante la escisión anaerobias del piruvato para dar $\text{ATP}, \text{H}_2, \text{CO}_2$ (4).

En el caso de los antibióticos son eficaces frente a bacterias grampositivas, principalmente esporógenas, al igual que frente a hongos y frente a bacterias gramnegativas. *Enterococcus faecalis* es una de las bacterias grampositivas más resistentes. Estos agentes químicos provocan una lisis en el citoplasma bacteriano impidiendo la producción del ácido fólico, que es esencial para la reproducción del microorganismo (4).

Las sales ejercen un efecto de desecación tanto en el alimento como sobre los microorganismos. La disolución de sal en agua a concentraciones del 0.85 % al 0.90% produce un medio isotónico para los microorganismos no marinos.

Como quiera que las cantidades de sales y agua son iguales a ambos lados de la membrana celular, el agua se desplaza a través de las membranas celulares en ambas direcciones. Cuando se suspenden células microbianas en una solución salina del 5%, en el interior de las células la concentración de agua es mayor que la existente en el exterior. Por difusión, el agua que se desplaza desde la zona en la que su concentración es elevada a la zona en la que su concentración es baja. En este caso, el agua sale a un ritmo mayor que el ritmo con el cual entra en la misma. La consecuencia para la célula es la plasmólisis, fenómeno que da como resultado la inhibición de su crecimiento y posiblemente su muerte. Los efectos inhibitorios de la sal no dependen del pH, tal como suceden en algunos otros conservadores químicos (4).

Entre otros productos orgánicos utilizados en la industria procesadora de camarón para el tratamiento bacteriano se incluye los protecta two y protecta ox, es un producto orgánico sólido bactericida que elimina la *Salmonella spp.* Este producto tiene dos presentaciones en el mercado internacional como Protecta TWO (2%) bolsa de 2 Kg compuesto por Sal y Extracto de hierba, Protecta OX (5%) Bolsa de 1 Kg compuesto por Lactato de sodio, Acetato de sodio y Sabor natural, este químico se almacena a temperatura ambiente.

Factores que influye en el crecimiento bacteriano.

Temperatura

La temperatura óptima es de 37 °C pero pueden crecer dentro de un amplio margen de 5°C y 47°C. La temperatura mínima es muy importante en la seguridad de alimentos ya que la refrigeración es la medida más utilizada para prevenir la multiplicación de este patógeno en alimentos.(12)

Actividad de agua (aW)

La actividad de agua óptima es de alrededor de 0.99. El límite mínimo para el desarrollo de *Salmonella ssp* es más restrictivo comparado con otras bacterias y hongos que tienen valores de 0.75 y 0.605 respectivamente(12). Pero según Silleker, J.H; el crecimiento óptimo para especie de *Salmonella* es de 0.92.

pH

Valores cercanos a la neutralidad son más favorables para que el germen se multiplique más activamente. El pH mínimo para desarrollar no es fácil de definir por que se encuentra muy afectado por una variedad de factores: naturaleza del ácido, tipo de serovariedad, temperaturas de incubación, entre otros. Según D' Aoust, el pH de crecimiento es entre 6.5 y 7.5 como óptimas, mientras que Fernández Escartín refiere datos de 6.6 y 8.2. Cifras inferiores de 4.1 y superior a 9.0 son señaladas como limitante para su desarrollo(12).

La *Salmonella typhi* presentan una distribución universal, el reservorio es el hombre, la trasmisión a través de la contaminación fecal del agua y de los alimentos. Los serotipos de *Salmonella* pueden o no estar estrictamente adaptados a un huésped en particular. Las serovariedades adaptadas al hombre, como *Salmonella typhi* produce enfermedades graves como septicemia y síndrome tifoideo. Las serovariedades no adaptadas por ejemplo *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis* por lo general son responsables de infecciones en el hombre a través de los alimentos de origen animal que han sido infectados y que afecta la salud del hombre sintomático o sintomáticamente.

El patógeno sobre vive al pH gástrico, e intestinal. El primer paso en la patogénesis de salmonelosis es la penetración en la mucosa intestinal previa mente a la invasión epitelial se produce por parte del patógeno la digestión parcial del glicocalix esta alteración de superficie celular permite al microorganismo acceder al interior de célula epitelial. La especie de *Salmonella typhi* que produce fiebre tifoidea, parece ser transportadas en la vacuola a través de célula y penetran a la lámina propia vía membrana.

El daño observado en la mucosa intestinal puede ser una repuesta inflamatoria mediana o una ulceración severa dependiendo de la capacidad del patógeno para invadir el epitelio intestinal. Posteriormente, son colonizadas las células del sistema monocitomacrofagito y se diseminan por vía linfohemática concluyendo la fase linfática y comenzando la fase de septicemia. Las *Salmonellas* llegan al hígado y son excretadas por vía biliar volviendo nuevamente al intestino.

Morfología del patógeno: La *Salmonella ssp* es un microorganismo patógeno perteneciente a la familia enterobacterias, son bacilo cortos de 0.7-1.5 x 2.0-5 micrómetro, gram-negativas generalmente móviles peritricos. Anaerobios facultativos no esporulados, para visualizar los cilios debe efectuarse coloraciones especiales, resisten la congelación agua y la desecación, mantienen su infectividad durante semanas en hielo, alimento, tierra y agua.

Las Especies adaptadas al hombre.

S.typhi, *S. paratyphi A*. que tienen las siguientes características:

- a) Dosis infectivas pequeña para producir enfermedad (10^1 - 10^2 bacteria /ml)
- b) Periodo de incubación prolongada.
- c) Producen septicemia con síndrome tifoidea.
- d) Tendencia de producir portadores permanentes o de volverse endémica.

La dosis infecciosa de salmonelosis depende de una serie de factores tales como:

- 1) Virulencia del serotipo.
- 2) La sensibilidad del individuo.
- 3) El tipo de alimento implicado.

En cuanto a los alimentos principalmente los mariscos en especial las especies de mayor interés comercial (Camarón), su descomposición se debe por la carga bacteriana presente, varios son los factores que coadyuvan en la caducidad de estos alimentos produciendo sustancias tóxicas ya que la ausencia de carbohidratos hace que las bacterias existentes en la superficie del pescado recurran inmediatamente ha utilizar la mezcla soluble de sustancias nitrogenadas que son fácilmente asimilables produciendo olores y sabores desagradables.

Los Camarones: Son crustáceos decapados de la familia de los *Peneidos*, habitan en fondos arenosos, fango o combinación de ambos en profundidades de 4-90 mts. Su tamaño oscila entre 6 – 25 cm en su longitud total según la especie.

La alteración de los mariscos más consumidos de este grupo es el camarón, su descomposición se debe a bacterias patógenas.

Las principales diferencias de alteraciones de estos alimentos son generalmente atribuibles a la manera con que son manipulados o a su composición química concreta. La carne de marisco durante su alteración parece sufrir muchos de los cambios químicos observados en el pescado, aumentan las sustancias básicas volátiles y sube el pH, como consecuencia de la oxidación de los pigmentos aparecen ciertas coloraciones como la melanosis, los factores de la descomposición química se deben a las bacterias presentes en el sistema digestivo del animal.

Se ha señalado que el Camarón tiene un contenido de aminoácidos más elevado que el pescado y que contiene enzimas parecidas a la catepsina que destruye rápidamente las Proteínas (4). Desde el punto de vista de Salud Pública es de extraordinaria importancia la contaminación del Camarón con bacterias patógenas procedentes del hombre y animales de sangre caliente, esta contaminación es la causa más corriente del decomiso de los productos marinos realizada por los servicios de inspección sanitaria.

Los microorganismos contaminantes más corrientes son *Coliformes*, *Enterococcus*, y *Staphylococcus*. En el caso de la alteración de los Camarones el cuadro es distinto puesto que estos animales, mueren inmediatamente después de capturado y bioquímicamente el deterioro de los mariscos parece incluir actividades proteolíticas y sacarolíticas, se acumulan amoníaco y otras aminos así como ácido (4).

El pH desciende de forma típica durante su almacenamiento por ejemplo el pH de las ostras frescas varía entre 6.2-6.5 descendiendo durante su alteración a 5.8 o menos. Es de suponer que la flora bacteriana del Camarón, sea reflejo de la flora de las aguas en las cuales han sido capturados, o bien de la flora bacteriana contaminante, de la flora de los manipuladores y de la flora de las aguas con que han sido lavados.

Se ha señalado que en estos alimentos se encuentran algunos de los microorganismos indicados en el pescado fresco y en la carne de los Crustáceos alterados por microorganismos *Psicrotróficos* predominantes como las *Pseudomonas*, *Acinetobacter* – *Moraxella* (4). Debido a la anatomía de estos microorganismos, es de suponer que la alteración se inicia en la superficie externa de estos alimentos. Se ha señalado que el músculo de los crustáceos contiene mas de 300 mg N_2 /100 g de carne(4), esta cifra es más elevada que el indicado para el músculo de los pescados.

Los principales componentes de la microflora de los camarones.

Como *microflora* tenemos: *Micrococcus*, *Corineformes*, y bacilos gram- negativos. Durante la alteración de los músculos la población microbiana aumenta generalmente hasta 10^7 por gramos o más. En la flora alterante predominan las bacterias gram-negativas, proteolíticas probablemente *Pseudomonas* y *Vibrio ssp.* Además hay bacterias sacarolíticas activas que fermentan el 3% a ácidos orgánicos más del glucógeno que contienen los tejidos.

