

# **Efecto del Sistema de Nebulización “Aqualife” sobre el crecimiento de microorganismos en Pescado Fresco**

**TERESA PÉREZ BERIAIN**

**JOSÉ ANTONIO BELTRÁN GRACIA**

**Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos**

**Facultad de Veterinaria**

**Universidad de Zaragoza**

# **Índice**

I. Introducción.....	1
II. Objetivos .....	6
III. Material y métodos .....	7
IV. Resultados .....	10
V. Referencias Bibliográficas.....	13



## I. INTRODUCCIÓN

### Deterioro microbiológico

#### 1. El pescado como sustrato del crecimiento microbiano.

La gran diversidad de hábitat así como la gran variedad de prácticas de procesado son factores importantes que determinan la contaminación inicial del pescado y sus productos. La parte de la microflora que, en último lugar, se desarrollará en el producto siendo responsable de su alteración, va a depender de una serie de parámetros extrínsecos e intrínsecos (Gram y Huss, 1996).

Entre los factores intrínsecos más importantes destacan (Gram y Huss, 1996):

- La naturaleza poiquiloterma del pescado, que permite la proliferación de bacterias con un amplio intervalo de temperaturas de crecimiento.
- El elevado pH del músculo postmortem. La mayoría de las especies de pescado contienen menos del 0,5% de carbohidratos en el músculo, por lo que solamente se produce una pequeña cantidad de ácido láctico tras la muerte del animal, resultando un pH final alto, normalmente  $>6$  (Gram y Huss, 1996). Este hecho tiene importantes consecuencias en la microbiología del pescado, ya que el valor de pH alcanzado no constituye ninguna barrera ni previene el desarrollo de las bacterias causantes del deterioro.
- La presencia de grandes cantidades de nitrógeno no-protéico (NNP). La fracción de NNP está formada por compuestos de bajo peso molecular que contienen nitrógeno, hidrosolubles y de naturaleza no protéica, tales como aminoácidos libres y nucleótidos. Estos compuestos son fácilmente atacables por los microorganismos y constituyen un sustrato disponible para su crecimiento. La fracción NNP constituye el 9-18% del Nitrógeno total presente en peces teleósteos (Borrensen *et al.*, 1990)



El óxido de trimetilamina (OTMA) forma parte de la fracción NNP, y se encuentra presente en especies marinas (Hebard *et al.*, 1982), así como en algunas de agua dulce (Gram *et al.*, 1989; Anthoni *et al.*, 1990). La alteración del pescado fresco está influenciada por la presencia de este compuesto, sobre todo en condiciones de ausencia de oxígeno, ya que gran número de microorganismos responsables del deterioro (como *S. putrefaciens*, *P. phosphoreum* y *Vibrionaceae*) son capaces de utilizar el OTMA como aceptor terminal de electrones en la respiración anaerobia, dando lugar a la formación de trimetilamina (TMA).

Un importante factor extrínseco es la temperatura de almacenamiento, ya que influye en la actividad de los microorganismos, principales responsables de la alteración del pescado fresco, tanto de forma directa (tasa de crecimiento, actividad enzimática) como indirecta (solubilidad de solutos, difusión de iones, propiedades coloidales) (Oppenheimer, 1970).

Como es sabido, el uso de temperaturas de refrigeración permite alargar considerablemente la vida útil del pescado fresco al retrasar la actividad microbiana, limitándola además principalmente a bacilos psicrótrofos gram-negativos (Klinge, 1960; Shewan, 1971). Un incremento en la temperatura de almacenamiento provoca un cambio en la composición de la flora, proliferando distintas especies de las familias *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae*, así como bacterias gram-positivas que se convierten en los responsables del deterioro del producto (Gram *et al.*, 1987; Gram *et al.*, 1990; Liston, 1992).

## 2. Invasión microbiana

El músculo de un pez sano recién capturado es estéril. Cuando un pez muere, el sistema inmune colapsa y las bacterias proliferan libremente, colonizando masivamente la base de las escamas. Durante el almacenamiento, las bacterias invaden el músculo penetrando entre las fibras musculares. Murray y Shewan (1979), encontraron que sólo un número muy limitado de



bacterias invade el músculo durante el almacenamiento en hielo. Ruskol y Bendsen (1992) mostraron mediante exámenes microscópicos que las bacterias pueden ser detectadas en el músculo cuando el número de microorganismos en la superficie de la piel incrementa por encima de las  $10^6$  ufc/cm<sup>2</sup>. Este resultado fue observado tanto en el almacenamiento en hielo como en ambiente refrigerado. No se encontró diferencia entre los patrones invasivos de las bacterias específicas del deterioro (por ejemplo *S. putrefaciens*) y las no específicas del deterioro.

