

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

Facultad de Ciencias Agrarias
Escuela de Ingeniería en Alimentos

Presencia de Bacterias Saprofitas y Patógenas en Piel y Branquias de Pescado Fresco

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Licenciado en Ingeniería en Alimentos.

Profesor Patrocinante : Sra. Renate Schöbitz Twele - Tecnólogo Médico, M. Sc. -
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos - Facultad de Ciencias Agrarias.

Alejandra Jeannette Díaz Jaramillo

Valdivia Chile 2004

Contenido

Profesores Informantes . .	1
Dedicatoria .	3
Agradecimientos .	5
RESUMEN .	7
SUMMARY .	8
1. INTRODUCCION .	9
2. REVISION BIBLIOGRAFICA . .	11
2.1. Flora bacteriana de los peces . .	11
2.2.Características de los peces .	15
2.3.Proceso de deterioro del pescado .	16
2.4. <i>Dissostichus eleginoides</i> (bacalao) . .	19
2.5. <i>Genypterus chilensis</i> (congrío colorado) .	21
3. MATERIAL Y METODOS .	25
3.1. Técnica de toma de muestra para recuentos bacterianos . .	25
3.2. Técnica de toma de muestras para la determinación de la presencia de <i>L. monocytogenes</i> . .	26
3.3. Recuento total de bacterias mesófilas . .	27
3.4.Recuento de enterobacterias (APHA, 1992) . .	27
3.5. Pruebas de confirmación de <i>Escherichia coli</i> . .	27
3.6. Recuento de <i>Pseudomonas</i> .	28
3.7. Aislamiento de <i>Listeria monocytogenes</i> . .	28
3.8. Cálculo para la expresión de resultados en ufc/cm ² .	29
3.9. Diseño experimental .	30
3.10.Análisis estadísticos . .	31
4. PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS . .	33
4.1. Recuento microbiológico para piel y branquias de congrío .	33

4.2. Variaciones en los recuentos de <i>Pseudomonas</i> entre fechas de muestreo para congrio y bacalao .	38
4.3. Presencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en muestras de bacalao y congrio . .	40
4.4. Presencia de <i>E. coli</i> en muestras de congrio y bacalao .	43
5. CONCLUSIONES . .	47
BIBLIOGRAFIA .	49
ANEXOS .	55
Anexo1. Recuento microbiológico en especie congrio, promedio y desviación estándar. .	55
Anexo2. Recuento microbiológico en especie bacalao, promedio y desviación estándar. . .	56
Anexo 3. Variaciones en los recuentos entre lotes en muestras de congrio .	56
Anexo 4. Variaciones en los recuentos entre lotes en muestras de bacalao .	57
Anexo 5. Dibujo de branquia de pescado en papel cuadriculado. .	58
Anexo 6. Análisis estadístico para especie congrio .	59
Anexo 7. Análisis estadístico para especie bacalao . .	62

Profesores Informantes

Sr. Fernando Figuerola Rivas - Ingeniero Agrónomo, M. Sc. - Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos - Facultad de Ciencias Agrarias.

Sr. Kong Shun Ah – Hen - Ingeniero en Alimentos, Dipl. Ing, Dr. Ing. - Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos - Facultad de Ciencias Agrarias.

Dedicatoria

A mis padres y hermanos

Agradecimientos

- Quiero de todo corazón agradecer a mis padres, en especial a mi madre que ya no está con nosotros, por su paciencia, comprensión, apoyo y cariño, a mis hermanos por su apoyo en todo momento, ya que en conjunto han sido los gestores del término de esta etapa de mi vida.
- A mi profesora patrocinante de la tesis Sra Renate Schöbitz y a los profesores informantes Fernando Figuerola y profesor Kong Shun Ah – Hen, quienes tuvieron la paciencia y me brindaron el apoyo y la fuerza suficiente para terminar esta etapa. También a las profesoras de laboratorio Sra Sade Selaide, Mariella Horsella y Erika que me brindaron su colaboración en todo momento.
- A mis queridas amigas y amigos Lorena, Carmen, Shaparak, Carolina, Yudith, Jessica, Amparo, Mirtza, Marcial y a todos mis compañeros muchas gracias por todo, por su compañía, sincera amistad y cariño.
- En especial quiero agradecer a la empresa pesquera Isla del Rey por haberme facilitado la materia prima para la toma de muestras y a Sandra Galindo por su ayuda en todo momento. También quiero agradecer a la Sra Teresa Delgado de la feria fluvial por su cordial acogida y su ayuda en facilitarme la toma de muestra del pescado congrio colorado.

Muchas gracias a todos.....

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la carga de bacterias deteriorantes y patógenas como *L. monocytogenes* en piel y branquias de pescado fresco. Las muestras fueron tomadas de una planta procesadora de pescado de la Décima Región y del mercado fluvial de la ciudad de Valdivia. Entre los meses de abril y septiembre del 2003, se tomaron un total de 50 muestras, 25 correspondiente a bacalao y 25 a congrio. Para esta investigación se realizó recuento de bacterias aerobias mesófilas y de enterobacterias. A partir de las placas con enterobacterias se aislaron 5 colonias para la identificación de *E. coli*. Para *Pseudomonas* se hizo un recuento presuntivo en Agar CFC, y se confirmó su presencia con pruebas adicionales. Para el aislamiento de *L. monocytogenes* se utilizó Agar OXA, a partir del cual se confirmaron tres colonias. Los resultados arrojaron que no hubo diferencia significativa en los recuentos entre piel y branquias para congrio y bacalao. En relación al bacalao el microorganismo predominante fue *Pseudomonas* y para congrio los mayores recuentos se obtuvieron para bacterias aerobias mesófilas. La presencia de *L. monocytogenes* fue superior en congrio que en bacalao con un 40% de muestras positivas. Para *E. coli* en congrio se obtuvo un 28% de muestras positivas. En conclusión las bacterias deteriorantes como *Pseudomonas* aumentan con la exposición prolongada en hielo y aceleran la descomposición del producto. Los recuentos altos de bacterias relacionadas con la calidad higiénica están relacionadas directamente con el entorno medio ambiental y la manipulación inadecuada.

SUMMARY

The objective of the present study was, to determine the bacterial load of spoilage and pathogenic bacteria, such as *L. monocytogenes*, on the skin and gills of fresh fish. The samples were taken at a fish processing plant of the Tenth Region and at the fluvial market of the city of Valdivia. Between the months of april and september of 2003, 50 samples were taken, 25 samples of cod and 25 of conger. For this investigation mesophilic aerobic bacteria and enterobacteria counts were determined. From the plates with enterobacteria, 5 colonies for the identification of *E. coli* were isolated. For the *Pseudomonas* counts a presumptive count on CFC agar was done, and its presence with additional test was confirmed. For the isolation of *L. monocytogenes* OXA agar was used, from wich three colonies were confirmed. Results showed that there was no significant difference between counts from skin and gills of conger and cod. As for the cod samples the predominant microorganism was *Pseudomonas* while for the conger higher counts were obtained for mesophilic aerobic bacteria. The presence of *L. monocytogenes* was higher in conger than in cod, with 40% of samples positive. For *E. coli* in conger a 28% of the sample was positive. In conclusion spoilage bacteria such as *Pseudomonas* increase with prolonged exposition on ice, accelerating spoilage of the product. High counts of bacteria due to the unsanitary conditions are directly related to environmental conditions and inadequate manipulation.

1. INTRODUCCION

El pescado está continuamente expuesto a una suspensión acuosa de microorganismos, por lo tanto las bacterias están íntimamente asociadas con la superficie externa del pescado. Ellas pueden colonizar la superficie, y formar parte de la microflora residente, además pueden ser atraídas en forma accidental hacia un lugar dañado, como por ejemplo una herida.

Las bacterias pueden quedar atrapadas en las branquias, e incorporarse a la microflora residente. Además ingresan a la boca con el agua o partículas de alimento y pasan hacia el tracto digestivo. Algunas son retenidas como parte de la microflora del pez, mientras que otras son destruidas por la acción digestiva o pasan a través del intestino y son eliminadas por vía fecal.

Los microorganismos pueden multiplicarse en los alimentos y su supervivencia, desarrollo o inactivación está influenciada tanto por algunos factores intrínsecos como extrínsecos. La pérdida de calidad y el deterioro de los productos de pesca son principalmente el resultado de la acción bacteriana.

La hipótesis planteada para este trabajo fue la siguiente: la carga microbiana es mayor en branquias que sobre la piel, del pescado recepcionado en una planta procesadora y del mercado fluvial de la ciudad de Valdivia, con un elevado desarrollo en ambos casos de los microorganismos de descomposición.

Objetivo general:

Determinar la carga de bacterias deteriorantes y patógenas como *Listeria*

monocytogenes, en la superficie de la piel y branquias de pescado fresco, proveniente de una planta procesadora de pescado de la Décima Región y del mercado fluvial de la ciudad de Valdivia.

Objetivos específicos:

- Cuantificar la presencia de bacterias deteriorantes como *Pseudomonas spp*, en pescado fresco, recepcionado en una planta de procesamiento y comercializado en el mercado fluvial.
- Estudiar la calidad higiénica del pescado, a través de microorganismos indicadores como el recuento de enterobacterias y *Escherichia coli* y el recuento de bacterias mesófilas.
- Determinar la presencia de *L. monocytogenes*, en muestras de piel y branquias de pescado fresco.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. Flora bacteriana de los peces

La contaminación bacteriana que sufren los peces proviene por una parte de la flora autóctona que existe en los océanos y mares en el que habitan, la cual se caracteriza por corresponder a bacterias Gram negativas fundamentalmente. Además existen evidencias que los peces recién capturados presentan los mismos microorganismos del ambiente marino donde viven. Por otra parte aunque el tejido muscular y líquidos tisulares son considerados estériles existe una gran cantidad de bacterias confinadas en la mucosidad de la piel, en las branquias y en el intestino, los que pueden multiplicarse y penetrar en el tejido muscular (SCHÖBITZ et al., 1985).