Cierta flora bacteriana tiene la capacidad de sobrevivir en los alimentos marinos aún estando refrigerados, si estas prácticas son mal empleadas en uno o dos días de almacenamiento en estas condiciones, la carga bacteriana estará constituida por bacterias predominante gram-negativas.

El aumento neto del recuento bacteriano de los productos sometidos a un simple proceso de limpieza y empaque constituye un indicador de prácticas de elaboración defectuosas.

Las fuentes potenciales de contaminación son muchas, dado que la superficie que se pone en contacto con el producto o materia prima puede estar recubierta de una mucosidad cargada microbiológicamente y de material de desecho, además hay mucho contacto humano durante la operación. Obviamente el grado de contaminación con bacterias alterante depende del cuidado y del manejo, realizado en la planta, pero también es función de calidad bacteriológicas de la materia prima que se utiliza. (4)

Los cambios cuantitativos de la población bacteriana se asocian con cambios cualitativos de su composición, a medida que se inicia el crecimiento de la población microbiana, los bacilos gram-negativos típicos se convierten en el tipo de microorganismos predominantes, estas bacterias tienen la habilidad de desarrollarse a temperaturas inferiores de 5 °C, tiene la capacidad de utilizar eficazmente los compuestos nitrogenados no proteicos, que constituye el sustrato nutritivo disponible, es probablemente el factor determinante más significativo.

Los camarones tienen cierta característica común (crustáceos o moluscos) que influye en forma decisiva en su deterioro, en general ellos contienen mayor cantidad de aminoácidos libres que los peces, esto facilita grandemente el crecimiento bacterial y explica su rápido deterioro, lo cual es evidente en la mayoría de los mariscos, ya que están sujetos a diferentes tipos de deterioro microbiano.

El deterioro de los mariscos es considerado, generalmente como el resultado de la acción de las enzimas de los tejidos y de los microorganismos presentes en la microflora de los mismos o introducidos durante la captura y manipulación. Este deterioro es el resultado principalmente de la acción bacterial y es causada por los compuestos que imparten cambios de color, sabor y olor. (1)

Los procesos de deterioro empiezan muy temprano por medio de las bacterias marinas y también por la acción de bacterias que sobreviven durante la manipulación y lavado del camarón, mientras que en otros crustáceos comerciales se mantienen vivos por un tiempo considerable después de la captura e incluso hasta el momento de pre – cocido así como estos puede contaminarse mediante el limus y la flora intestinal.

La prevención del deterioro en el camarón envuelve dos problemas:

- 1) Mantener un número bajo de microorganismos.
- 2) Control de la oxidación.

La Formación de compuestos tóxicos.

De los veintinueve Aminoácidos conocidos hasta hoy, dieciocho son los que se han encontrado libre en la carne del camarón, Estos compuestos, al producirse la degradación de sustancia durante un período prolongado, forman otro tipo de compuestos, algunos de los cuales resultan tóxicos para el organismo humano como ejemplo de esta formación puede mencionar la degradación bacteriana de:

- a-) El triptófano, que forma compuestos como Indopropiónico e Indolacético y en estados tardío Escatol e Índole.
- b-) Lisina, que puede formar las sustancias llamada Cadavérica y el ácido Caprónico.
- c-) Metionina, que junto con la Cistina contienen Azufre (S) en su estructura molecular y forma compuestos Azufrados entre los que se encuentra el ácido sulfhídrico (H_2S) que es sumamente tóxico para el organismo humano.(1)

Otros compuestos, como Metilaminas (Monometilaminas, Dimetilaminas, Trimetilaminas), el Amonio, se convierten en tóxicos al ingerirse en cantidades específicas que provocan trastornos fisiológicos que pueden concluir hasta con la muerte de las personas. (1) Esta reacción es motivada por enzimas específicas, el color oscuro es producido por pigmentos, los cuales también se forman en la superficie interna del exoesqueleto, en estado avanzado de la melanosis en la carne de camarón. Estos pigmentos son producidos por una reacción de oxidación al actuar la tirosinasa sobre la tirosina.

La reacción es acelerada por el cobre (Cu^+) y otros iones metálicos. El microorganismo es resistente a una amplia gama de agentes anti-infecciosos incluidos, Ampicilina, Cloranfenicol, Estreptomycin, Sulfas y Tetraciclinas por tanto la enfermedad es más difícil de tratar, la mortalidad es relativamente alta, el 3% se asocia con infecciones por este organismo, *Salmonella typhimurium*.

Algunas causas asociadas al incremento de la salmonelosis.

- Cambio en los hábitos alimenticios en diferentes poblaciones, producción y venta masiva de alimento.
- Apertura de fronteras por el comercio entre países.
- Aparición de serovares de resistencia múltiple a ciertos antibióticos.
- Procedimientos inadecuados para almacenar alimentos.

COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CAMARÓN EN 100 g DE MUESTRA.

Cal(g)	Proteín (g)	Gras (g)	HCO (g)	Ca (g)	P (mg)	Fe (mg)	Tiamin (mg)	Riboflabina (mg)	Niacina (mg)	Vit C (mg)
12	2.4	0.0	0.4	13	32	0.2	0.01	0.01	0.2	---

Entre los numerosos procesos de descomposición existentes en los productos y alimentos marinos, prevalece la proteólisis. El mantenimiento del camarón de 1°C a -1°C retrasa el proceso de proteólisis, prolongando la duración del producto; ahora bien, en el Camarón expuesto a temperatura ambiente antes de guardar en hielo, se observa un incremento de la proteólisis con desprendimiento de aminoácidos incluyendo la tiroxina y su rápida conversión en melanina por acción de fenolasa. (1)

Tipos de descomposición en el camarón crudo:

La putrefacción, la cual aparece cuando el camarón antes de ser almacenado a bajas temperaturas es expuesto a una temperatura favorable para la incubación bacterial. La *Salmonella ssp* no crece a temperatura inferior a unos 6 °C en un Caldo rico, la fase de latencia 10 °C la *Salmonella Typhimurium* aproximadamente 12 h y su tiempo de generación de 8 h.

El crecimiento microbiano en los alimentos puede ser mucho más lento, así por ejemplo tanto la *Salmonella Senftenberg* como la *Salmonella Enteritidis* y la *Salmonella Manhattun* son incapaces de crecer a 10°C en ensalada de jamón aunque crezcan a 7 °C en pollo. La congelación de los alimentos puede provocar la muerte del microorganismo o una lesión subletal. Desde el punto de vista sanitario la lesión microscópica subletal alcanza notable interés, las bacterias lesionadas cuya elección puede resultar difícil en un alimento congelados, son capaces de recuperarse tras la descongelación, crecer y producir toxinas.

Las bacterias ofrecen varias repuestas a las acciones nocivas de la congelación. Por otro lado para el crecimiento de la *Salmonella ssp* en laboratorio se utilizan medio selectivo, según estudio si las células de las bacterias han sufrido una lesión estas crecerá (Vine y Col.) El método más usado es el Caldo lactosa, aunque la lactosa no es necesaria para la verificación y puede también usarse Caldo de Soya Cripticaza (TSB) Caldo Nutritivo o Agua de Peptona Tamponada.

Para obtener recuperación completa y suficiente recuperación de los microorganismos recuperados, se deberá realizar el preenriquecimiento durante mas de 6 h, especialmente cuando se usa como medio selectivo Tetrionato Bilis Verde Brillantes y cuando este medio se incuba a 43 °C.

BASES BIOQUÍMICAS

Fermentación de la glucosa (alcalino / ácida)

La primera formación de fermentación en TSI después de 18 a 24 h de incubación es un pico de flauta alcalino y una capa profunda ácida (alcalino / ácida). Esta reacción se observa en los organismos capaces de fermentar solamente la glucosa; son no fermentadores de la lactosa, el pico de flauta es alcalino (Rojo), lo que indica que sea producido la degradación aeróbica de la glucosa. Después de 18 a 24 h de incubación la baja concentración de glucosa (0.1%), ha sido consumida por completo y el organismo comienza a utilizar las peptonas que se encuentran en el medio para obtener los nutrientes para su crecimiento.

Sin embargo, en la capa profunda del TSI se observa un color amarillo debido a la degradación aeróbica de la glucosa, donde la glucosa es degradada durante 18 a 24 h de incubación se forman productos terminales ácidos donde varia el pH (ácido, color amarillo)

Fermentación (ácida / ácida)

Algunos microorganismos tienen la facultad de fermentar tanto la lactosa como la glucosa en busca de elementos nutritivos, dando una reacción en el medio TSI de un pico de flauta ácido y una capa profunda ácida (ácida / ácida), después de las 18 a 24 h de incubación, la lactosa se encuentra en concentraciones del 1%, es decir 10 veces más que la glucosa. En un periodo de 18 a 24 h la concentración de lactosa en mayor cantidad aún no es consumida y todavía existen condiciones ácidas.