Dado que sólo un número limitado de microorganismos realmente invade el músculo y el crecimiento microbiano se lleva a cabo principalmente en la superficie, el deterioro es probablemente una consecuencia de la difusión de enzimas bacterianas hacia el interior del músculo y de la difusión externa de nutrientes.

El pescado se deteriora a velocidades muy diferentes y se ha propuesto como explicación las diferencias en las propiedades de la superficie del pescado. Las pieles de los peces tienen texturas muy diferentes. Así, el merlán (*Merlangius merlangus*) y el bacalao, que tienen una cubierta muy frágil, se deterioran rápidamente en comparación con algunos peces planos como la platija (*Pleuronectes platessa*), que posee una dermis y una epidermis robustas. Además, este último grupo cuenta con una gruesa cubierta de mucus, que contiene algunos compuestos antibacterianos, como anticuerpos, complementos y enzimas bacteriolíticas (Murray y Fletcher, 1976; Hjelmund et al., 1983).

### **3. Microorganismos que intervienen en el deterioro.**

Los microorganismos en el pez vivo o recién capturado se localizan en la superficie externa (piel y agallas) y en el intestino. La flora bacteriana que se encuentra en el pescado recién capturado depende del ambiente en el que se capture el pez más que de la especie (Shewan, 1977). Las bacterias presentes



en pescado de aguas templadas se clasifican según su temperatura de crecimiento como psicrótrofos o psicrófilos, y está dominada por bacilos gram-negativos que pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella* y *Flavobacterium*. Miembros de la familia *Vibrionaceae* (*Vibrio* y *Photobacterium*) y de la familia *Aeromonadaceae* (*Aeromonas* spp.) son igualmente bacterias típicas de la flora del pescado. También se encuentran microorganismos gram-positivos como *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* y corineformes en proporciones variables (Huss, 1995). En pescado de aguas cálidas, se encuentran mayor número de mesófilos, y una mayor proporción de gram-positivos y bacterias entéricas, aunque la flora sigue siendo similar a la hallada en pescado de aguas templadas (Liston, 1980). *Aeromonas* spp. son típicas del pescado de agua dulce, mientras que *Vibrio* y *Photobacterium* lo son de agua marina.

La composición de la flora cambia dramáticamente durante el almacenamiento, ya que las condiciones particulares de temperatura, modificación de la atmósfera, porcentaje de sal, actividad de agua, presencia de conservantes, etc., determinan que de la totalidad de la flora presente, tan sólo una pequeña parte llegue a proliferar y sea responsable de producir alteraciones en el alimento (Mossel e Ingram, 1955). Westerdijk (1949) denominó esta fracción “asociación microbiana de alteración”, que en el caso del pescado, tal y como lo describen la mayoría de los autores, se compone principalmente de bacilos psicrotrofos gram-negativos. Huss (1995), establece una clara diferencia entre los términos “flora asociada al deterioro”, referido a aquellas bacterias presentes en el pescado en el momento del deterioro; y “microorganismos del deterioro”, que son los que de forma específica producen la alteración.

La asociación microbiana de alteración que se desarrolla en el pescado almacenado en condiciones aeróbicas en refrigeración consiste típicamente en bacilos no-fermentativos psicrotrofos gram-negativos, compuestos casi exclusivamente por *Pseudomonas* spp. y *Shewanella putrefaciens*. Esto es así



para todo el pescado y marisco de aguas templadas (Levin, 1968; Gram *et al.*, 1987) y cálidas (Lannelongue *et al.*, 1982; Gram *et al.*, 1990; Lima dos Santos, 1978; Shamshad *et al.*, 1990). *Shewanella putrefaciens* se ha identificado como el microorganismo específico del deterioro de especies marinas procedentes de aguas templadas conservadas en hielo (Stenström y Molin, 1990; Gram y Huss, 1996). *Pseudomonas* spp. son los microorganismos específicos de la alteración de pescado de aguas dulces cálidas (Lima dos Santos, 1978; Gram *et al.*, 1990) y, junto con *S. putrefaciens*, los responsables del deterioro de especies marinas de aguas cálidas conservadas en hielo (Gillespie y MacRae, 1975; Gram, 1992).