Debido a la excelente calidad del recurso acuático y la ausencia de contaminación del ambiente natural en Chile, es posible un estado de sanidad piscícola de privilegio. El desarrollo está basado en las condiciones del ecosistema acuático que se presenta principalmente en la zona sur-austral, el que garantiza una óptima calidad y disponibilidad de agua dulce y cuya pureza, oxigenación y temperaturas resultan adecuadas (NAVARRO, 1991).

El pescado está siempre propenso a un rápido deterioro microbiológico, el cual es atribuido a factores intrínsecos, tales como bajo contenido en colágeno, contenido

elevado de lípidos, y comparativamente altos niveles de nitrógeno no proteico en el músculo, el cual favorece un rápido crecimiento microbiano.

Los factores que influyen la contaminación microbiana incluyen los métodos de captura, la manipulación a bordo, la sanitización del pescado en el barco, el procesamiento y condiciones de almacenaje. Se estima que alrededor del 10% del pescado capturado mundialmente, se pierde debido al deterioro por falta de facilidades para el congelamiento (VENUGOPAL, 1990).

La velocidad de deterioro y la duración en almacén del pescado es afectada por muchos parámetros y según lo indicado por FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO), 1998, el pescado se deteriora a diferentes velocidades. En general, se puede decir que en condiciones aeróbicas de almacenamiento, el pescado grande se deteriora más lentamente que el pequeño. La duración en almacén es mayor para el pescado plano que para el cilíndrico y es mayor para el pescado magro que para el graso. El pescado óseo (lípidos almacenados en el tejido muscular) permanece comestible mucho más tiempo que el cartilaginoso (alto contenido de urea en el músculo). Diversos factores probablemente contribuyen a estas diferencias, algunos son obvios pero muchos otros continúan al nivel de hipótesis.

En el pescado los microorganismos están presentes en la piel, branquias e intestinos. El pescado de agua fría generalmente tiene una abundancia de microorganismos Gram negativos, mientras que los microorganismos mesófilos Gram positivos, predominan en pescados de aguas tropicales. Muchos de estos microorganismos pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Moraxella*, *Acitenobacter*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, mientras que los microorganismos Gram positivos frecuentemente pertenecen a los géneros *Micrococcus* y *Bacillus* (VENUGOPAL, 1990). La flora bacteriana en pescados recién capturados depende más del medio ambiente de captura, que de la especie, encontrándose recuentos muy elevados, por ejemplo 10^7 ufc/cm², que se encuentran en pescados capturados en aguas muy contaminadas (FAO, 1998). En la superficie de los peces pueden encontrarse miembros de las vibrionáceas (*Vibrio* y *Photobacterium*) y aeromonádaceas (*Aeromonas* spp.). y Gram positivos como *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* y *corineformes*. En general, las bacterias Gram-negativas dominan la microflora (GRAM et al., 1990).

Durante el almacenamiento en hielo, la población bacteriana se duplica en aproximadamente 1 día y después de 2 o 3 semanas alcanza unas $10^8 - 10^9$ ufc/g de músculo o cm² de piel. Durante el almacenamiento a temperatura ambiente, se alcanzan niveles de $10^7 - 10^8$ ufc/g en 24 horas.

La composición de la microflora también cambia dramáticamente durante el almacenamiento. De esta forma, después de 1 a 2 semanas de almacenamiento aeróbico en hielo, la flora está constituida casi exclusivamente por *Pseudomonas* spp y *Shewanella putrefaciens*. Esto se cree es, debido a su relativo corto tiempo de generación a temperaturas de enfriamiento (DEVARAJU y SETTY, 1985). A temperatura ambiente (25 °C), la microflora en el punto de deterioro está dominada por vibrionáceas mesofílicas y si el pescado proviene de aguas contaminadas, por enterobacterias.

Un estudio realizado por NEDOLUHA y WESTHOFF (1993), indicó que *Aeromonas*

hydrophila fue la especie predominante en el intestino de peces. Además se encontró bacterias de los géneros *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Bacillus*, y *Acinetobacter*. Ese estudio arrojó en intestinos un recuento de bacterias aerobias, desde $5,0 \times 10^3$ a $6,3 \times 10^7$ ufc/g. En las branquias de peces sanos como trucha arcoiris, se ha reportado la presencia de *Aeromonas*, *corineformes*, enterobacterias, cocos Gram positivo, *Pseudomonas* y *Vibrios* (AUSTIN y AUSTIN, 1987).

Es ampliamente aceptado que la carga microbiana inicial del pescado de agua dulce varía dependiendo de las condiciones de captura y de la temperatura del agua. En peces capturados desde aguas frías, y libres de contaminación, generalmente se obtienen recuentos de bacterias mesófilos y psicrótrofos en la superficie de la piel de 10^2 a 10^5 ufc/cm², y de 10^2 a 10^6 ufc/g en las branquias. El número en el contenido intestinal puede ser más alto con recuentos superiores a 10^8 ufc/g (PULLELA *et al.*, 1998; NEDOHULA Y WESTHOFF, 1993).

El número total de microorganismos varía enormemente, se establece como rango normal $10^2 - 10^7$ ufc/cm² en la superficie de la piel. Las branquias e intestinos contienen entre 10^3 y 10^9 ufc/g (FAO, 1998).

El músculo de un pez saludable o de un pescado recién capturado es estéril, debido a que el sistema inmunológico del pez previene el crecimiento de bacterias en el músculo. Cuando el pez muere, el sistema inmunológico colapsa y las bacterias proliferan libremente. En la superficie de la piel, las bacterias colonizan en una amplia extensión la base de las escamas. Durante el almacenamiento, las bacterias invaden el músculo penetrando entre las fibras musculares (FAO, 1998). Se ha demostrado 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 sobre las 10^6 ufc/cm². Este resultado fue observado tanto en el almacenamiento en hielo como en ambiente refrigerado.

GONZALEZ *et al.* (1999), afirman que el medio ambiente tiene influencia sobre el número y tipo de microorganismos en el pescado. Similares cargas microbianas han sido encontradas en centros de cultivos y pescados de agua dulce de la misma especie. La presencia de bacterias patógenas humanas en pescado depende de varios factores incluyendo especies, condiciones del agua, prácticas de captura etc. El aislamiento de ciertos microorganismos como *E.coli*, *Listeria monocytogenes*, puede ser frecuente en pescado (NEDOHULA Y WESTHOFF, 1997).

En aguas contaminadas, puede encontrarse un elevado número de enterobacteriáceas. En aguas limpias y templadas, estos organismos en cambio desaparecen rápidamente, pero se ha demostrado que *Escherichia coli* y *Salmonella* pueden sobrevivir por períodos bastante prolongados de tiempo en aguas tropicales y una vez introducidos en el ambiente, se convierten casi en autóctonos (Fujioka *et al.*, 1988 citado por FAO, 1998).

2.1.1. *Listeria monocytogenes*. La higiene del proceso y medio ambiente del procesamiento, son factores significativos en la seguridad microbiológica y buena calidad de los productos en la industria de pescados. *L. monocytogenes* es una bacteria no esporulada que es comúnmente encontrada en el suelo, agua, y material de

descomposición. Hay muchas rutas potenciales de contaminación de alimentos con estos organismos y una de las características que hace difícil su control es la habilidad para crecer en alimentos a temperatura de refrigeración (DOYLE *et al.*, 2001)

L. monocytogenes es un cocobacilo Gram positivo, de tamaño pequeño, aerobio o anaerobio facultativo. Por sus características particulares es considerada una bacteria saprófita susceptible de infectar al hombre y a los animales, siendo el suelo su hábitat natural. Es además psicrótrofa, resistente a los agentes físico-químicos y a la desecación, por lo cual se adapta fácilmente y prolifera en el medio ambiente. Los alimentos juegan un rol preponderante como agente transmisor, siendo aislada de variados alimentos destinado al consumo humano (VENEGAS *et al.*, 1990).

L. monocytogenes ha sido aislada desde muestras de agua dulce y desde agua de mar en áreas costeras sometidas a contaminación, o contaminación de fuente industrial, humana o animal. Como microorganismo anaeróbico facultativo y psicrotrófico, puede crecer en alimentos de comida rápida como ligeramente salada y ahumada. El consumo de pescado o productos de mar contaminado con *L. monocytogenes* ha sido asociado con brotes de listeriosis humana (SAVVAIDIS *et al.*, 2002).

La listeriosis presenta una alta tasa de mortalidad, especialmente en recién nacidos y personas inmuno-comprometidos. Todos los grupos son afectados, pero principalmente los recién nacidos e infantes. La infección durante el embarazo es transmitida al feto y puede resultar un aborto. Aparentemente la listeriosis es causa frecuente de daño fetal, aborto, y muerte neonatal. En adultos meningitis y meningoencefalitis componen el principal síndrome clínico (BRAUDE, 1981).

2.1.2. Enterobacterias. En general, no es tarea fácil examinar cada producto o alimento para investigar la presencia de organismos peligrosos. La práctica que ha estado vigente durante muchos años y aún continúa en la actualidad, está representada por la determinación de la calidad higiénica de los alimentos, a través de su contenido de determinados organismos indicadores. Actualmente los organismos indicadores de calidad higiénica aplicados a los alimentos son las enterobacteriaceae en general, *Streptococcus* del grupo D de Lancefield, *E.coli* y coliformes (CAMPOS, 1995).