No Fermentación de la lactosa ni de la glucosa (alcalino / alcalino)

Alguna bacteria, sobre todo los bacilos no entéricos gram-negativos, son incapaces de fermentar la glucosa o la lactosa. Esta bacteria se encuentra en tracto intestinal junto con miembros de la enterobacteriaceae y es necesario identificarlas definitivamente como no entérica. Esta bacteria es incapaz de obtener los nutrientes de los carbohidratos, acuden a la peptona que contiene el medio, y utilizan a esta de forma aeróbica o anaeróbica dando una reacción positiva. Un organismo que da un pico de flauta alcalina y una capa profunda alcalina, degrada la peptona, una reacción de pico de flauta alcalina y sin cambio en la capa profunda es el resultado de un organismo que solamente puede catabolizar la peptona en condiciones aeróbicas; de allí el tipo de flauta muestra el cambio de color rojo. Cuando esta peptona es degradada se produce en pH alcalina por la liberación de amoníaco (NH_3) que imparte el medio un color rojo intenso.(6)

Base bioquímica LIA

Esta descarboxilación del medio es producida por enzimas descarboxilasas adaptativas o inducidas; son formadas por un organismo, solamente cultivada en un medio ácido en presencia de un substrato específico, y los productos de la descarboxilación provocan una desviación del pH hacia la alcalinidad. Esta descarboxilación esta limitada a aquellos aminoácidos que poseen por lo menos un grupo químicamente activo que no sea una amina o un grupo carboxilo, y la descomposición de los aminoácidos se produce anaeróbicamente. El proceso de descarboxilación es irreversible, no oxidativo y requiere una coenzima, común, el fosfato de piridoxal. El aminoácido L-lisina sufre la descarboxilación para dar cadaverina (una diamina) y anhídrido carbónico por acción de las enzimas especifica lisina-descarboxilasa.

Todas las enterobacteriaceae causan una fermentación inicial de glucosa que produce ácido, lo que provocan un cambio en el indicador del pH, de púrpura amarillo en las primeras 10 a 12 h de incubación. En respuesta a la acidez, los organismos que producen lisina-descarboxilasa forman una amina (cadaverina) que hace que el indicador del pH vuelva a la alcalinidad. (Púrpura) (6)

Base bioquímica de la urea

El sustrato de urea es una diamina del ácido carbónico, a la que frecuentemente se menciona como carbamida, todas las amidas son rápidamente hidrolizadas. La hidrólisis de la urea es canalizada por una enzima específica, la ureasa para dar dos moléculas de amoníaco. En solución la urea se hidroliza, dando carbonato de amonio como producto final.

El agar urea Christensen se usa para la detención rápida de la actividad ureasa de todas las especies de *Proteus*. Este medio detecta así mismo la actividad ureasa por especie de *Enterobacter* y otros miembros de las enterobacteriaceae que muestran una reacción de urea retardada, esta última especie puede perder su capacidad de utilizar el amoníaco uréico como su única fuente de nitrógeno, pero no puede retener o recuperar su capacidad de hidrolizar la urea.

Este medio elimina la necesidad de un organismo de utilizar los productos derivados de la urea (amoníaco) como su única fuente de nitrógeno y muestra también actividad ureasa en organismo cuyo enriquecimiento de nitrógeno es más completo.(6)

Base Bioquímica de citrato.

Algunas bacterias pueden suministrar energía en ausencia de fermentación o producción de ácido láctico empleando el citrato como única fuente de carbono, Normalmente, el metabolismo de citrato comprende una condensación de acetilo con la coenzima A y oxalacetato para entrar en el ciclo de Krebs. El metabolismo de citrato por la mayoría de las bacterias es rápido a través del ciclo ácidos tricarboxílico o el ciclo de fermentación del citrato.

En las bacterias, el desdoblamiento del citrato comprende un sistema enzimático sin la intervención de la coenzima A. Esta enzima se denomina citritasa esta requieren un catión bivalente, que es suministrada por el magnesio o el manganeso. Los productos obtenidos del metabolismo del citrato dependen del pH del medio si el pH aumenta se produce más acetato y formato, con una disminución de la producción del lactato y bióxido de carbono. Con un pH ácido, el acetilmetilcarbinol (acetoína) y el lactato son los principales productos de utilización del citrato. (6)

Base Bioquímica del SIM.

Prueba del Indol.

El triptófano es un aminoácido que puede ser oxidado por ciertas bacterias para formar 3 metabolitos indólicos principales: Indol, Escaltol, e Indolacético, diversas enzimas intracelulares que interviene en este proceso reciben el nombre colectivo de triptofanasa, lo que indica un sistema completo de enzimas vinculadas con la producción del Indol.

La enzima triptofanasa catalizan la reacción de desaminación, atacando la molécula triptófano solamente en su cadena lateral y dejando intacto el anillo aromático en la forma de Indol. La desaminación y la hidrólisis tiene lugar con el agregado de una molécula de agua en presencia de enzima triptofanasa y el piridoxal fosfato como coenzima. En la desaminación es extraída la porción amina del aminoácido con la liberación de una molécula amoníaco. Existen dos tipos de desaminación: Oxidativa y reductiva.

La oxidativa extrae el grupo amino de un aminoácido y se agrega a un doble enlace al producto desaminado (un compuesto no saturado).

La desaminación por el triptófano es del tipo reductor, por lo cual es extraído el grupo amino (NH_2) y liberando amoniaco y energía, que es utilizada por la bacteria esta degradación libera Indol.

Prueba del ácido sulfhídrico (H₂S)

La protéolisis de proteínas da aminoácido individual; algunas especies bacterianas heterotróficas son capaces de liberar azufre enzimáticamente de los diferentes aminoácidos que las contienen, produciendo el gas ácido sulfhídrico (H₂S). La peptona la cisteína, la cistina y el tiosulfato, todos son fuentes de azufre, pero las diferentes especies utilizan distintos compuestos o aminoácidos que contienen azufre para producir (H₂S).

Existen dos etapas en la primera etapa la bacteria reacciona con el tiosulfato de sodio por medio de una reacción de reducción que da un sulfito y un sulfato. Para que tenga lugar la reducción de tiosulfato es necesario que exista en la capa de arriba del medio TSI un medio ácido, Para proporcionar esta acidez se encuentran dos carbohidratos. Este es un proceso de respiración anaeróbico por el cual el átomo de azufre sirve como aceptor de electrones para la oxidación de sustrato orgánicos. En la segunda etapa el (H₂S) reacciona con citrato férrico de amonio para producir un precipitado negro y soluble, sulfuro ferroso. Se recomienda el citrato de amonio más que el citrato ferrico, por lo tanto el (H₂S) puede ser producido por las bacterias por la reducción de la fuente de azufre inorgánica como el tiosulfato.(6)

Prueba de movilidad

La temperatura de incubación es fundamental, dado que muchos organismos con movilidad lo son a 15-25°C pero no a 37°C, que es la temperatura óptima de crecimiento. Si se sospecha que un organismo puede mostrar motilidad con una temperatura inferior, inocular dos tubos simultáneamente. Incubar uno a 35°C y el otro a temperatura de (22-25°C).

La sal de tetrazolium puede actuar como un aceptor de electrón artificial para la enzima enlazada con el piridin nucleótido, la sal es reducida por el citocromo puede competir con los electrones de la citocromo – oxidasa.

La oxidación se produce por la reducción de dehidrogenasas específicamente por medio del sistema de transporte de electrones. El tetrazolium es un compuesto soluble, incoloro, que es captado por las células bacterianas donde es reducido en el sitio de las oxidaciones enzimáticas liberando el ácido fórmico que es un compuesto intensamente soluble y de color rojo.(6)

V-JUSTIFICACIÓN

Los proveedores de agentes antimicrobianos proporcionan recomendaciones de uso referidas a la concentración y tiempo de contacto considerado como parámetros óptimos de efectividad, algunas veces sin tomar en cuenta: el tipo de producto al cual deberá aplicarse y tipo de Bacterias que se desea eliminar del medio. Por otro lado, los consumidores no evalúan su efectividad la que puede ser afectada durante el manejo de los mismos constituyendo una problemática que puede tener consecuencia de inseguridad sobre la inocuidad del alimento además de las consecuencias económicas.

En el marco de la situación anterior el presente estudio constituye la aplicación de una metodología para probar la efectividad del protecta two y protecta ox como sustitutos del hipoclorito de calcio actuando específicamente sobre la *Salmonella typhi*, sin alterar las propiedades físico – químicas del alimento. Como es el caso del camarón de cultivo *Penaeus Vannamei* y de esta forma poder probar la efectividad antimicrobiana y tener seguridad sobre la calidad microbiológica de los alimentos tratados con dichos agentes antimicrobianos.



VI-HIPÓTESIS

“ El producto será totalmente libre de *Salmonella typhi* después del tratamiento con los protecta a las concentraciones two2%y ox 5% por 30 min., especificaciones sugeridas por el fabricante para uso en camarón *Penaeus Vannamei* “.



VII-OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

- Comprobar la efectividad antimicrobiana del Protecta two y Protecta Ox en la eliminación de *Salmonella ssp* en camarón *Penaeus Vannamei*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

1. - Determinar la carga microbiana natural del Camarón.
2. - Comprobar la efectividad del agente antimicrobiano en cultivo puro a diferentes concentraciones y tiempo de contacto.
- 3.- Comparar la efectividad antimicrobiana del Protecta two y protecta Ox en diferentes concentraciones y tiempos de contacto con *Salmonella typhi* y en camarón *Penaeus Vannamei*.
- 4- Comprobar el crecimiento de salmonella typhi en los diferentes ensayos a través de las pruebas bioquímicas y serológicas.

VIII-METODOLOGÍA

El Presente estudio es de tipo experimental y transversal. Se llevó a cabo en la Empresa Camarones de Nicaragua CAMANICA S, A. ubicada en el Km. 130 carretera León-Chinandega, quien proporcionó las muestras frescas de Camarón *Penaeus Vannamei* que fueron recolectados en la granja Maricultora del Golfo, ubicada al Sur-oeste del estero real.

La muestra estuvo constituida por 36 porciones de camarón (n=36) las que fueron analizadas microbiológicamente por duplicado, las mismas fueron sometidas al tratamiento con protecta two y protecta ox de las cuales 12 de ellas fueron sometidas con protecta two y 24 con protecta ox, se tomaron 25 gramo de camarón adicional como control. Se utilizó como criterio de inclusión de estudio solamente camarón *Penaeus vannamei* proveniente de la granja Maricultora del golfo perteneciente a la empresa.