## II. OBJETIVOS

### Objetivo

Estudiar el efecto del Sistema de Nebulización “Aqualife” sobre el crecimiento de microorganismos en pescado fresco mantenidos en refrigeración.

Según la legislación vigente (Recopilación de normas microbiológicas de los alimentos y asimilados y otros parámetros físico-químicos de interés sanitario (actualizado a enero de 2006) y Reglamento (CE) no 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios), los límites máximos para los “Productos de la pesca frescos, salpresados, refrigerados y congelados” son:

- Aerobios mesófilos:  $10^6$  ufc / g
- Enterobacterias:  $10^3$  ufc / g
- Salmonella Shigella: Aus. /25 g

Con respecto a estos límites nosotros elaboramos nuestros métodos de estudio.



### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### Material

Nuestro estudio consiste en el estudio microbiológico de tres lotes de dorada (*Sparus aurata*) de acuicultura (4 días después del sacrificio), de nueve ejemplares por lote, peso medio 400-600 g.

Estos tres lotes son:

- Lote 1. Es el lote CONTROL, los análisis de este lote se hace justo después del momento de la compra.
- Lote 2. Mantenido en refrigeración con hielo y a temperatura ambiente durante 8 horas.
- Lote 3. Mantenido en refrigeración con hielo y a temperatura ambiente durante 8 horas + sistema “Aqualife”

#### Métodos de análisis y muestreo microbiológico

Se realizó un análisis microbiológico de los tres lotes por duplicado.

##### 1. Recuento de microorganismos aerobios mesófilos:

Se tomaron 10 g de músculo y piel, se diluyeron en 90 ml de agua de peptona (0,1%) con 1% de NaCl.

Todo ello fue homogeneizado en Stomacher (400 Circulator) durante 90 segundos a 230 rpm (dilución -1). Se realizaron diluciones seriadas (-2, -3 y -4). Se sembró por duplicado por homogeneización en masa con Agar PCA (Plate-Count-Agar) con una adición de 1% NaCl, se incubaron en estufa (P-Selecta) durante 72 horas a 30° C en aerobiosis y se realizó el recuento.

##### 2. Recuento de microorganismos aerobios psicrótrofos:

Se tomaron 10 g de músculo y piel y se diluyeron en 90 ml de agua de peptona (0,1%) con 1% de NaCl.



Todo ello fue homogeneizado en Stomacher durante 90 segundos a 230 rpm (dilución -1). Con micropipeta se realizaron diversas diluciones (-2, -3 y -4). Se sembró por duplicado 1ml en cada placa petri añadiéndole 20 ml de Agar PCA (Plate-Count-Agar) con 1% NaCl y se homogeneizaron las placas, llevándolas posteriormente a una incubadora donde permanecieron 7 días a 10° C en aerobiosis (psicrótrofos).

Se realizó el recuento de todas las colonias que crecieron en las placas petri.

### **3. Recuento de enterobacterias:**

Se tomaron 10 g de músculo y piel y se diluyeron en 90 ml de agua de peptona (0,1%) con 1% de NaCl.

Todo ello fue homogeneizado en Stomacher durante 90 segundos a 230 rpm (dilución -1). Con micropipeta se realizaron diversas diluciones (-2, -3 y -4). Se sembró por duplicado 1 ml en cada placa petri añadiéndole 20 ml de Agar VRBD (cristal Violeta, Rojo neutro, sales Biliares y Dextrosa) con 1% NaCl y se homogeneizaron las placas. Una vez seco el agar, se añade una doble capa para evitar el crecimiento de microorganismos invasores. Posteriormente se llevan a una incubadora donde permanecieron 24 horas a 30° C en aerobiosis.

Se realizó el recuento de todas las colonias que crecieron en las placas petri.

### **4. Presencia de *Salmonella/Shigella***

Se llevó a cabo el PREENRIQUECIMIENTO tomando 25 g de músculo y piel en 225 ml de agua de peptona (1%) con 1% de NaCl. Todo ello fue homogeneizado en Stomacher durante 90 segundos a 230 rpm, se dejó incubar durante 24 horas a 37 °C.

Posteriormente se realizó el ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO, del preenriquecimiento se siembra en Caldo Tetrionato [I + IK 2%] + 1% NaCl



(más específico para *Shigella*), y en caldo Rappaport Vassiliadis + 1% NaCl, se llevan a incubar a 37 y 43 °C durante 24 horas.

Al día siguiente se procedió al AISLAMIENTO: cada uno de los tubos incubados se aislan en Agar Verde Brillante y en Agar XLD.