Las enterobacterias, son bacilos cortos, Gram negativos, que pueden formar cadenas, son aerobios o anaerobios facultativos, catalasa positiva, y oxidasa negativa. Dentro de esta familia bacteriana, encontramos bacterias del grupo coliformes o llamadas también coliformes totales. Los organismos coliformes son buenos indicadores de la contaminación indeseable de las aguas. Su empleo como indicadores de la calidad higiénica de los alimentos se basa en la experiencia positiva adquirida en el agua. El hallazgo de gran número de estos organismos en los alimentos y el agua, indica la contaminación indeseable (FAO, 1998). El grupo coliformes incluye bacterias anaerobias facultativas, Gram negativas, no esporuladas, que fermentan la lactosa con formación de gas dentro de 48 h a una temperatura de 35°C (CAMPOS, 1995). Pertenecen a este grupo especies de los géneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, y *Klebsiella*, los cuales son utilizados como parámetro sanitario (OROSTEGUI, 1999). *E.coli* está presente como microbiota normal del tracto intestinal de humanos y animales. Es un bacilo Gram negativo de 1,1 a 1,5 µm de diámetro por 2 a 6 µm de largo. Su temperatura de desarrollo es de 37°C y puede crecer tanto en aerobiosis como en anaerobiosis.

2.1.3. Bacterias aerobias mesófilas. Los microorganismos mesófilos, muchos de origen humano o animal incluyendo los patógenos y numerosos tipos de los que alteran los alimentos, crecen mejor a temperaturas entre los 30°C y 45°C y tienen una temperatura mínima de crecimiento entre 5°C y 10°C (ICMSF, 1980).

La presencia de microorganismos aerobios mesófilos en los alimentos puede ser relacionada directamente con la manipulación, el estado de frescura, o de descomposición del producto, y la temperatura de conservación del producto. Un número relativamente bajo de estas bacterias no es sinónimo de buena calidad bacteriológica del alimento, ya que puede contener microorganismos que producen enterotoxinas o son patógenos (VENEGAS *et al.*, 1990).

2.1.4. *Pseudomonas*. Una de las principales causas de deterioro del pescado es la autólisis, bacterias en crecimiento y el metabolismo, son resultantes de la formación de compuestos sin sabor y oxidación de lípidos. Además las actividades microbiológicas son factores que influyen la calidad del pescado. Los hábitos alimenticios del pescado, estación del año, temperatura, tipo de pez, lugar en la cual el pescado fue cosechado, condiciones de almacenaje etc, determinan el principal deterioro específico de microorganismos (TRYFINOPOULOU *et al.*, 2002).

Las *Pseudomonas* son bacilos rectos levemente curvados Gram negativos. Las colonias son redondas y brillantes, pueden ser de un color amarillo fluorescente, o amarillo-verdoso en el medio adyacente, que puede ser mejor visualizado con luz ultravioleta. Son oxidasa y catalasa positiva, y crecen en rangos de temperatura entre 4°C a 43°C (ALVARADO *et al.*, 1989). Las representantes del género *Pseudomonas* habitan el suelo, además de los ambientes dulceacuícolas y marinos donde cumplen funciones de remineralización de materia orgánica. Las *Pseudomonas* son habitantes normales del tracto digestivo de los peces, considerándose patógenos oportunistas para ellos, cuando son afectados por situaciones de estrés (SILVA, 1997). *Pseudomonas fluorescens* ha sido considerada un microorganismo deteriorante del pescado, contaminante e invasor secundario de tejidos dañados de pescado (AUSTIN y AUSTIN, 1999).

El deterioro del pescado almacenado en hielo por *Pseudomonas* genera olores y sabores desagradables afrutados, a podrido y a sulfuro. Las *Pseudomonas spp*, producen un número de compuestos volátiles, como aldehídos, cetonas, ésteres y sulfuros. Sin embargo, se desconoce el compuesto específico responsable de los típicos olores desagradables. Los olores afrutados desagradables producidos por *Pseudomonas fragi* se originan a partir de los monoaminoácidos y los aminoácidos monocarboxílicos (EDWARDS *et al.*, 1987).

2.2. Características de los peces

Los peces generalmente se definen como vertebrados acuáticos, que obtienen su oxígeno del agua a través de las branquias y poseen aletas con un número variable de elementos esqueléticos llamados radios (FAO, 1998). Los peces son los más numerosos

de los vertebrados; existen por lo menos 20.000 especies conocidas y más de la mitad (58 %) se encuentran en el ambiente marino (FAO, 1998).

La composición química de los peces varía considerablemente entre las diferentes especies y también entre individuos de una misma especie, dependiendo de la edad, sexo, medio ambiente y estación del año.

Los principales constituyentes de los peces y los mamíferos pueden ser divididos en las mismas categorías, proteínas, lípidos, carbohidratos, cenizas y agua. Las variaciones en la composición química del pez están estrechamente relacionadas con la alimentación, nado migratorio y cambios sexuales relacionados con el desove. Los lípidos presentes en las especies de peces óseos pueden ser divididos en dos grandes grupos: los fosfolípidos y los triglicéridos (FAO, 1998).

Las proteínas del músculo del pez se pueden dividir en tres grupos: proteínas estructurales (actina, miosina, tropomiosina y actomiosina), proteínas sarcoplasmáticas (mioalbúmina, globulina y enzimas), y proteínas del tejido conectivo (colágeno) (FAO, 1998).

La cantidad de vitaminas y minerales es específica de la especie y, además, puede variar con la estación del año. En general, la carne de pescado es una buena fuente de vitamina B y en el caso de las especies grasas, también de vitaminas A y D. Respecto a los minerales, la carne de pescado se considera una fuente particularmente valiosa de calcio y fósforo, así como también de hierro y cobre. Los peces de mar tienen un alto contenido de yodo (WAAGBO *et al.*, 1991).

La piel la cual es una barrera física que impide la invasión de microorganismos, es a menudo inspeccionada como un importante mecanismo de defensa no específico. A diferencia de la piel de muchos vertebrados, la epidermis de la piel está compuesta de células vivas no queratinizadas. Las heridas del pescado son curadas más rápidamente que otros mamíferos. Esto es visto como una ventaja adaptativa del medio ambiente acuático, para que el pescado mantenga su osmolaridad.

El mucus es una barrera externa adicional que posee el pescado, que está ausente en la piel de otros vertebrados. El mucus inhibe la colonización de microorganismos tanto como en las agallas y mucosa gastrointestinal. El mucus del pescado contiene anticuerpos naturales, lisozima, y bacteriolisinas (STOSKOPF, 1992).

2.3 Proceso de deterioro del pescado

Los primeros cambios sensoriales del pescado durante el almacenamiento están relacionados con la apariencia y la textura. El sabor característico de las especies normalmente se desarrolla durante los dos primeros días de almacenamiento en hielo.

El cambio más dramático es el término del *rigor mortis*. Inmediatamente después de la muerte el músculo del pescado está totalmente relajado, la textura flexible y elástica generalmente persiste durante algunas horas y posteriormente el músculo se contrae.

Cuando se torna duro y rígido, todo el cuerpo se vuelve inflexible y se dice que el pescado está en rigor mortis. Esta condición generalmente se mantiene durante uno o más días y luego se resuelve el rigor. La resolución del rigor mortis hace que el músculo se relaje nuevamente y recupere la flexibilidad, pero no la elasticidad previa al rigor. La proporción entre el comienzo y la resolución del rigor varía según la especie y es afectado por la temperatura, la manipulación, el tamaño y las condiciones físicas del pescado (FAO, 1998).

Entre los compuestos que actúan durante el proceso de deterioro del pescado se encuentran diferentes enzimas.

2.3.1. Catepsinas. Si bien han sido aisladas varias enzimas proteolíticas en el tejido del pescado, han sido las catepsinas las que quizás se han descrito con mayor frecuencia. Las catepsinas son proteasas "ácidas" que usualmente se encuentran empaçadas en diminutos organelos submicroscópicos llamados lisosomas. En el tejido vivo, las proteasas lisosomales se cree son responsables de la degradación proteica en las áreas de daño. De esta forma, las catepsinas están generalmente inactivas dentro del tejido vivo pero son liberadas dentro de los fluidos celulares luego de abuso físico o congelación y descongelación *post mortem* del músculo (FAO, 1998).

2.3.2. Calpainas. Un segundo grupo de proteasas intracelulares denominadas "calpainas" o "Factor Activado por Calcio" (FAC o del inglés CAF = Calcium Activated Factor) han sido recientemente asociadas con la autólisis del músculo de pescado y se les encuentra en carnes, pescados de aleta y crustáceos. Las calpainas han sido encontradas como las principales responsables de la autólisis *post mortem* de la carne, debido a la digestión de las proteínas de la Línea Z de las miofibrillas. Si bien el endurecimiento es rara vez un problema en el músculo no congelado, el ablandamiento debido a la autólisis es un problema serio que limita su valor comercial. Se cree que las catepsinas D y L desempeñan un papel primordial en la degradación autolítica del tejido del pescado, dado que la mayor parte de las otras catepsinas presentan actividad en un rango relativamente estrecho de pH, demasiado bajo para tener significado fisiológico (KOOHMARAIE, 1992).

2.3.3. Colagenasas. La carne de los peces teleósteos (peces pelágicos) está dividida en bloques de células musculares separadas en "escamas", o miotomas, mediante tejido conectivo denominado ciocomata. Cada célula muscular o fibra está rodeada por tejido conectivo que se une a la miocomata al final de la célula mediante finas fibrillas de colágeno. Durante el almacenamiento refrigerado, estas fibrillas se deterioran (BREMNER y HALLETT, 1985). Son estas enzimas las que presumiblemente causan "desgajamiento", o ruptura de los miotomas (segmentos musculares), durante el almacenamiento prolongado en hielo o durante el almacenamiento por cortos períodos de tiempo, pero a elevadas temperaturas. En el bacalao del Atlántico se ha demostrado que al alcanzar los 17°C, el desgajamiento es inevitable, debido presumiblemente a la degradación del tejido conectivo y el rápido acortamiento del músculo por la elevada temperatura durante el rigor (SATO *et al.*, 1991). Al comparar los compuestos químicos desarrollados durante el deterioro natural del pescado y el pescado estéril, se demuestra que la mayoría de los componentes volátiles son producidos por bacterias. Estos incluyen trimetilamina, compuestos sulfurosos volátiles, aldehídos, cetonas, ésteres, hipoxantina,

así como también otros compuestos de bajo peso molecular.