Las variables independientes, del estudio fueron las concentraciones de los agentes antimicrobianos,(Protecta two y protecta ox) a temperatura de 37°C y tiempo (5,10,15,20,25,30 min.) de contacto del agente con el camarón y como variable dependiente el nivel bacteriano obtenido después del tratamiento.

En el presente estudio se realizaron recuentos microbianos iniciales y finales de *Salmonella typhi* (Ver pag.29,30) en cada una de las muestras con el fin de determinar la efectividad del protecta two y Protecta Ox la que fue comparada con una carga conocida de *Salmonella typhi* en cultivo puro. Así mismo se realizaron recuentos microbiológicos en camarón en forma duplicado, según los Métodos de la F.D.A(11). Realizando un total 36 recuentos para *Salmonella typhi* dichos ensayos se describen a continuación.

Para determinar la carga microbiana natural del camarón se tomó la muestra aleatoria correspondiente de un lote de 5 Lbs de camarón que fue trasladado al laboratorio de control microbiológico de la empresa en termo de Poroplast con hielo para conservar una temperatura mínima de 4 °C. Se procedió a la evaluación sensorial del producto obtenido (olor, Color, apariencia y textura) .

De este lote se tomó 25 grs de camarón por cada análisis, los que fueron preparados y sometidas a preenriquecimiento en caldo lactosado y posteriormente se enriqueció en CTVB, CSC y CRV, caracterizando su flora natural a través de recuentos totales de la carga microbiana presente(11).

Para comprobar la efectividad del agente antimicrobiano se tomó 25 gramos de camarón proveniente del mismo lote, los que se sometieron a tratamiento con protecta two 1,5%, 2% y protecta ox 2%,3%,4%,5% a tiempo de contacto de 5min, 10min, 15min, 20min, 25min y 30 min., Inoculando 10^{-7} ufc/ml de *Salmonella typhi*, tomando una muestra como control que fue incubada a 37°C por 24 h utilizando un medio selectivo para obtener resultados del recuento bacteriano (Ver pág. 29,30). Posteriormente, se realizaron pruebas bioquímicas para comprobar la existencia de *Salmonella typhi* (Ver pág.34,35,36).

Con los resultados obtenidos en cada uno de los análisis se diseñó una base de datos con el programa Microsoft Word y fueron analizados estadísticamente a través de gráficas, mostrando así, la efectividad antimicrobiana del Protecta two y Protecta Ox en la inhibición del crecimiento de *Salmonella typhi* en camarón *Penaeus Vannamei*.

IX-RESULTADOS

Tabla No 1- Flora natural encontradas en camarón a 37°C.

tipo de Flora	si	no
<i>Salmonella Typhi</i>		x
<i>Proteus Vulgaris</i>	x	

Tabla No 2- Comportamiento de la *Salmonella Typhi* en cultivo puro (10^7 ufc/ml) utilizando diferentes concentraciones de protecta two y protecta ox con variación de tiempo de contacto a 37°C.

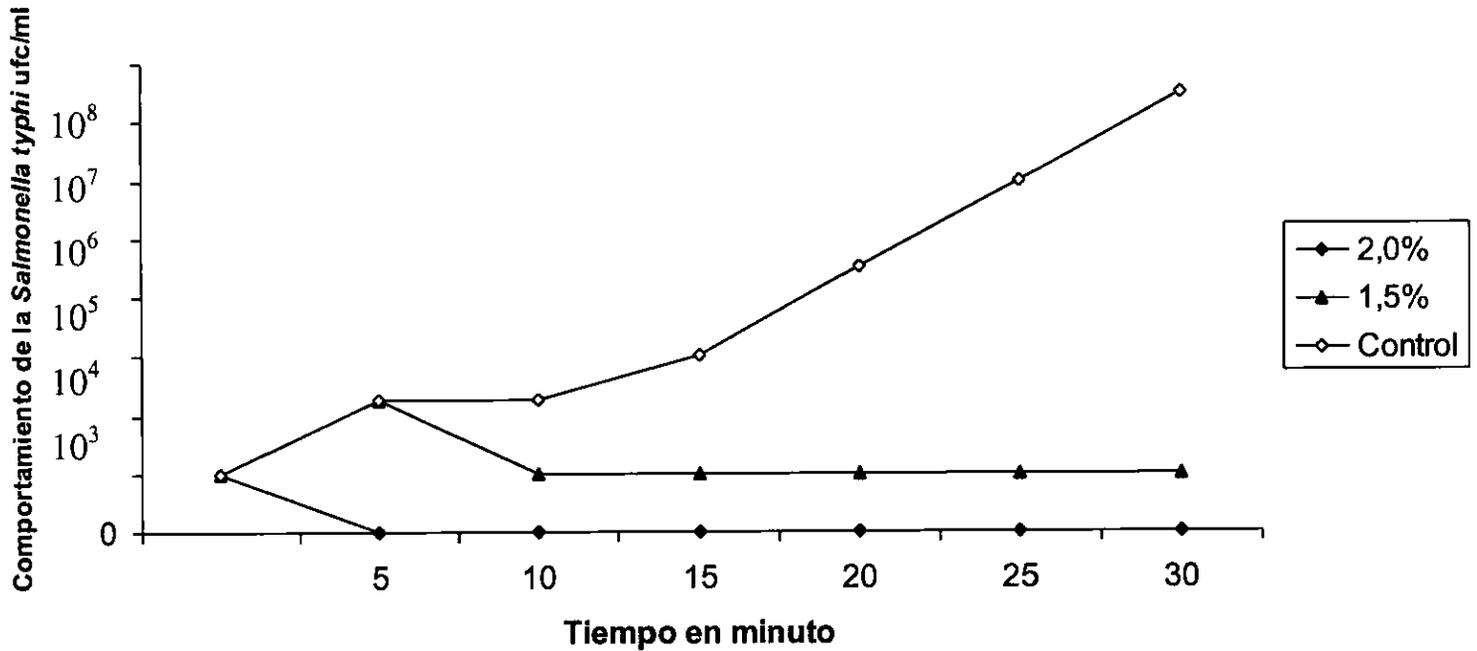
Tiempo Minutos	Protecta two		Protecta ox				Control ufc/ml
	1.5%	2 %	2 %	3 %	4 %	5 %	
5	NC	NC	NC	NC	NC	NC	10^4
10	NC	NC	NC	NC	NC	NC	10^4
15	NC	NC	NC	NC	NC	NC	10^5
20	NC	NC	NC	NC	NC	NC	10^5
25	NC	NC	NC	NC	NC	NC	10^6
30	NC	NC	NC	NC	NC	NC	10^7

NC: No crece.

Tabla No 3- Comportamiento de la *Salmonella Typhi* en camarón después del tratamiento con protecta two y protecta ox, en Agar SS a 37°C.

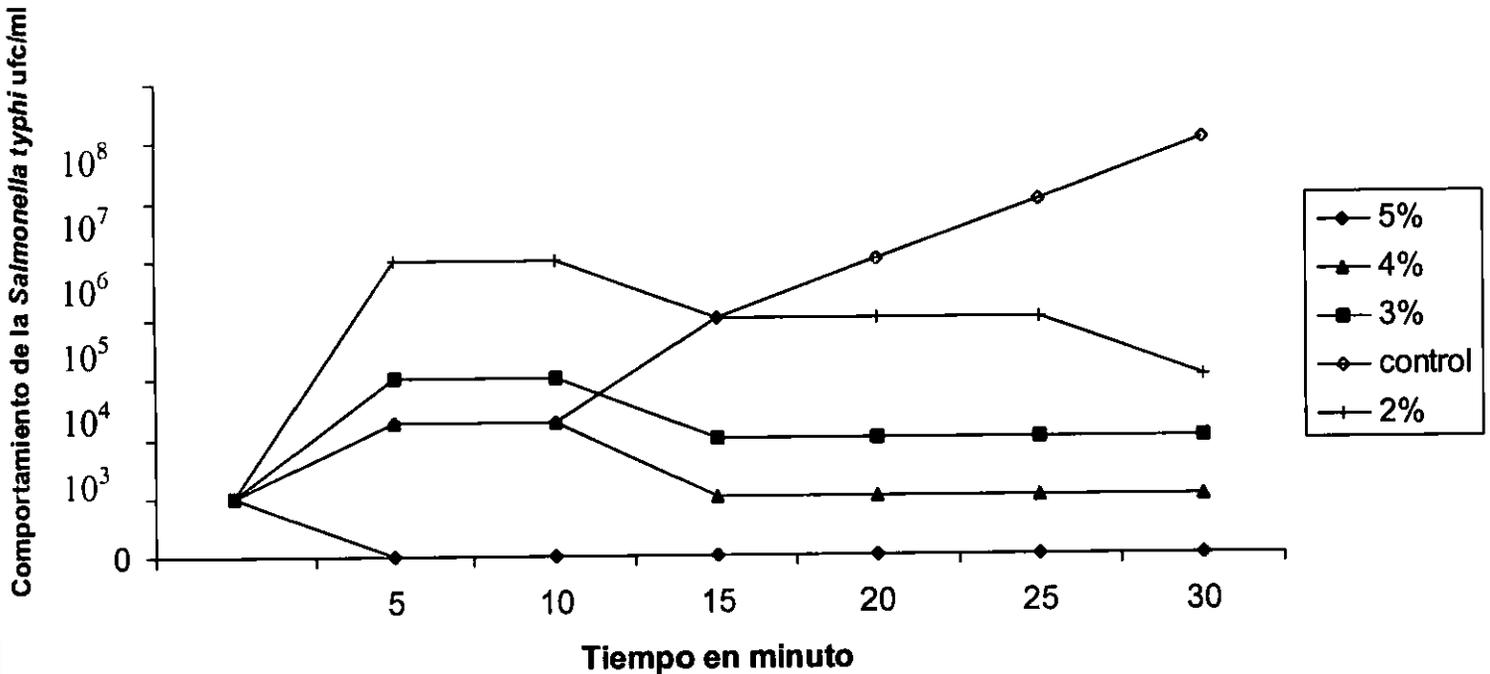
Tiempo	Protecta two		Protecta ox				Control
	1.5%	2%	2%	3%	4%	5%	
Minuto							ufc/ml
5	10^4	0	10^7	10^5	10^4	0	10^4
10	10^3	0	10^7	10^5	10^4	0	10^4
15	10^3	0	10^6	10^4	10^3	0	10^5
20	10^3	0	10^6	10^4	10^3	0	10^6
25	10^3	0	10^6	10^4	10^3	0	10^7
30	10^3	0	10^5	10^4	10^3	0	10^8

Gráfico No:1- Efectividad del protecta two a diferentes concentraciones sobre la *Salmonella typhi*.