Por último, con las colonias características se realizó la identificación mediante pruebas bioquímica.



## IV. RESULTADOS

### 1. Recuento de microorganismos aerobios mesófilos:

#### Descriptivos

##### RECuento

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	18	10316,67	2434,072	573,716	9106,23	11527,10	7350	15000
2	18	14016,67	3512,247	827,845	12270,07	15763,27	10000	20000
3	18	6933,33	686,851	161,892	6591,77	7274,90	6000	7500
Total	54	10422,22	3812,376	518,799	9381,64	11462,80	6000	20000

#### ANOVA

##### RECuento

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	451863333	2	2,3E+008	36,183	,000
Intra-grupos	318450000	51	6244117,6		
Total	770313333	53			

El análisis estadístico mediante un ANOVA (análisis de varianza) de los recuentos obtenidos, puso de relieve un efecto muy significativo ( $p > 99\%$ ) del tratamiento aplicado, resultando un mayor recuento para las muestras no tratadas con el Sistema "Aqualife" (que incluso duplicaba el recuento de las tratadas con el Sistema "Aqualife").

Comparando estos recuentos con la cantidad de bacterias que presentaba el lote control se observa claramente que con el tratamiento los recuentos disminuyen significativamente (de  $1 \times 10^4$  ufc / g a  $6,93 \times 10^3$  ufc / g, o lo que es lo mismo, casi un ciclo logarítmico), mientras que el no tratar las muestras aumenta el recuento (de  $1 \times 10^4$  ufc / g a  $1,4 \times 10^4$  ufc / g).



En resumen:

	ufc / g de PESCADO
<b>CONTROL</b>	$1 \times 10^4$ ufc / g
<b>SIN "AQUALIFE"</b>	$1,4 \times 10^4$ ufc / g
<b>CON "AQUALIFE"</b>	$6,9 \times 10^3$ ufc / g

## 2. Recuento de microorganismos aerobios psicrótrofos:

### Descriptivos

#### RECUENTO

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	18	20075,00	3589,906	846,149	18289,78	21860,22	15000	25000
2	18	24341,67	4909,452	1157,169	21900,25	26783,08	18650	31500
3	18	14258,33	2772,621	653,513	12879,54	15637,13	10000	18000
Total	54	19558,33	5633,104	766,568	18020,79	21095,87	10000	31500

### ANOVA

#### RECUENTO

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	922270000	2	4,6E+008	30,964	,000
Intra-grupos	759518750	51	14892525		
Total	1,68E+009	53			

El análisis estadístico de los datos obtenidos en los recuentos de los aerobios psicrótrofos es similar que en los mesófilos. El efecto es muy significativo ( $p > 99\%$ ) según el tratamiento aplicado, resultando un mayor recuento también para las muestras no tratadas con el Sistema "Aqualife".

En este caso los recuentos disminuyen muy significativamente del lote control al lote tratado (de  $2 \times 10^4$  ufc / g a  $1,4 \times 10^4$  ufc / g) mientras que el no tratar las muestras aumenta el recuento (de  $2 \times 10^4$  ufc / g a  $2,4 \times 10^4$  ufc / g).



En resumen:

	<b>ufc / g de PESCADO</b>
<b>CONTROL</b>	$2 \times 10^4$ ufc / g
<b>SIN "AQUALIFE"</b>	$2,4 \times 10^4$ ufc / g
<b>CON "AQUALIFE"</b>	$1,4 \times 10^4$ ufc / g

### 3. Recuento de enterobacterias:

	<b>ufc / g de PESCADO</b>
<b>CONTROL</b>	< 10 ufc / g
<b>SIN "AQUALIFE"</b>	< 10 ufc / g
<b>CON "AQUALIFE"</b>	< 10 ufc / g

No se encontraron recuentos de Enterobacterias en ninguno de los tres lotes.

### 4. Presencia de *Salmonella/Shigella*

Ausencia de *Salmonella* y *Shigella* en 25 g de pescado.



## V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anthoni, U., Borrensen, T., Christophersen, C., Gram, L. and Nielsen, P.H. 1990. Is trimethylamine oxide a reliable indicator for the marine origin of fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 97B: 569-571.

Gillespie, N.C. and MacRae, I.C. 1975. The bacterial flora on some Queensland fish and its ability to cause spoilage. *Journal of Applied Bacteriology*, 39: 91-100.

Giménez, B. (2003). Envasado de especies de Acuicultura en atmósferas modificadas para su comercialización. Tesis doctoral.