Los sustratos para la producción de compuestos volátiles son los carbohidratos (como el lactado y la ribosa), los nucleótidos (como la inosina monofosfato y la inosina) y otras moléculas de nitrógeno no proteico (NNP). Los aminoácidos son sustratos particularmente importantes para la formación de sulfitos y amoníaco (FAO, 1998).

2.3.4. Reducción de la Oxido de Trimetilamina (OTMA). Es típico de muchas bacterias específicas del deterioro del pescado emplear la OTMA como aceptor terminal de electrones durante la respiración anaeróbica. El componente reducido, la trimetilamina, uno de los compuestos dominantes del pescado deteriorado, tiene el olor típico del pescado. El nivel de TMA encontrado en pescado fresco, rechazado por un panel sensorial varía dependiendo de la especie de pescado, pero generalmente se encuentra alrededor de los 10-15 mg TMA-N/100 g en pescado almacenado aeróbicamente y en un nivel de 30 mg TMA-N/100 g en bacalao empacado (FAO, 1998).

La reducción del OTMA está generalmente asociada con géneros de bacterias típicos del ambiente marino (*Alteromonas*, *Photobacterium*, *Vibrio* y *S. putrefaciens*), pero también es llevada a cabo por *Aeromonas* y bacterias intestinales de las enterobacteriáceas. La reducción del OTMA ha sido estudiada en bacterias fermentativas, anaerobias facultativas, como *E. coli* y *Proteus spp.* Como también en la bacteria no fermentativa *S. putrefaciens* (RINGOE *et al.*, 1984).

En el bacalao y en otros gádidos, hasta que ocurre el deterioro, la TMA constituye la mayor parte de las denominadas bases volátiles totales BVT (también conocidas como nitrógeno volátil total, NVT) hasta que ocurre el deterioro. Sin embargo, en el pescado deteriorado el suministro de OTMA decae, la TMA alcanza su máximo nivel y los niveles de NVT continúan incrementando debido a la formación de NH_3 y otras aminas volátiles (FAO, 1998).

Los compuestos sulfurados volátiles son componentes típicos del pescado deteriorado y la mayoría de las bacterias identificadas como bacterias específicas del deterioro producen uno o algunos sulfuros volátiles. *S. putrefaciens* y algunas *Vibrionaceae* producen H_2S a partir del aminoácido sulfurado 1-cisteína. Por el contrario, *Pseudomonas* no produce cantidades significativas de H_2S (GRAM *et al.*, 1990).

2.3.5. Oxidación e hidrólisis de lípidos. En los lípidos del pescado ocurren dos reacciones diferentes, de importancia en el deterioro de la calidad oxidación e hidrólisis. Ellas dan como resultado la producción de una serie de sustancias, de las cuales algunas tienen sabores y olores desagradables (rancio). Otras pueden también contribuir a los cambios de textura mediante uniones covalentes a las proteínas musculares. Las reacciones pueden ser no enzimáticas o catalizadas por enzimas microbianas, intracelulares o digestivas del mismo pescado. Por lo tanto, el significado relativo de estas reacciones depende principalmente de la especie de pescado y de la temperatura de almacenamiento. Los pescados grasos son, por lo tanto, particularmente susceptibles a la degradación lipídica, la cual puede ocasionar severos problemas en la calidad, incluso durante el almacenamiento a temperaturas bajo cero (FAO, 1998).

2.4. *Dissostichus eleginoides* (bacalao)

D. eleginoides está constituido en 100 g de producto por 21,5 g de grasa, 5,7 g proteínas, 67,7% de humedad, 54 mg de calcio, 230 mg de potasio, 127 mg de sodio, y 297 kcal. El contenido de carbohidratos en el músculo del pescado es muy bajo, generalmente inferior al 0,5 %. Esto es típico del músculo estriado, en el cual los carbohidratos se encuentran en forma de glucógeno y como parte de los constituyentes químicos de los nucleótidos. Estos últimos son la fuente de ribosa liberada como una consecuencia de los cambios autolíticos postmortem (POULTER y NICOLAIDES, 1985).



FIGURA 1. *Dissostichus eleginoides*, (bacalao).

FUENTE: Material facilitado por Pesquera Isla del rey (2003).

La pesquería artesanal de la Décima Región de Chile, se desarrolla principalmente sobre *Dissostichus eleginoides*, conocido en Chile con el nombre común de “Bacalao de profundidad” (*Patagonian toothfish* en Inglaterra, *Austromerluza negra* en España, y *Légine Australisen* Francia) (RUBILAR, 1993) . Es una especie de distribución geográfica circumpolar en el hemisferio sur. Esta comprende principalmente las regiones subantártica del atlántico (Islas Georgia del Sur, rocas cormorán, Islas Sándwich del sur) y del Océano Indico (Islas Kerguelén, Islas Crozet, Islas Príncipe Eduardo, Isla Marión, bancos Ob y Lena e Islas Heard y McDonald). Hacia el norte se extiende a lo largo de la costa occidental de Sudamérica, abarcando la costa Chileno-Peruana hasta frente a Callao, y por la costa oriental, desde los alrededores de las Islas Falkland (Islas Malvinas), banco Burdwood y Patagonia argentina, hasta Uruguay.

D. eleginoides es un pez típicamente demersal (se encuentra en las proximidades del fondo). Habita la masa de agua conocida como aguas Antárticas Intermedias, en rangos de profundidades de 70 a 2500 m, capturándosele incluso a mayor profundidad en aguas chilenas (RUBILAR, 1993).

El bacalao de profundidad, es el pez depredador de mayor tamaño en el ambiente

demersal del talud continental de la costa chilena, cuya acción trófica se efectúa principalmente sobre otros peces, crustáceos y cefalópodos. Esta especie en aguas chilenas efectúa una depredación fundamentalmente sobre cefalópodos (47,8%), peces teleostomos (36,6%) y crustáceos malacostráceos (13,2%). Asimismo, para la VIII región señalan una dieta piscívora con crustáceos y cefalópodos adicionales, lo que pone de manifiesto de *D. eleginoides* es un carnívoro capaz de depredar sobre otro carnívoro tan veloz como el jurel (ARRIZAGA *et al.*, 1984).

Dadas las características más importantes de esta especie, desde el punto de vista biológico-pesquero, como su elevada longevidad (25-30 años), lenta tasa de crecimiento y madurez sexual tardía (machos 7-11 años y hembras 9-12 años), se estima que el rendimiento por recluta y el rendimiento sostenible como fracción de la biomasa sin explotar, es muy bajo, y puesto que más del 90% de la captura de *D. eleginoides* se sustenta principalmente es especímenes juveniles, se ha señalado la urgente necesidad de análisis comparativos detallados de su historia de vida (RUBILAR, 1993).

En la Décima región, a partir de 1980 las capturas de esta especie han aumentado en forma considerable, producto del desplazamiento de pescadores y sus embarcaciones desde norte a sur, debido a la disminución de las capturas en sus áreas habituales de pesca y a la consecuente búsqueda de áreas menos explotadas (RUBILAR, 1993). En la costa valdiviana, la pesca de *D. eleginoides* está restringida a una pesquería de tipo artesanal (lanchas pesqueras de 12 a 18 metros de largo), con un número de anzuelos no superior a 12.000 unidades por jornada de pesca (CHILE, SERVICIO NACIONAL DE PESCA SERNAPESCA, 1998). Se registra un desembarque total a lo largo del país de 15000 toneladas (CHILE, SERNAPESCA, 1999).

El bacalao es capturado mediante pesca de espinel por la flota artesanal y semi industrial, y es destinado al consumo en fresco enfriado y congelado, o a la fabricación de productos elaborados para su exportación, a países de destino como la Comunidad Europea, Argentina, Brasil, Estados Unidos, Hong-Kong, Taiwán, Nueva Zelandia, Jamaica, Singapur, Suiza, Uruguay, Colombia, Cuba, México etc.

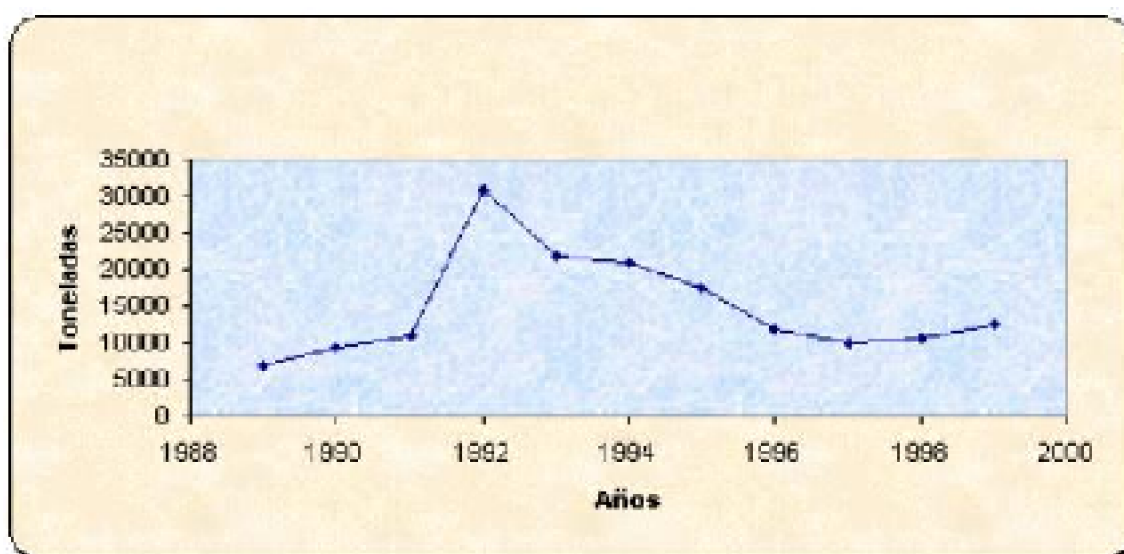


FIGURA 2. Exportaciones en toneladas de bacalao desde 1988- 2000.