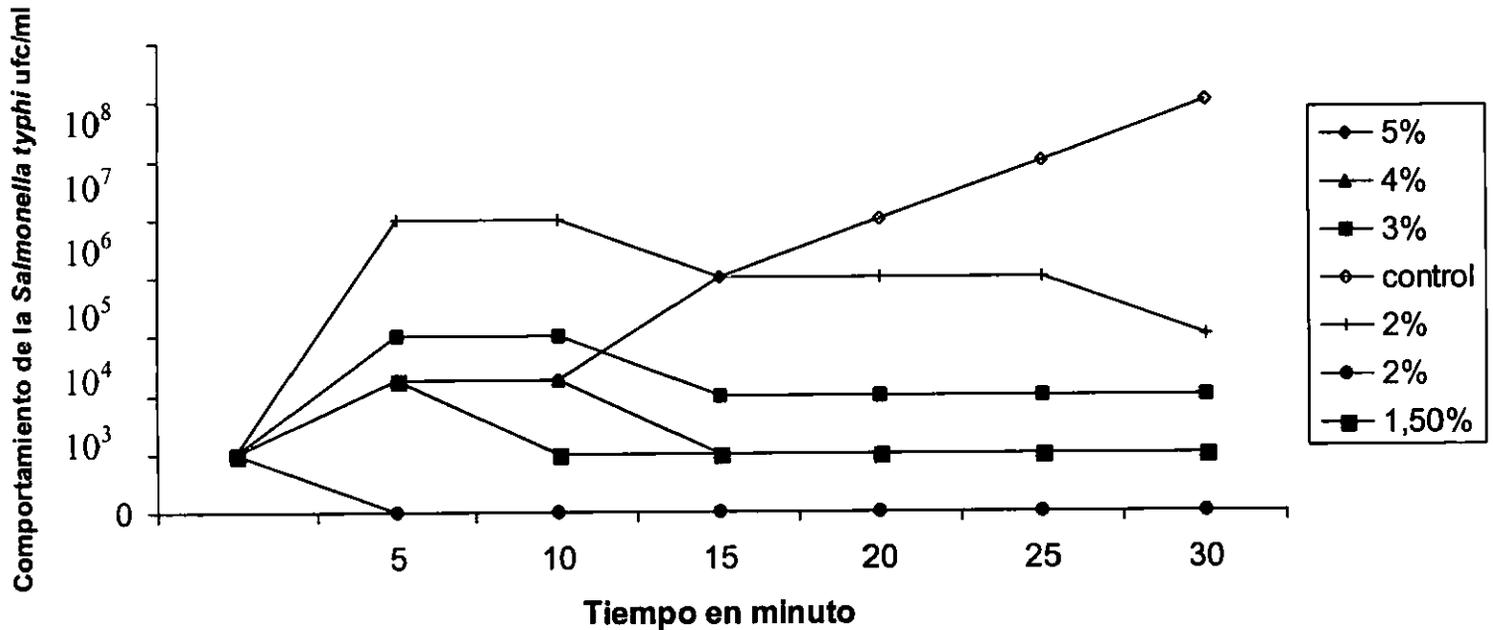
El gráfico No 1 muestra la efectividad del protecta Two al 1.5% y al 2% (agente antimicrobiano) sobre una concentración inicial de 10^7 ufc/ml de *Salmonella typhi* en Camarón *Penaeus vannamei* comparado con un control a la misma concentración. Se observa que el protecta al 1.5% no logra su efectividad aún a los treinta minutos ya que prácticamente se mantiene el mismo nivel de concentración microbiana inicial, en cambio la efectividad del protecta Two al 2% es casi de inmediato dado que la curva obtenida coincide con el eje X y a los 5 minutos que se realizó el recuento de *Salmonella typhi* fue nulo. El control aumenta con respecto al tiempo en relación con la curva obtenida durante los 5 minutos de contacto, por otro lado se observa un punto de inflexión que describe la adaptación de la bacteria en el Camarón.

Gráfico No:1- Efectividad del protecta two a diferentes concentraciones sobre la *Salmonella typhi*, en camarón *Penaues vannamei*.



El gráfico N° 2 muestra las curvas la efectividad del protecta ox a diferentes concentraciones sobre la *Salmonella typhi* en camarón *Penaues vannamei* a diferentes tiempo de contacto, partiendo de una concentración inicial de 10^7 ufc/ml . Las tres curvas del protecta ox al 2%, 3% y 4% tienen un comportamiento similar, presentando un crecimiento en etapa inicial comenzando su efectividad después de un rango de tiempo de los 10 min., la curva del protecta al 2% muestra su efecto inhibitor del crecimiento de la *Salmonella typhi* en el tiempo mencionado anteriormente llegando hasta 10^5 ufc/ml después de 30 min. de contacto. Las curvas del protecta ox al 3 % y 4% muestran una reducción de carga inicial hasta el 10^4 ufc/ml y 10^3 ufc/ml respectivamente después de 15 min. de contacto, manteniéndose constante durante los 30 minutos de contacto. La curva correspondiente al protecta al 5% muestra la mayor efectividad dado que a los 5 min. no mostró crecimiento alguno. La Muestra control, expresa un crecimiento bacteriano ascendente puesto que no contiene agente antimicrobiano llegando a los 10^8 ufc/ml a los 30 minutos de contacto.

Gráfico No: 3. Comparación de la efectividad del protecta two y protecta ox en camarón a diferentes concentraciones sobre la *Salmonella typhi*.



La gráfica No 3 muestra la comparación del comportamiento entre el protecta two y protecta ox, las características son diferentes debido a las concentraciones de aplicación y diferentes tiempos de contacto. A una concentración de 2% de ambos tipos de protecta es más efectivo el protecta two dado que a los 5 min. de contacto con el mismo, no presenta crecimiento bacteriano. El tratamiento con protecta two al 2% y con protecta ox al 5% resultaron tener la misma eficiencia dado que a los 5 minutos de contacto no se detectó ningún nivel de crecimiento bacteriano. El protecta two al 1.5% y el protecta ox al 4% a partir de los 15 min. de contacto muestran la misma efectividad antimicrobiana llegando a 10^3 a los 30 minutos de contacto.

Resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas.

Tabla No 4- Identificación bioquímicas del perfil bacteriano obtenido por el protecta two al 1.5% a diferentes tiempo de contacto.

Tiempo	TSI	LIA	UREA	CITRATO	MOVI	H ₂ S	INDOL	Microorganismo
5	K/Ag+	+	-	-	+	+	-	<i>Salmonella Typhi</i>
10	K/Ag+	+	-	-	+	+	-	<i>Salmonella Typhi</i>
15	K/Ag+	+	-	-	+	+	-	<i>Salmonella Typhi</i>
20	K/Ag+	+	-	-	+	+	-	<i>Salmonella Typhi</i>
25	K/Ag+	+	-	-	+	+	-	<i>Salmonella Typhi</i>
30	K/Ag+	+	-	-	+	+	-	<i>Salmonella Typhi</i>

Tabla No 5- Identificación bioquímicas del perfil bacteriano obtenido por el protecta two al 2% a diferentes tiempo de contacto.

Tiempo	TSI	LIA	UREA	CITRATO	MOVI	H ₂ S	INDOL	Microorganismo
5	A/Ag+	-	+	+	+	+	-	<i>Citrobacter Freundii</i>
10	A/Ag+	-	+	+	+	+	-	<i>Citrobacter Freundii</i>
15	A/Ag+	+	-	+	-	+	+	<i>E. pergusanii</i>
20	A/Ag+	-	+	-	+	+	+	<i>Citrobacter Diversus</i>
25	A/Ag+	+	-	+	-	+	+	<i>E. pergusanii</i>
30	A/Ag+	-	+	+	+	-	+	<i>Citrobacter Diversus</i>

Tabla No 6- Identificación bioquímicas del perfil bacteriano obtenido por el protecta ox al 2% a diferentes tiempos de contacto.

Tiempo	TSI	LIA	UREA	CITRATO	MOVI	H ₂ S	INDOL	Microorganismo
5	K/Ag+	+	-	-	+	+	-	<i>Salmonella Typhi</i>
10	K/Ag+	+	-	-	+	+	-	<i>Salmonella Typhi</i>
15	K/Ag+	+	-	-	+	+	-	<i>Salmonella Typhi</i>
20	K/Ag+	+	-	-	+	+	-	<i>Salmonella Typhi</i>
25	K/Ag+	+	-	-	+	+	-	<i>Salmonella Typhi</i>
30	K/Ag+	+	-	-	+	+	-	<i>Salmonella Typhi</i>

Tabla No 7- Identificación bioquímicas del perfil bacteriano obtenido por el protecta ox al 3% a diferentes tiempo de contacto.