Gram, L., Trolle, G. and Huss, H.H. 1987. Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0 °C) and high (20 °C) temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 4: 65-72.

Gram, L., Oundo, J. and Bon, J. 1989. Storage life of Nile perch (*Lates niloticus*) dependent on temperature and initial bacterial load. *Tropical Science*, 29: 221-236.

Gram, L., Wedell-Neergaard, C. and Huss, H.H. 1990. The bacteriology of fresh and spoiling lake Victorian Nile perch (*Lates niloticus*). *International Journal of Food Microbiology*, 10: 303-316.

Gram, L. and Huss, H.H. 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 121-137.

Hebard, C.E., Flick, G.J. and Martin, R.E. 1982. Occurrence and significance of trimethylamine oxide and its derivatives in fish and shellfish. In: *Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products*. Martin, R.E., Flick, G.J. and Ward, D.R. (eds.). AVI Publishing, Westport, CT pp. 149-272.

Hjelmland, J., Christie, M. And Raa, J. 1983. Skin mucous protease from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). 1. Biological significance. *Journal of Fish Biology* 23: 13-22.

Huss, H.H. 1995. Assessment of fish quality. In: *Quality and quality changes in fresh fish*. FAO Fisheries Technical Paper, No. 348. H.H. (ed).



Klinge, K., 1960. Differential techniques and methods of isolation of *Pseudomonas*. *Journal of Applied Bacteriology*, 23 (3): 442-462.

Lannelongue, M., Hanna, M.O., Finne, G., Nickelson, R. and Vanderzant, G. 1982. Storage characteristics of brown shrimp (*Panaeus aztecus*) stored in retail packages containing CO<sub>2</sub>- enriched atmospheres. *Journal of Food Science*, 47: 911-926.

Levin, R.E. 1968. Detection and incidence of specific species of spoilage bacteria on fish. I. Methodology. *Applied Microbiology*, 16: 1734-1742.

Lima dos Santos, C.A.M. 1978. Bacteriological spoilage of iced Amazonian freshwater catfish (*Brachyplatistoma vaillanti valenciennes*). Ms.Sc.Thesis. Loughborough University of Technology, England.

Liston, J. 1980. Microbiology in fishery science. In: *Advances in Fish Science and Technology*. Connell, J.J. (ed). Fishing News Books, Ltd., Surrey (England). pp. 138-157.

Liston, J. 1992. Bacterial spoilage of seafood. In: *Quality Assurance in the Fish Industry*. H.H. Huss, M. Jacobsen and J. Liston (eds). Proceedings of an International Conference, Copenhagen, Denmark, August 1991. Elsevier, Amsterdam. pp. 93-105.

Mossel, D.A.A. and Ingram, M. 1955. The physiology of the microbial spoilage of foods. *Journal of Applied Bacteriology*, 18: 232-240.

Murray, C.K. and Shewan, J.M. 1979. The microbial spoilage of fish with special reference to the role of psychrotrophs. In: *Cold tolerant microbes in spoilage and the environment*. Russell, A.D. and Fuller, R. (eds). Academic Press, 117-136.

Murray, C.K. and Fletcher T.C. 1976. The immunohistochemical location of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa L.*) tissues. *Journal of Fish Biology* 9: 329-334.

Oppenheimer, C.H. 1970. Temperatura. In: *Microbial Ecology*, vol. 1. Kinne, O. (ed.). Wiley, New York (USA). pp. 347-361.

Reglamento (CE) no 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios



Ruskol, D. and Bendsen, P. 1992. Invasion of *S. putrefaciens* during spoilage of fish. M.Sc. Thesis, Technological Laboratory and the Technical University, Denmark.

Shamshad, S.I., Kher-un-Nisa, Riaz, M., Zuberi, R. And Qadri, R.B. 1990. Shelf life of shrimp (*Penaeus merguensis*) stored at different temperatures. Journal of Food Science, 55: 1201-1205, 1242.

Shewan, J.M. 1971. The microbiology of fish and fishery products - A progress report. Journal of Applied Bacteriology, 34 (2): 299-315

Shewan, J.M. 1977. The bacteriology of fresh and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action. In: Handling, Processing and Marketing of Tropical Fish. Tropical Products Institute, London. pp. 51-66.

Stenström, I.M. and Molin, G. 1990. Classification of the spoilage flora of fish, with special reference to *Shewanella putrefaciens*. Journal of Applied Bacteriology, 68: 601-618.

Westerdijk, J. 1949. The concept "Association" in mycology. Antonie van Leeuwenhoek, 15:187-190.