FUENTE: Anuario estadístico de pesca (SERNAPESCA, 1999).

En esta especie es posible hablar de dos pesquerías: una pesquería artesanal espinelera que opera principalmente al norte de la latitud 47 ° S, y otra pesquería industrial espinelera (buques hieleros y fábricas) que opera en la zona austral entre los 47 ° y 57 ° S, no obstante una parte de la temporada está dirigida a aguas internacionales, dirigiendo su operación a la captura de bacalao de profundidad (CHILE, SERNAPESCA, 2000).

2.5. *Genypterus chilensis* (congrío colorado)

El congrío colorado es una especie demersal y desde un punto de vista de su contenido de lípidos es un pez magro (YOUNG *et al.*, 1984). En este pez no se observan escamas, ya que estas son muy pequeñas y cubiertas por la piel. La aleta caudal falta, y los ejemplares adultos suelen sobrepasar el metro de longitud (SIEVERT, 1979). Es un pez que habita principalmente en cuerpos de aguas costeras. La distribución geográfica de la especie en Chile va desde Arica por el norte (18°25'S) hasta Archipiélago de los Chonos por el sur (47°75'S), a profundidades que generalmente oscilan entre los 20 y 150 metros en la zona norte y centro del país y desde Chiloé al sur se encuentra desde la zona intermareal, a los 100 metros de profundidad (BORE y MARTINEZ, 1981).

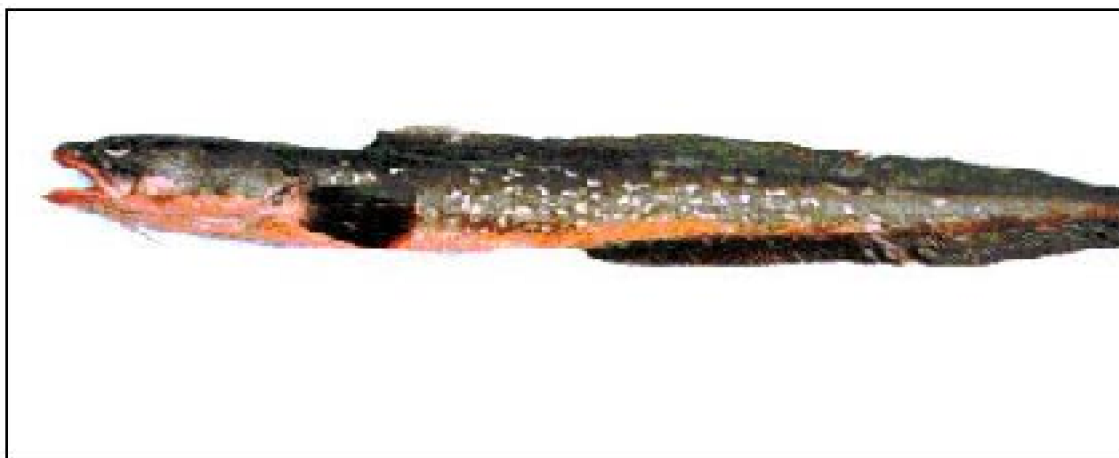


FIGURA 3. *Genypterus chilensis*, (congrío colorado).

FUENTE : SERNAPESCA (2000).

Las observaciones de los buzos autónomos, indican que el congrío colorado no forma cardúmenes, sino que vive aislado en fondos rocosos, lo que contrasta con las preferencias de hábitat del congrío negro que busca sustratos más fangosos. Por lo general esta especie utiliza grietas y escondites como refugio de depredadores, y estos mismos espacios los utiliza para acechar a sus presas, de acuerdo a la conducta de un depredador (CHILE, SERNAPESCA, 2000). SIEVERT (1979), lo describe como un típico habitante de fondos rocosos, donde se refugia en pequeñas cuevas durante el día.

Durante la noche sale en busca de su alimento formado en gran parte por camarones, pequeñas jaibas y otros peces. En buceos realizados en varios lugares de la costa de Chile se ha observado entre huiros, refugiados en cuevas o desplazándose lentamente en profundidades que van del nivel inferior de la marea hacia mayores profundidades. Buques pesqueros lo han capturado con redes de arrastre en profundidades de 38 m, frente a Corral, y en 20 m frente a Constitución. También hay registros hasta 250 m de profundidad. Esta especie es capturada principalmente por el sector artesanal en el área comprendida entre Antofagasta (23°38' S) y Puerto Montt (41°30' S); desembarcándose los mayores volúmenes en las regiones V (39%), VIII (17%) y X (20%) (YOUNG *et al.*, 1984).

Los estudios de alimentación en esta especie revelan, una dieta compuesta por una variada composición específica, por cuanto los estudios de los contenidos estomacales han mostrado una gran número de presas que componen la dieta de esta especie. Sin embargo, pese a la gran diversidad de presas, en términos de importancia, esta especie muestra claras preferencias alimentarias por crustáceos de pequeño tamaño. Este pez es de gran importancia para Chile registrándose un desembarque total de 580 toneladas a lo largo del país (CHILE, SERNAPESCA, 2000).

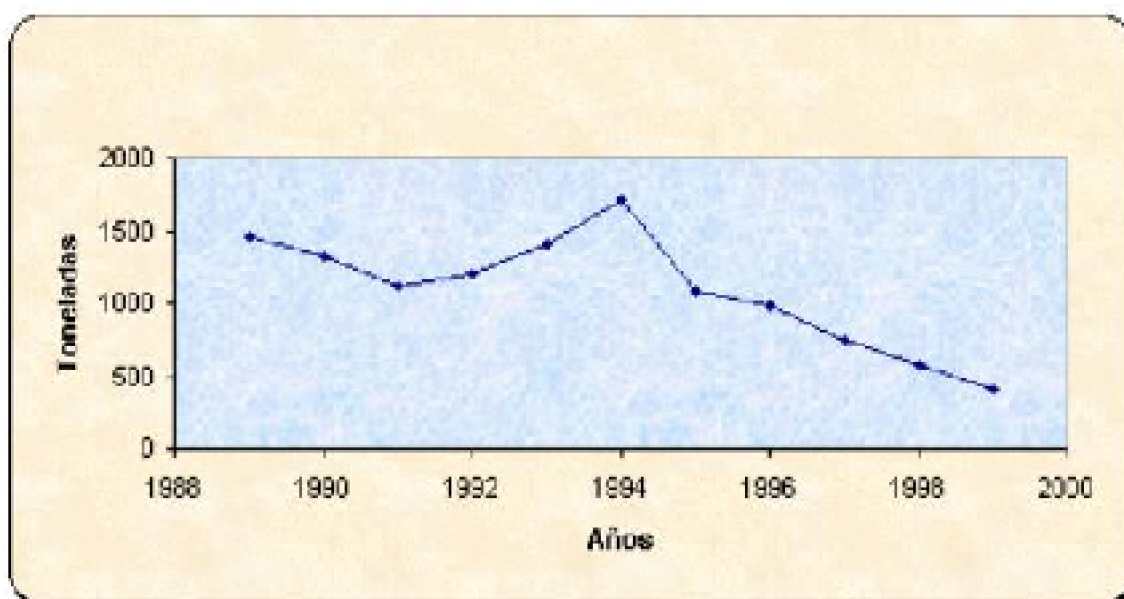


FIGURA 4. Exportaciones en toneladas de congrio colorado desde 1988- 2000.

FUENTE: Anuario estadístico de pesca (CHILE, SERNAPESCA, 2000)

Esta especie es capturada principalmente por la flota artesanal a través de líneas de mano o espineles verticales, y ocasionalmente por la flota industrial con redes de arrastre como fauna acompañante de la merluza común. Se destina casi exclusivamente al consumo nacional en fresco y congelado y algunas empresas exportan a países como Brasil y Colombia (CHILE, SERNAPESCA, 2000). Existe una clara estacionalidad de la captura, obteniéndose valores más altos en la temporada primavera-verano. En la pesca en espinel capturados en la zona norte se aprecia una longitud de 60-64 cm, con un peso estimado de 910 g – 1.130 g (YOUNG *et al.*, 1984).

3. MATERIAL Y METODOS

Las muestras para el estudio fueron obtenidas en una planta procesadora para peces, ubicada en la Décima Región¹, donde la especie muestreada fue bacalao (*Dissostichus eleginoides*), y en la feria fluvial de la ciudad de Valdivia, donde se muestreó congrio (*Genypterus chilensis*). El estudio se realizó entre los meses de abril y septiembre de 2003. En total se obtuvieron 50 muestras, 25 correspondientes a bacalao y 25 a congrio. Para ambas especies se tomaron muestras de la superficie de la piel y de branquias. El traslado de las muestras se hizo en cajas térmicas con hielo, que contenían los diferentes tubos con las tómulas de las muestras de superficies. El análisis microbiológico se realizó en el laboratorio de microbiología del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICYTAL), de la Universidad Austral de Chile.

3.1. Técnica de toma de muestra para recuentos bacterianos

En piel:

- Se prepararon tubos de tapa rosca con 5,0 ml de diluyente estéril buffer fosfato (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA), 1992). Para la toma de muestra se humedeció una tórula estéril en el diluyente y se lavó la superficie

delimitada por una plantilla que cubrió un área aproximada de 50 cm^2 (7,1cm x 7,1cm). El procedimiento se realizó en 2 superficies distintas utilizando una nueva tórula y plantilla cada vez (APHA, 1992).

¹ “Pesquera Isla del Rey S.A” Los condestables N° 390 Niebla.

- Finalizado el lavado, se quebró la tórula, dejando caer la porción con algodón dentro del tubo con el diluyente
- El cálculo de la expresión de resultados (ufc/cm^2) se realizó según la técnica descrita en (3.8.1).