Tiempo	TSI	LIA	UREA	CITRATO	MOVI	H ₂ S	INDOL	Microorganismo
5	K/Ag+	+	-	-	+	+	-	<i>Salmonella Typhi</i>
10	K/Ag+	+	-	-	+	+	-	<i>Salmonella Typhi</i>
15	K/Ag+	+	-	-	+	+	-	<i>Salmonella Typhi</i>
20	K/Ag+	+	-	-	+	+	-	<i>Salmonella Typhi</i>
25	K/Ag+	+	-	-	+	+	-	<i>Salmonella Typhi</i>
30	K/Ag+	+	-	-	+	+	-	<i>Salmonella Typhi</i>

Tabla No 8- Identificación bioquímicas del perfil bacteriano obtenido por el protecta ox al 4% a diferentes tiempo de contacto.

Tiempo	TSI	LIA	UREA	CITRATO	MOVI	H ₂ S	INDOL	Microorganismo
5	K/Ag+	+	-	-	+	+	-	<i>Salmonella Typhi</i>
10	K/Ag+	+	-	-	+	+	-	<i>Salmonella Typhi</i>
15	K/Ag+	+	-	-	+	+	-	<i>Salmonella Typhi</i>
20	K/Ag+	+	-	-	+	+	-	<i>Salmonella Typhi</i>
25	K/Ag+	+	-	-	+	+	-	<i>Salmonella Typhi</i>
30	K/Ag+	+	-	-	+	+	-	<i>Salmonella Typhi</i>

Tabla No 9- Identificación bioquímicas del perfil bacteriano obtenido por el protecta ox al 5% a diferentes tiempo de contacto.

Tiempo	TSI	LIA	UREA	CITRATO	MOVI	H ₂ S	INDOL	Microorganismo
5	A/Ag+	-	+	+	+	+	-	<i>Proteus enneii</i>
10	A/Ag+	-	+	+	+	+	+	<i>Citrobacter Diversus</i>
15	A/Ag+	-	+	+	+	+	+	<i>Citrobacter Diversus</i>
20	A/Ag+	-	+	-	+	+	+	<i>Proteus Vulgaris</i>
25	A/Ag+	-	+	+	+	+	+	<i>Proteus Vulgaris</i>
30	A/Ag+	-	+	-	+	+	+	<i>Proteus Vulgaris</i>

A/Ag+: Acido sobre ácido, gas positivo.

K/Ag+: Alcalino sobre ácido, gas positivo.

X-DISCUSIÓN

La efectividad de los agentes antimicrobianos estará en dependencia del tipo de agente o composición del mismo y el tiempo de contacto. Existen agentes antibacterianos que actúan de formas específicas en las bacterias provocando un efecto biostático en la células, según los resultados obtenidos en el gráfico No 1 la *Salmonella typhi*, en los primeros minutos de contacto muestra un leve crecimiento debido a la adaptación de la misma al medio mostrando una resistencia al efecto del antimicrobiano en la pared celular probablemente a la composición en nutrientes del camarón que le confieren a las mismas mayor resistencia a los bactericida al disponer de los nutrientes necesarios para su crecimiento, comportamiento que difiere cuando es tratada con una mayor concentración, actuando sobre las bacteria en forma más drástica impidiendo su desarrollo.

En gráfico No 2 se reproduce el modelo del comportamiento de la *Salmonella typhi* ante el protecta ox a diferentes concentraciones debido al fundamento anterior.

En el gráfico No 3 se observan tratamientos equivalentes entre el protecta two y ox en cuanto su efectividad probablemente debido a la diferencia en la composición de los mismos. El protecta two al 2% es equivalente al protecta ox al 5% en un rango de tiempo de contacto partiendo de 5 min. de comportamiento esperado ya que el protecta two en su composición contiene sal como elemento principal, lo que provoca una disminución de la actividad de agua en el producto limitando el crecimiento bacteriano por ósmosis al restringir las condiciones requeridas para su crecimiento, requiriendo por tanto una menor concentración que el protecta ox, justificación que podría aplicarse para el otro caso de tratamiento equivalente. En referencia a las pruebas bioquímicas y serológicas realizadas, confirman el crecimiento *Proteus enneii*, *Vulgaris Citrobacter diversus*, así como *Samonella thyphi*.

XI-CONCLUSIÓN

En los ensayos realizados en este estudio se comprobó que las recomendaciones hechas por el fabricante, sobre la efectividad de los protecta two al 2% y protecta ox al 5% por 30 min. sobre la *Salmonella typhi*, son adecuadas para el tratamiento del camarón *Penaeus Vannamei*, ya que se sometió a prueba a dichos productos antimicrobianos a concentraciones por debajo de las recomendadas con diferentes tiempos de contactos tomando como máximo los 30 min. tiempo en el cual no se observó crecimiento de *Salmonella typhi*.

Sin embargo se comprobó que el protecta two al 2% y el protecta ox al 5% con un tiempo de contacto de 5 minutos ejerce efecto antimicrobiano del 100% lo que indica que puede reducirse el tiempo de contacto con estos productos garantizando su inocuidad y mejorando los niveles de producción. Este margen de tiempo que especifica el productor de los agentes antimicrobianos puede constituir un margen de seguridad en la efectividad de los mismos de tal forma que se puede tener seguridad en el cumplimiento de las Normas y requisitos para la exportación del mismo garantizando la Salud del consumidor.

XII-RECOMENDACIONES

1-Aplicar esta metodología de comprobación de efectividad antimicrobiana con otros agentes químicos.

2-Hacer estudio en la aplicación de protecta two y protecta ox en otros alimentos.

3-Comprobar la efectividad del protecta two 2% y protecta ox 5% sobre otros tipos de bacterias.

4-Comprobar la efectividad del protecta en plantas procesadoras de alimentos utensilios, equipos, paredes, pisos.

XIII-BIBLIOGRAFÍA

- 1- ADAMS, MR and MOSS M.O; Microbiología de los alimentos; Ed, ACRIBIA, S.A , ZARAGOZA (España) ,1995, P. 248,249,250.
- 2- Canales, F. H; Metodología de la investigación; Manual para el desarrollo de personal de salud,OPS-OMS. Publicación Pasccap No 16, 1986, P. 233, 236.
- 3- López, Mayra. Adam, Charles. C, The relatives importance of Nicaragua cultured shimp within; the seafood industria, September. 2001. P. 6
- 4-Jay,M. James; Microbiología moderna de los alimentos; 3 Th ed, ACRIBIA, S.A , ZARAGOZA (España),1994,P.266,267,302,306,307,312,313,315,325.
- 5- Muñoz Fernández, Federico; Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia; Normas Técnicas de Bacteriología.3thEd; MANAGUA, NICARAGUA,1996,P.24,25 ,28.
- 6- Mac Faddin, Jean F; Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica.Ed;Médica panamericana S,A,De C.V.1991,P45,46,61,62,94,95,104,105,113,114,138,139,140,183,185,186,287,291 ,293,294,295,297,299,300.
- 7-Official Journal of the European Cumunities, of 20 May, 1994,P.L13/13.
- 8- Piura López, Julio; Introducción a la metodología de la investigación científica; Publicación científica de la escuela de la salud pública de Nicaragua. P. 34, 36, 53, 54.
- 9- Pascual Anderson, María del Rosario; Microbiología Alimentaria; Metodología analítica para alimentos y bebidas.P. 171,181, 183,194.
- 10- Silleker,J. H; Ecología Microbiana de los Alimentos; Vol I .Ed; Academic Pres. INC. New York, 1980. P. 243, 244, 245, 246, 247, 251, 252, 269, 270, 508, 588, 591, 596, 598, 599, 600, 605, 606, 607.
- 11-Sherrod, Patricia S, Hammack; Thomas S, and Amaguana R.Miguel; F.D.A Bacteriological analytical manual, 8 Th Ed; 1995, P.5.01, 5.07, 5.10,5.13.
- 12- Torres Vitela, María Refugio; Agentes Patógenos trasmitidos por alimentos; Vol.I. Ed; 1999, Universidad de Guadalajara, P. 72,73,74,76, 82,83,84,85,86, 89,90,91, 92.

13- Tabla de composición de los alimentos. Valor nutricional para Centroamerica y Panamá, P.8.

14-Urcuyo Marengo, Miguel; NICAPESCA, Revista Institucional dirección de promoción y desarrollo pesquero, N° 2 Publicación trimestral de MEDE PESCA.; Agosto 98, P. 5.

Referencia en el Internet

- 1 i. [Http: //www. iio. Ens. Uabc. mx/ química. Htm.](http://www.iio.ens.uabc.mx/quimica.htm)
- 2 i. [Http: // WWW. Vetefarm. Com. / nota. Asp? Not=224 c sec=16.](http://WWW.Vetefarm.Com./nota.Asp?Not=224&c=sec=16)
- 3 i. [http: // www. bvs. Sld. W/ revistas/ aii/ vol. 12-1 – 98/ alio 2198 htm.](http://www.bvs.sld.w/revistas/aII/vol.12-1-98/alio2198.htm)

XIV-ANEXOS

ANEXO 1

PREENRIQUECIMIENTO

El papel principal del enriquecimiento no selectivo (Preenriquecimiento) de alimento es para facilitar la reparación de células estresadas de *Salmonella* que pueden contaminar una muestra de alimentos. Esto debido tanto al escaso número en que pudieran estar presentes, como a la merma que acusan en su viabilidad. El daño subletal a las células puede ser por tratamientos térmicos, de congelación, descongelación, elevada a presión osmótica, prolongado almacenamiento en condiciones de baja humedad o elevada temperatura ambiente, variaciones en la acidez o una combinación de todos estos factores suele disminuir notablemente el número de *Salmonella* y afectar ostensiblemente la viabilidad de las sobrevivientes.