En branquias :

- Se procedió según técnica descrita para piel, pasando la tórula por toda la superficie de las branquias.
- Las branquias de un lado se utilizaron para la determinación de *L. monocytogenes*, y el otro lado para el resto de los análisis microbiológicos.
- Para expresar los resultados en cm^2 muestreado, se obtuvo la superficie de la branquia dibujándola en papel cuadriculado (ANEXO 5) y se hizo un cálculo estimativo de la superficie de las branquias, según se señala en el punto (3.8.2).

3.2. Técnica de toma de muestras para la determinación de la presencia de *L. monocytogenes*

En piel:

- Se prepararon tubos con 2 ml de agua peptonada al 1% estéril.
- Para la toma de muestra se humedeció una tórula estéril en el agua peptonada y se lavó la superficie de la piel delimitada por una plantilla (50 cm^2), se realizó en dos superficies distintas que constituyeron una sola muestra utilizando una nueva tórula y plantilla cada vez.
- Finalizado el lavado se quebró la tórula, y se dejó caer la porción con algodón dentro del tubo con 10 ml de caldo preenriquecimiento selectivo LEB (OXOID) para *L. monocytogenes* (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION(FDA), 1992).

En branquias:

- Se repitió procedimiento descrito para piel, pasando la tórula por todas las superficies de las branquias de un lado al lado opuesto.

3.3. Recuento total de bacterias mesófilas

Se siguió la metodología descrita para el recuento de bacterias mesófilas viables, por el método estándar o en profundidad (APHA, 1992), utilizando Agar Plate Count como medio de cultivo. Los tubos con las tómulas, (3.1), se agitaron en forma mecánica (Vortex) y se realizaron las diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) en buffer fosfato, la incubación se realizó a 32°C por 48 h.

La lectura de las placas se realizó en la dilución cuya placa presentó entre 25 y 250 colonias, y se informó el resultado expresado en ufc/ cm² según descrito en el punto (3.8).

3.4. Recuento de enterobacterias (APHA, 1992)

El medio utilizado fue Agar bilis rojo neutro cristal violeta (VRBG) con glucosa al (1%). Se utilizaron las mismas diluciones (3.3) La siembra se realizó por el método estándar o en profundidad. Las placas se incubaron a 35°C por 24 a 48 h. La lectura de las placas se realizó en la dilución cuya placa presentó entre 20 y 200 colonias, con colonias de un diámetro $\geq 0,5$ mm y se informó el resultado en ufc/cm² según descrito en (3.8). A partir de la placa con Agar VRBG se aislaron 5 colonias sobre placas de Agar Plate Count, para realizar las pruebas posteriores (3.5) de identificación de *Escherichia coli*.

3.5. Pruebas de confirmación de *Escherichia coli*

Las colonias aisladas sobre Agar Plate Count (3.4), fueron identificadas utilizando el test de Eijkman (HARRIGAN y McCANCE, 1976), para lo cual cada colonia se sembró en un tubo con caldo común para la prueba de Indol, y un tubo con caldo bilis verde brillante con campana Durham. Los tubos se incubaron a $44,5 \pm 0,5$ °C (baño María) por 24 h. Se verificó la reacción de Indol en el tubo con caldo común, y la presencia de gas en la campana Durham. Ambas pruebas positivas indicaron la presencia de *E. coli*. Para calcular el N° de *E. coli* se aplicó la siguiente formula:

$$\text{Recuento confirmativo} = \text{Recuento presuntivo} \times \frac{\text{N° colonia confirmadas}}{\text{N° colonia replicadas}}$$

3.6. Recuento de *Pseudomonas*

Se sembró 0,1 ml de cada dilución (3.3) en la superficie de placas Agar CFC (agar base cerebro corazón que lleva como inhibidores de la flora acompañante cefaloridina, ácido fusídico y ceftriaxona (OXOID)). Las placas se incubaron en aerobiosis a 25°C durante 48 h. Posteriormente se realizó un recuento presuntivo de *Pseudomonas*. Se confirmó la presencia de *Pseudomonas* con una tinción de Gram a 5 colonias que presentaron diferente aspecto, comprobando la presencia de bacilos, pequeños, Gram negativos. Para comprobar la presencia de *Pseudomonas* se realizó a las mismas cinco colonias, las pruebas de la oxidasa y catalasa. La prueba de la oxidasa consistió en colocar tres gotas del reactivo tetrametil parafenilendiamina dihidroclórico sobre un papel filtro en una placa vacía estéril, y se colocaron estrías, de las colonias a chequear sobre la gota. La reacción positiva se presentó con una coloración rosada intensa en la zona con el cultivo. La prueba de la catalasa consistió en colocar una gota con H₂O₂ al 3% sobre un porta objeto y posteriormente, colocar una de las colonias a chequear, la reacción positiva se evidenció por la formación de burbujas sobre la colonia. El resultado se informó como ufc/cm² (BROWN, 1982). Para el recuento confirmado se aplicó la fórmula descrita en (3.5).

3.7. Aislamiento de *Listeria monocytogenes*

En el laboratorio las muestras en el caldo LEB (3.2) fueron incubadas durante 24 y 48 h a 32°C ± 1 °C. A las 24 h de incubación, se sembró con asa un inóculo sobre placas de Agar selectivo, OXA (OXOID). El proceso se realizó nuevamente para el caldo incubado por 48 h. Las placas se incubaron durante 48 h a 35°C. Posteriormente se verificó la presencia de colonias sospechosas, las cuales se evidenciaron en Agar OXA, por ser redondas, con apariencia de gotas de rocío, levemente convexas, con borde completo y textura fina y por un halo negro, debido a la hidrólisis de la esculina.

Con el propósito de obtener cepas puras, se repicaron al menos tres de las colonias sospechosas, del agar selectivo en Agar soya tripticasa con extracto de levadura al 0,6% (TSA -Ye) (DIFCO), las cuales se incubaron a 25°C por 24 h. A partir de estos aislamientos se realizaron las pruebas de identificación de *L. monocytogenes* (FDA, 1992).

Pruebas para la identificación de *Listeria spp.*

Para la identificación de *Listeria spp* se aislaron 3 colonias sospechosas a las 24 y 48 h del agar selectivo (OXA), luego se repicaron para obtener cepas puras, en agar soya tripticasa con extracto de levadura al 0,6% (TSA-YE, DIFCO), las cuales se incubaron a 25°C por 24 h para realizar las pruebas de identificación. En el CUADRO 1 se demuestran las reacciones características para la identificación de *L. monocytogenes*.

Tinción de Gram: se realizó a partir de un cultivo fresco (TSA –YE, DIFCO) de 18 a 24 h de incubación. No debe utilizarse cultivos más antiguos, porque pasado este tiempo las cepas de *Listeria* tienden a la decoloración, es decir, pierden su capacidad para retener el cristal violeta y en cambio retienen la safranina, aparentando ser Gram negativas (HARRIGAN y McCANCE, 1976).

Reacción de la catalasa: se efectuó a partir de un cultivo fresco de 24 h de incubación en TSA-YE con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3%.

Motilidad en fresco: se utilizaron cultivos de 24 h incubados a 25°C en placas TSA-YE. Para la prueba se suspendió un inóculo de una colonia en suero fisiológico estéril y se observó la motilidad característica en tumbos, bajo el microscopio con aumento de 100 X.

Fermentación de hidratos de carbono: se prepararon tubos con caldo base púrpura carbohidratos (DIFCO) adicionados de xilosa, ramnosa o manitol al 0.5%, a partir de una solución al 10% del azúcar esterilizada por filtración. Los tubos fueron inoculados a partir de cultivos puros obtenidos desde agar TSA-YE e incubados por 7 días a 35°C. Reacción positiva: viraje a color amarillo del medio indicador (caldo base púrpura carbohidratos).

Reducción del nitrato. Se prepararon tubos con 2,5 ml de caldo nitrato (DIFCO), los cuales fueron inoculados a partir de cultivos puros obtenidos desde las placas de TSA-YE e incubados por 5 días a 35°C. Para la lectura a cada tubo se le agregó 0,1 ml de alfa-naftilamina (reactivo A) y 0,1 ml de ácido sufanílico (reactivo B). La reacción positiva se evidenció por la presencia de una coloración rojiza atribuible a la reducción de los nitratos. Al no observarse esta coloración, se agregó gránulos de zinc y se mantuvo en reposo hasta una hora. Si transcurrido este tiempo no se observó una coloración rojiza del medio, la prueba se consideró positiva, en cambio la presencia del color en esta etapa indicó una prueba negativa.

CUADRO 1. Reacciones características para *Listeria monocytogenes*.

PRUEBA	REACCION
Motilidad a 25°C (tumbos)	+
Requerimientos de oxígeno	Aerobia facultativa
Crecimiento a 35°C	+
Actividad de la catalasa	+
Reducción de nitrato	-
Fermentación del manitol	-
Fermentación de la xilosa	-
Fermentación de la ramnosa	+

3.8. Cálculo para la expresión de resultados en

2

3.8.1. Muestras de piel. Para obtener los resultados se contaron las colonias en la placa cuya dilución tenía entre 25 y 250 colonias, se multiplicó por 5 ml de buffer fosfato que contenían los tubos, luego se multiplicó por el exponente positivo de la dilución correspondiente en la cual se hizo el recuento, y se dividió por el total de la superficie muestreada. Para obtener la superficie se utilizó una plantilla de 50cm², la cual se multiplicó por dos que correspondió al N° de las superficies muestreadas, el resultado se informó en ufc/cm².

$$\text{Ufc/cm}^2 = \frac{\text{N}^\circ \text{ de colonias} \times 5 \times \text{dilución}}{\text{Superficie muestreada}} \quad \text{Ejemplo: } \frac{25 \times 5 \times 10^3}{100}$$

N° colonia: recuento de colonias en la placa.

5 : ml utilizados de buffer fosfato

Dilución: exponente positivo de la dilución en la cual se realizó el recuento

Superficie muestreada : expresada en cm² del área muestreada.

3.8.2. Muestras de branquias. Para obtención de resultados se utilizó el mismo procedimiento descrito en el punto (3.8.1), y para la estimación de la superficie se dibujó en papel cuadriculado una de las branquias del pescado, se contaron cuadrados consecutivos, y se multiplicó por 49 mm² (7 mm x 7mm) que corresponde al área del cuadrado, posteriormente se multiplicó por 3 que corresponde a la cantidad de branquias, y por 2 que corresponde a cada lado de la branquia y se obtuvo la superficie en cm² (Anexo 5).

$$\text{Ufc/cm}^2 = \frac{\text{N}^\circ \text{ de colonias} \times 5 \times \text{dilución}}{\text{Superficie muestreada}}$$

N° colonia: recuento de colonias en la placa.

5 : ml utilizados de buffer fosfato

Dilución: exponente positivo de la dilución en la cual se realizó el recuento

Superficie muestreada: expresada cm² del área muestreada

3.9. Diseño experimental

Se trabajo con un diseño de 2 x 5 con 5 repeticiones, para congrio y bacalao. Donde el factor 2 correspondió a piel y branquias, y el factor 5 a los lotes.

3.10. Análisis estadísticos

Se realizó un análisis de varianza, y una prueba de Tukey para diferencias significativas al 95%.

4. PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

4.1. Recuento microbiológico para piel y branquias de congrio

Los resultados obtenidos en los recuentos microbiológicos de congrio se presentan en la FIGURA 5 y ANEXO 1.

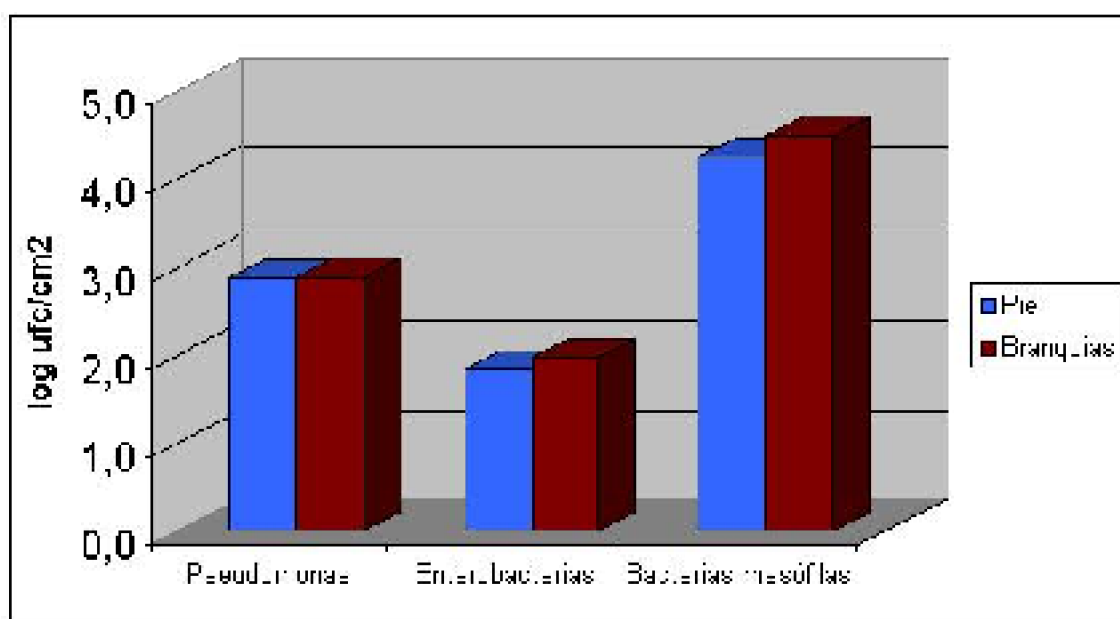


FIGURA 5. Recuentos microbiológicos en piel y branquias de congrio (Log ufc/cm^2).

Para *Pseudomonas* no existieron diferencias significas ($P > 0.05$) al igual que enterobacterias y bacterias aerobias mesófilas entre los recuentos de piel y branquias (ANEXO 6), obteniéndose recuentos bajos para *Pseudomonas* (10^3 ufc/cm^2). Ello puede deberse a que el pescado se encontraba generalmente en buen estado al momento de la toma de muestra, lo cual se constató, ya que las branquias presentaban un color rojo brillante, sin olor y la consistencia de la piel era firme y elástica. Además, el pescado había sido conservado refrigerado durante 3 a 4 días antes de la toma de muestra. Las *Pseudomonas* por ser psicrotróficas se desarrollan mejor en almacenamiento en hielo. Sin embargo, para congrio no se observó un aumento excesivo de este microorganismo.

Estos resultados se contraponen con lo indicado por KOUTSOUMANIS *et al.* (1999), quienes reportaron que las *Pseudomonas* son la población dominante en muestras de pescado del Mediterraneo (*Sparus Aurata*) almacenado aeróbicamente a 0°C , 8°C y 15°C .

Como se demuestra en la FIGURA 5 los recuentos en branquias fueron algo superiores en enterobacterias, siendo en general bajos. Esto concuerda con lo indicado por LOPEZ-SABATER *et al.* (1994) quien estudió la calidad bacteriológica del atún (*Thunnus thynnus*) y detectó que los recuentos de enterobacterias en atún, en condiciones de refrigeración, siempre fueron bajos y solo representó una pequeña proporción de la carga total bacteriana (0,34%). Sin embargo, los autores señalan que los recuentos de enterobacteriasse incrementaron con la manipulación durante el proceso de limpieza y evisceración.

Para el recuento de bacterias aerobias mesófilas los recuentos fueron superiores a los otros dos parámetros de recuentos. El Reglamento Sanitario de los alimentos (CHILE, MINISTERIO DE SALUD, 2003) establece para pescado fresco congelado valores en el recuento total de bacterias aerobias mesófilas viables de $m = 5 \times 10^5$ y $M = 10^6 \text{ ufc/g}$, por lo cual los valores encontrados estarían dentro de los rangos permitidos. Durante la toma

de muestra de congrio, los pescados se encontraban a temperatura ambiente (promedio 13°C aproximadamente), lo cual permite suponer que hubo un leve incremento de estos microorganismos después de la captura. Otra causa probable de aumento de estos microorganismos son las condiciones higiénicas desde la captura hasta la venta de los pescados, las cuales probablemente no fueron las adecuadas. La manipulación es otro factor que aumenta los microorganismos aerobios mesófilos se puede pensar que las personas que manipularon los pescados se encontraban con las manos sucias. El recuento de bacterias aerobias mesófilas es uno de los principales criterios de aceptación de productos alimenticios debido a que pone en evidencia las prácticas de procesamiento deficiente y es un indicador de vida útil (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF), 1980).

Los resultados de este estudio concuerdan con lo estudiado por (PULLELA *et al.*, 1998; NEDOHULA Y WESTHOFF, 1993). Ellos afirman que en peces capturados desde aguas frías, y libres de contaminación, generalmente se obtienen recuentos de bacterias mesófilas y psicrotrofos en la superficie de la piel de 10^2 a 10^5 ufc/cm², y de 10^2 a 10^6 ufc/g en las agallas.

4.1.2. Recuento microbiológico en piel y branquias para bacalao. Los resultados de los recuentos para bacalao se presentan en la FIGURA 6 y en el ANEXO 2. Para *Pseudomonas*, enterobacterias, y bacterias aerobias mesófilas los recuentos en piel y branquias arrojaron que no existieron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los puntos evaluados (ANEXO 7).

Se puede observar que los microorganismos predominantes fueron las *Pseudomonas*, con un recuento levemente superior en la piel que en branquias. Estos resultados en bacalao eran esperados, por las condiciones de almacenamiento del pescado, de aproximadamente 15 días en alta mar, con almacenamiento en hielo lo que hace aumentar los microorganismos psicrotrofos. De igual forma los resultados de GELMAN *et al.*, (2001) indicaron que luego de 15 días de almacenamiento del pescado a temperatura de refrigeración, las bacterias mesófilas y gram positivas en la piel del pescado, fueron reemplazadas gradualmente por flora gram negativa, principalmente por *Pseudomonas*.

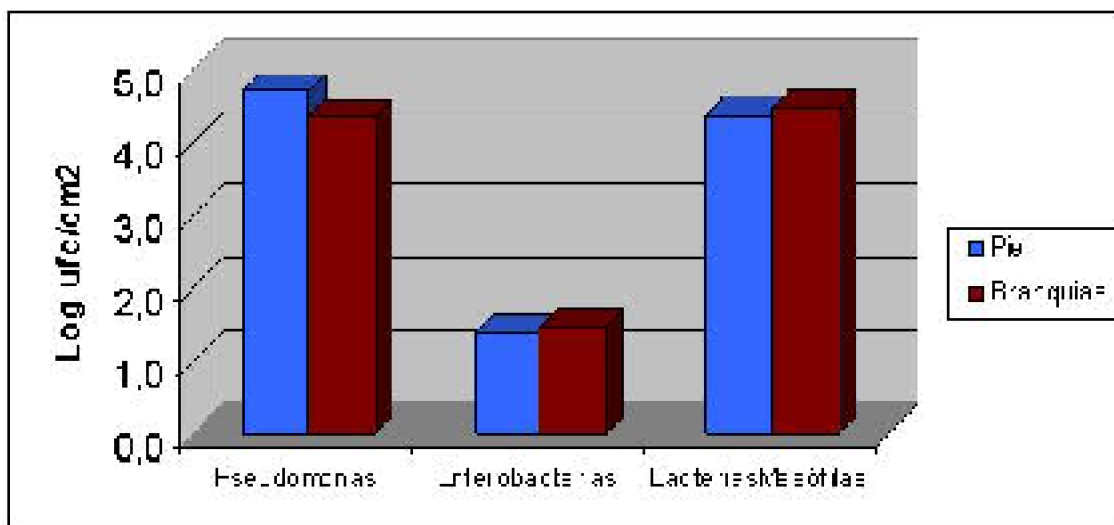


FIGURA 6. Recuento microbiológico en piel y branquias de bacalao (Log ufc/cm^2).