Otros factores contribuyentes son la demanda especial de nutrientes que exhiben las células dañadas, una hipersensibilidad a los agentes selectivos que suelen incorporarse a los medios de cultivo y una sensibilidad particular a las condiciones bajo a las cuales se les lleva a cabo la reactivación de las células, como ocurre específicamente con la rehidratación. El paso de prehidratar la muestra puede influir significativamente sobre la recuperación de germen. No obstante, la presencia de la flora acompañante y sustancia naturales en los alimentos puede interferir con el crecimiento y recuperación de ésta. Es generalmente aceptado que Preenriquecimiento de alimentos procesados en caldos no selectivos facilita la detección del germen con daño subletal.

Comúnmente se emplea el caldo lactosado como medio de preenriquecimiento, a pesar que la mayoría de la *Salmonella* no utilizan la lactosa, sin embargo, en una muestra de alimento cuando la flora acompañante utiliza la lactosa provoca un descenso en el pH que ejerce un efecto bacteriostático sobre sí misma, inhibiendo su desarrollo.

Durante la etapa del preenriquecimiento, el período de incubación es crítico ya que debe satisfacer los requerimientos mínimos para resucitación de células dañadas o estresada de *Salmonella*. Una precaución que debe ser observada sistemáticamente es la comprobación y eventual ajuste de pH del caldo de preenriquecimiento con el alimento y homogenizado previo a la incubación. El pH deberá encontrarse en 6.8 ± 0.2 para lo cual se ajustará, en caso necesario, con NaOH o HCL , 1N estéril.

ANEXO 2

FASE DE ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO.

Tiene como finalidad favorecer el crecimiento de células de *Salmonella ssp* en la microflora total permitiéndoles que Proliferen a la vez que se inhibe el Crecimiento de los demás microorganismos existentes. A tal fin, ha sido propuesto una Serie de medios selectivos diferentes que emplean agente Selectivo tales como: Bilis Verde brillante, Verde Malaquita, Tetrionato y Selenita. Los más universales utilizados son: el caldo Selenita Cystine que contiene Cystine con el fin de estimular el crecimiento de las *Salmonella ssp*; el Caldo Tetrionato de Muller-Kauffman, que contiene Tetrionato, Verde brillante y Bilis; y el caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) que contiene Verde Malaquita, Cloruro Magnesio y un pH ligeramente reducido como factor selectivo e ingrediente que permite la proliferación de *Salmonella* e inhibir el crecimiento de la flora asociada.

Esto medios contienen ingredientes selectivos que permiten la proliferación de *Salmonella* e inhiben el crecimiento de la flora asociada. Sin embargo algunos estudios han reportado que la detección de *Salmonella* en carnes crudas y agua de albañal fue sustancialmente mayor con un preenriquecimiento que con un enriquecimiento directo. D'Aoust Concluye que el enriquecimiento directo de las muestras de alimentos contaminados con flora acompañante no es justificado y puede dar a un falso negativo.

Pocos métodos estándar indican la suspensión directa de una muestra de alimento sospechosa de contener una alta densidad de flora competitiva en un caldo selectivo. La lógica de esta estimación se basa en la inhibición rápida de esta última y en abundante crecimiento de Salmonellas originalmente vigente en la muestra.

Sin embargo, también se puede acelerar la muerte de las pocas *Salmonella* naturalmente presentes, según el agente selectivo en el medio de enriquecimiento, favoreciendo así un falso negativo.

Los tipos de medios más utilizados para estas pruebas de enriquecimiento:

1. El caldo CTVB o medio de Kauffman, caldo tetrionato verde brillante, caldo tetrionato sulfatiazol bilis verde brillante y caldo tetrionato novobiocina .
2. Caldo selenito; caldo selenito F, caldo selenito cistina, caldo selenito verde brillante, caldo selenito sulfa verde brillante y caldo selenito dulcitol.

El verde brillante es uno de los agentes selectivos más empleados en la investigación de *Salmonellas*, se ha encontrado en el efecto inhibitorio del colorante disminuye conforme se incrementa la concentración de sales biliares en el medio, por lo que este factor es decisivo en la formulación de los medios para favorecer el desarrollo de los coliforme.

En el grupo CTVB el medio contiene una fuente de nitrógeno orgánico basado en peptona, triptona, extracto de carne o extracto de levadura adicionado, según el caso de las sales biliares o novobiocina para inhibir las bacterias gram – positiva verde brillante para inhibir además de estas bacterias a otro organismo coliforme, carbonato de calcio para regular el pH neutralizando el ácido que se va generando y tiosulfato de sodio que parcialmente pasa a tetrionato de sodio cuando se adiciona el yodo al inocular la muestra.

La presencia de reductasa en la unión membrana – tetrionato, en los géneros *Salmonellas*, *Citrobacter*, *Serratia*, y *Proteus*, proporciona una medida de la resistencia a los efectos tóxicos de $S_4 O_6$ durante el enriquecimiento. El mecanismo de acción del $S_4 O_6$ tiene un efecto tóxico al actuar en la síntesis o actividad de los grupos – SH, en los sitios activos de las enzimas involucradas en formación de la membrana y pared celular de las bacterias sensibles.

Por otro lado el caldo selenito también contiene una fuente de nitrógeno a base de triptona y peptona; los fosfatos tienen un efecto regulador del pH y la cística favorece el desarrollo de las salmonellas en presencia de el alimento inoculado.

La selectividad del medio está basada sobre las diferentes velocidades de toxicidad del selenito y sobre la presencia de selenopolinatos que se forman en el medio líquido.

El efecto inhibitorio del selenito sobre la flora asociada se debe a la capacidad de esta para fijar el selenito más rápidamente que las *Salmonella* y la posterior incorporación de ésta a las proteínas celulares como un radical sulfuro análogo que impide su proliferación, facilitando así el aislamiento de *Salmonella*.

El caldo de enriquecimiento RV, el caldo Hajna, con citrato desoxicolato de sodio como medios germicidas de coliformes y bacterias gram positivas y la incorporación del manitol para favorecer el desarrollo de *Salmonellas* sobre *Proteus*. Este caldo no debe incubarse más de 24 horas por que favorece el desarrollo de *Pseudomonas* y *Proteus*: El caldo MacConkey verde brillante fue recomendado especialmente para la especie de *S. choleraesuis*, que suele inhibirse en caldo selenito, y en caldo lactosa rojo neutro verde brillante, para el aislamiento de *Salmonella* a partir de materia fecal de vacas y cerdos, el cual, aunado al agar desoxicolato - citrato permitió la mayor recuperación de *Salmonella* entre diferentes condiciones de medios ensayados.

La temperatura de incubación afecta marcadamente la productividad del enriquecimiento selectivo por suprimir crecimiento de microorganismos competitivos pero no de *Salmonella*. Aunque los medios de enriquecimiento son incubados a 35-37°C, varios estudios han demostrado incremento en la recuperación de *Salmonella* siendo una incubación a 43° C.

ANEXO 3

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN

Como consecuencia del empleo de los medios de enriquecimiento, se obtiene después de la incubación una flora mixta en los caldos y a partir de ellos procede el aislamiento de las *Salmonella*. En esta etapa se utiliza un agar selectivo que deberá mantener un efecto inhibitorio sobre la flora asociada, estimular la formación de colonias de *Salmonella* y finalmente comunicar características diferenciales respecto a las colonias de otros gérmenes. La incubación de las placas se lleva a cabo a 35°C, y en atención de su fuerza selectiva se construyen tres grupos:

- 1 - Ligeramente selectivo: agar endo, agar EMB y medio de MacConkey.
- 2 – Moderadamente selectivo: agar DCLS, agar SS, agar XLD.
- 3 – Fuertemente selectivo agar verde brillante y agar sulfito de bismuto.

En el estudio se utilizó agar SS, este medio es una modificación del agar DCLS, en el cual la inhibición de los Gram positivos se logra con las sales biliares en lugar del soxicolato y del verde brillante que retarda el desarrollo de muchas cepas coliformes. Las colonias de lentos fermentadores de lactosa y no fermentadores del tipo de *Proteus* y *Pseudomonas*, forman colonias muy semejantes a las de *Salmonellas* especialmente el primero con quien comparte en muchos casos incluso una coloración negra debido a la producción del ácido sulfhídrico. Tal es la función del citrato férrico en el medio, una sal de ácido débil a partir del cual el H₂S formado desplaza el ión citrato férrico negro. Las colonias rojas corresponden a las fermentadoras de lactosa por virar del indicador rojo neutro incorporado en el medio.

Método rápido para la identificación de la *Salmonella*.

Las técnicas convencionales para la recuperación de *Salmonella* pueden tomar de tres a cuatro días para producir resultados negativos y hasta siete días, para confirmar resultado positivo. La naturaleza prolongada de este procedimiento a permitido el desarrollo de varios métodos rápidos para la detección de células de *Salmonella* en productos alimenticios.

Método para el aislamiento rápido de *salmonella ssp.*

1. Técnica de anticuerpo fluorescente.
2. Método de filtro por membrana hidrofóbica.
3. Método (por isótopos) de hibridación de DNA.
4. Método (Colorimétrico) de hibridación de DNA.
5. Inmunoensayo (Colorimétrico) de enzimas monoclonales.
6. Inmunoensayo (Fluorogénico) de enzima monoclonales.
7. Inmunoensayo (Colorimétrico) de enzima policlónales.
8. Inmunodifusión.

Método para la identificación rápida de *salmonella ssp.*

- 1) API 20E.
- 2) Enterobacteriaceas II.
- 3) Enterotubo II.
- 4) Sistema micro-ID.

Estos sistemas están basados en el simple, pero elegante concepto del uso de pequeñas cantidades de reactivo e inóculo concentrado para acelerar la reacciones bioquímicas, que sirven para identificar la cepa. La reacción de cadena polimerasa proporciona una mejor alternativa que otros métodos, no requiere pasos previos para el diagnóstico y ofrece rapidez y sensibilidad (detecta 10^7 células).

ANEXO 4

Pruebas Bioquímicas

Las pruebas de identificación bioquímica son no selectivas y generalmente establecen diferencia bioquímicas a través del cambio de color en el medio. La producción de sulfuro de hidrógeno la utilización de unos o más carbohidratos fermentables en el medio.

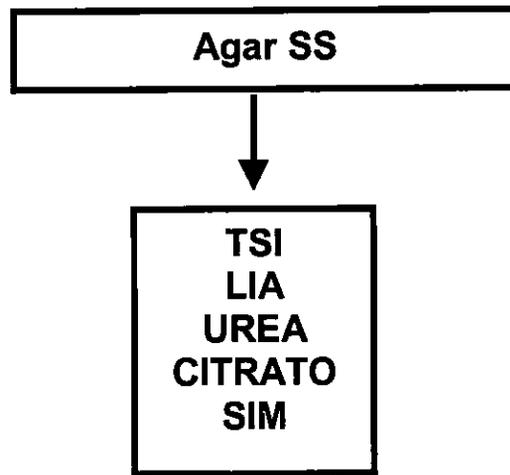
Dos diferentes medios en el tubo son utilizadas: el Agar triple hierro azúcar (TSI), que mide la producción de Sulfuro de Hidrógeno (H_2S) y la utilización de Glucosa, Lactosas Sacarosa y el Agar de Hierro y Lisina (LIA), que mide la utilización de sulfuro de Hidrógeno y la descarboxilación de Lisina.

Estos medios son utilizados simultáneamente para identificación preliminar de *Salmonella ssp.*

El patógeno *Salmonella ssp* da reacciones negativas al Índol y Urea. Lisina descarboxilasa, Positiva. La *Salmonella typhi* no utiliza Citrato como única fuente de carbonos, la reacción es ambigua (positiva o negativa).

En medio SIM muestra una movilidad positiva. Cada uno de los medios utilizados para las Pruebas Bioquímicas se inocula por estría excepto el TSI que se realiza por estría y punción. Los resultados de las pruebas bioquímicas se compararon con la tabla N° 2. Del Ministerio de Salud Tercera edición 1996

Esquema de las Pruebas Bioquímicas para la *Salmonella ssp.*



ANEXO 5

MÉTODO CONVENCIONAL.

- 1- Prepare la solución de los Protecta TWO y OX.
- 2- Introduzca el Camarón entero en cada concentración de protecta por 30 Min.
- 3- Macerar los 25g de Camarón tomada e incorpórela en 225ml de Caldo Lactosado por 24 h a 37°C.
- 4- 1 ml de muestra (Caldo Lactosado) para cada caldo de enriquecimiento Selenito Cystine por 24 h a 37°C y Tetracionato, Rappaport Vassiliadis a 43°C.
- 5- Tomar una muestra de cada caldo para hacer la siembre en Platos con medio de Agar S.S. y incubarlo por 24 h a 37°C.
- 6- Realice lectura de crecimiento de colonias (ufc/cc) en el medio selectivo.
- 7-Tomar aquellas colonias de color negro (Sospecha de *Salmonella ssp*) que crezcan de forma aislada en el medio SS e inocular en la Prueba Bioquímica y se incuba por un periodo de 24 h x37°C.

ANEXO 6**PRUEBAS SEROLÓGICAS.**

Las pruebas serológicas con antisuero polivalente es una reacción positiva, para *Salmonellas* se toma una pequeña gota de solución salina estéril sobre un porta objeto limpio y preparar una suspensión homogénea y tomar una muestra del medio TSI. Adicionar una gota de volumen similar del anticuerpo y mezclar con el asa; mover suavemente el porta objeto de manera que la mezcla corra a lo ancho del mismo durante unos 30 segundos y observar sobre el fondo oscuro la formación de grumos de aglutinación (a continuación se detallan)

- 1-) Se toman dos muestra del TSI con una asa de platino y se coloca cada muestra en los extremos de la porta objeto esparcida con un isopo.
- 2-) A cada muestra se le pone una gota de solución salina para fijar.
- 3-) Una de las muestras servirá como blanco, a esta no se le adiciona la gota de la Prueba serológica.
- 4-) La segunda muestra será analizada con el suero de serología.
- 5-) Después de adición del suero se agita con el isopo por un período de un minuto.
- 6-) Si hay aglutinamiento, la muestra es positiva de *Salmonella typhi*.

ANEXO 7

**FLUJOGRAMA PARA EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE
SALMONELLA EN CAMARON.**

Etapa	Alimento	
	Inmersión del camarón por Un minuto en agua de mar (Dilución de 10^{-7} ufc/ml <i>Salmonella typhi</i>)	
Preenriquecimiento	25g / 225ml	caldo lactosado
	35 -37°C	18-24h
Enriquecimiento	Caldo tetrionato, selenito, RV	
	37-43°C	18-24h
Aislamiento	Agar SS	
	35-37°C	24-48h
Identificación Bioquímica	TSI, LIA, UREA, CITRATO, SIM	
	35-37°C	24h
Serología	Antisuero polivalente	

GLOSARIO

Anaerobio Facultativo: Bacteria que crece con o sin presencia de oxígeno.

ATP: Trifosfato de adenosina.

Bacteria: Organismo microscópico y unicelulares que se multiplica previamente por fisión binaria y carecen de clorofila.

Bacteria gram-negativa: Pierde la coloración primaria con la tinción de gram, son de colorados por el alcohol y toman el color de contraste final (safranina) dando un color rosa rojizo.

Bioestático: Efecto que ejerce algunos desinfectantes sobre la célula bacteriana que sólo detiene por un tiempo determinado la multiplicación bacteriana, es reversible.

Bactericida: Sustancia o agentes químicos que resulta letal para la bacteria, que destruye la bacteria, es irreversible.

Caldo: Medio de cultivo para bacteria heterotróficas compuesto por elementos nutritivos esenciales; líquido.

C.R.V : Caldo Rappaport Vassiliadis.

CSC; Caldo Selenito cistina.

CTVB: Caldo tetratiónato verde brillantes.

DCLS: Agar desoxicolato citrato.

Desinfectantes: Agentes químicos que mata a los microorganismos infecciosos.

EMB: Agar eosina-azul de metileno.

ELISA: Prueba de inmunoadsorción ligada a enzima.

EE.UU: Estados Unidos de Norte América.

ENDO: Fucsina (indicador de Andrade).

Enriquecimiento: Adición de sustancias como los factores de crecimiento (x,v) vitaminas o materiales como la sangre a los medios de cultivo para favorecer el desarrollo de microorganismo rebeldes.

Enterobacteriaceae: Familia de bacilo entéricos gram-negativo que no forman esporas y fermentan la glucosa crecen bien en medio artificiales , forman ácido y gas apartir de la glucosa , reduce los nitratos, tienen motilidad o no, son oxidasa negativo ;comúnmente se les denominan bacilos enterito (relación con los intestino)

F.D.A: Food Drug American

Índole: Benzo pirrol $C_6H_4NHCH:CH:$ producido por las descomposición del triptófano y otros compuesto afines por cierto microorganismo.

Inóculo: Material que contiene microorganismos que van hacer introducidos o transferidos a un medio de cultivo.

Isotónico: Elevación de la presión osmótica en las células bacterianas cuando son efectuadas por sales.

LIA : Agar de Hierro Lisina.

Lipasa: Enzima que pertenece al grupo esterasa de la hidrolasa, que descompone la grasa en ácido ácidograso y glicerol.

Medio de cultivo: Sustancia alimenticia artificiales que se utilizan para el cultivo de bacteria.

Oxidasa: Enzima que pertenece al grupo de la desmolasa y que transfieren hidrógeno directamente de su sustrato al oxígeno.

Organismo: Espécimen biológico viviente.

Proteolíticas: Bacteria que degradan y utilizan la proteína como fuentes de nutrientes y de carbono orgánico permitiendo así su multiplicación bacteriológica.

Plasmólisi: Encogimiento de los tejidos cuando se produce saturaciones con sustancia reductora de la actividad de agua.

Putrefacción: Descomposición de las proteína por bacterias que producen olores desagradables.

PCR: Reacción de cadenas polimerasas.

Sacarolíticas: Bacteria reductora de los azúcares.

SIM : Ácido Sulfídrico (H_2S) Índole, Movilidad.

SS : Agar Salmonella-Shigella.

Triptófano: Ácido alfa -amino-3-indolpropionico: C_8H_6N . Da índole cuando es metabolizados por cierta bacteria y es también un nutrientes requerido por algunas de ellas.

TSI : Agar Triple Azúcar Hierro.

U.E : Unión Europea.

Urea: Compuesto nitrogenado soluble cristalina: carbamida, CH_4ON_2 .