DEVARAJU y SETTY (1985), afirman que la composición de la microflora cambia dramáticamente durante el almacenamiento. De esta forma, después de 1 a 2 semanas de almacenamiento aeróbico en hielo, la flora está constituida casi exclusivamente por *Pseudomonas spp* y *Shewanella putrefaciens*.

Para el recuento de enterobacterias, como se observa en la FIGURA 6 no existieron diferencias significativas entre piel y branquias, mostrándose un leve incremento para branquias. Las enterobacterias son organismos indicadores de la calidad higiénica (CAMPOS, 1995). Los recuentos encontrados fueron bajos, lo cual hace presumir que las condiciones higiénicas de conservación del producto fueron adecuadas. También es importante destacar el lugar de captura de los peces, lo que hace presumir que fueron capturados en aguas sin contaminación, y la forma de conservación del producto en barcos cerrados, exentos de contaminación medio ambiental, por ejemplo pájaros. También es importante la temperatura en el que se encontraban los pescados, estas fueron tomadas a la altura de las branquias y fluctuaron entre (0,5 – 1,0 °C) lo que hace suponer que las condiciones no fueron favorables para el crecimiento de estos microorganismos.

Para bacterias aerobias mesófilas, como se muestra en la FIGURA 6, existió un recuento elevado, similar a *Pseudomonas*. Las bacterias aerobias mesófilas también pueden sobrevivir a temperaturas de refrigeración, pero crecen en forma lenta, se debe tomar en cuenta que al momento de la toma de muestra habían transcurrido aproximadamente 15 días, lo que hace suponer un aumento en la proliferación bacteriana, además la presencia de estos microorganismos en los alimentos puede estar relacionada directamente con el estado de frescura del producto, ya que no todos los peces estaban totalmente frescos al momento de la toma de muestra, esto se evidenció en algunas muestras por la coloración rojo opaco de las branquias. Otro factor importante es la manipulación del producto lo que hace aumentar estos microorganismos, ya que debe haber existido bastante manipulación desde la captura hasta la llegada a la planta.

4.1.3. Comparación de los recuentos en piel entre bacalao y congrio. En la FIGURA 7 se pueden apreciar los promedios para cada recuento y la comparación entre piel de congrio y piel de bacalao. En los recuentos de *Pseudomonas* en piel se puede apreciar que hubo un mayor número para bacalao debido a la forma de almacenamiento prolongado en hielo de esta especie. Se debe tomar en cuenta que las dos especies bacalao y congrio tienen diferentes formas de almacenamientos, el bacalao es capturado y es mantenido en hielo durante aproximadamente 15 días lo que facilita el desarrollo de *Pseudomonas*. El congrio en algunas ocasiones se vende fresco, el máximo tiempo de enfriamiento son 3 a 4 días, donde las *Pseudomonas* pudieran crecer en forma más lenta y menor cantidad por el tiempo de exposición al hielo. En relación a enterobacterias y bacterias aerobias mesófilas los recuentos son similares a los de branquias.

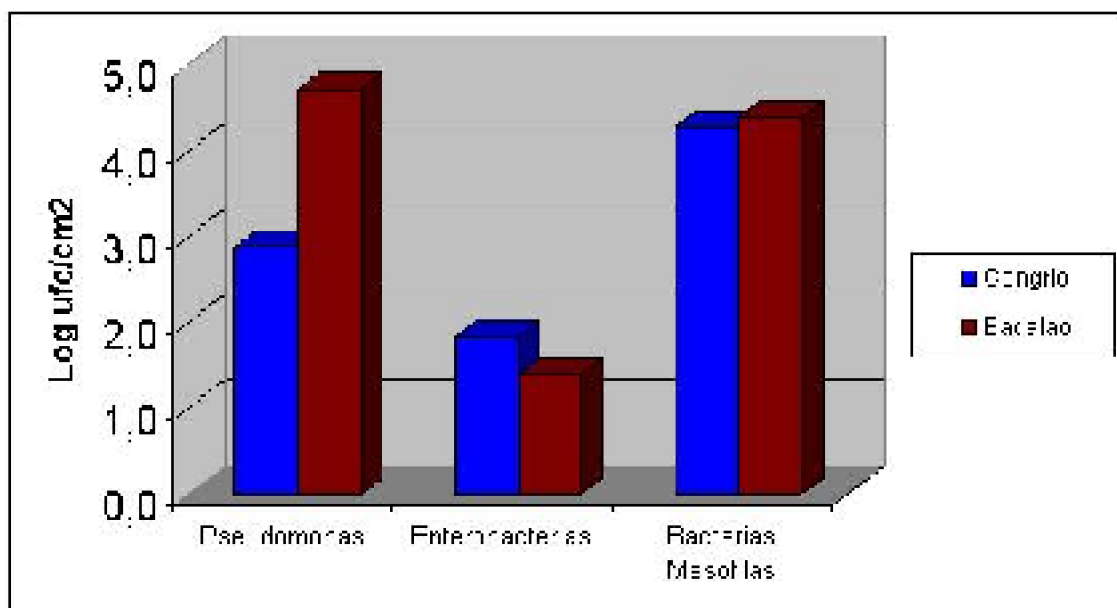


FIGURA 7. Recuento microbiológico expresado en log ufc/cm² en piel de congrio y de bacalao.

4.1.4. Comparación de los recuentos en branquias entre bacalao y congrio. Se puede observar en la FIGURA 8 que los recuentos microbiológicos para branquias en muestras de bacalao y congrio para los tres tipos de microorganismos fueron similares a los recuentos obtenidos en muestras de piel.

Para *Pseudomonas* en branquias el mayor aumento de este microorganismo se observa en bacalao, esto se debe exclusivamente al tiempo de exposición del pescado en hielo, y también al grado de deterioro que pudiera haber presentado el producto.

Con respecto a las enterobacterias en la FIGURA 8 se observa que existe un mayor aumento en branquias de congrio, esto pudo deberse exclusivamente a la manipulación de esta especie, entorno medio ambiental, y lugar de las aguas donde fue capturado el pescado.

Los microorganismos aerobios mesófilos se encontraron en cantidades similares en las branquias de congrio y bacalao. Para bacalao un aumento de estos microorganismo puede deberse exclusivamente al estado de frescura del producto, en relación al congrio, su aumento se puede deber a la manipulación, y exposición a temperatura ambiente del pescado.

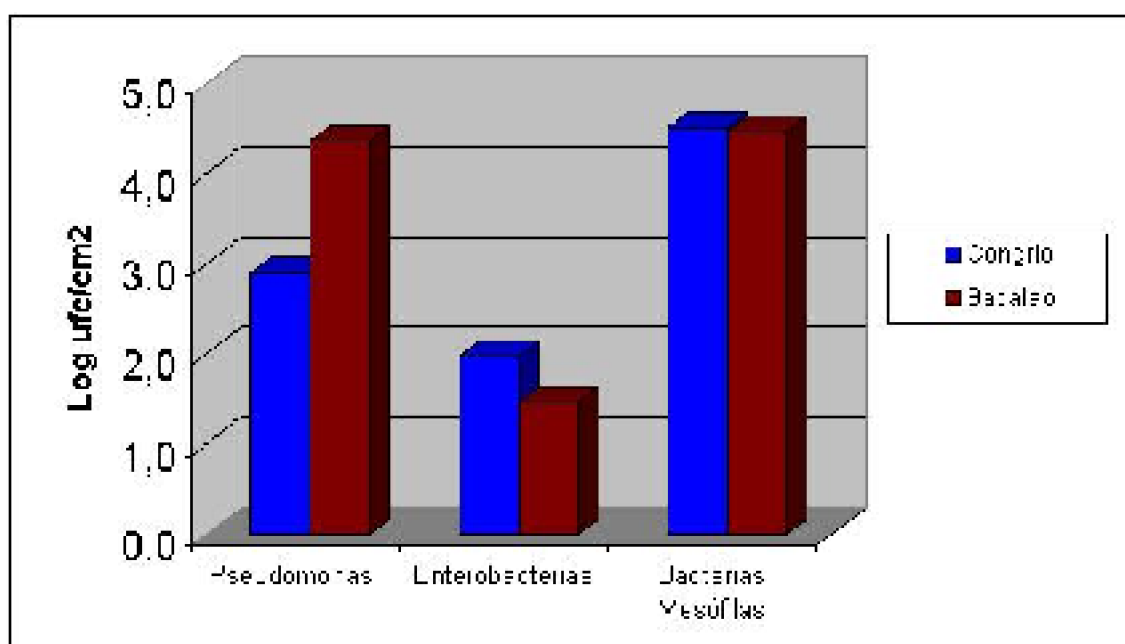


FIGURA 8. Recuentos microbiológicos expresados en log ufc/cm² en branquias de congrio y bacalao.

4.2. Variaciones en los recuentos de Pseudomonas entre fechas de muestreo para congrio y bacalao

En la FIGURA 9 se muestran las variaciones de los recuentos de *Pseudomonas* de congrio, tomadas en 5 distintas fechas de muestreo (5 lotes), cada uno de ellos conformado por 5 muestras.

Los recuentos entre los lotes de pescado (piel y branquias), mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) indicando que los lotes 2 y 3 tuvieron recuentos mayores que el resto de los lotes (ANEXO 6).

Esta diferencia de los lotes pudo deberse, a la distinta procedencia de captura de los peces durante el período en que se tomaron las muestras, y diferentes tiempos desde su extracción, hasta la toma de muestras.

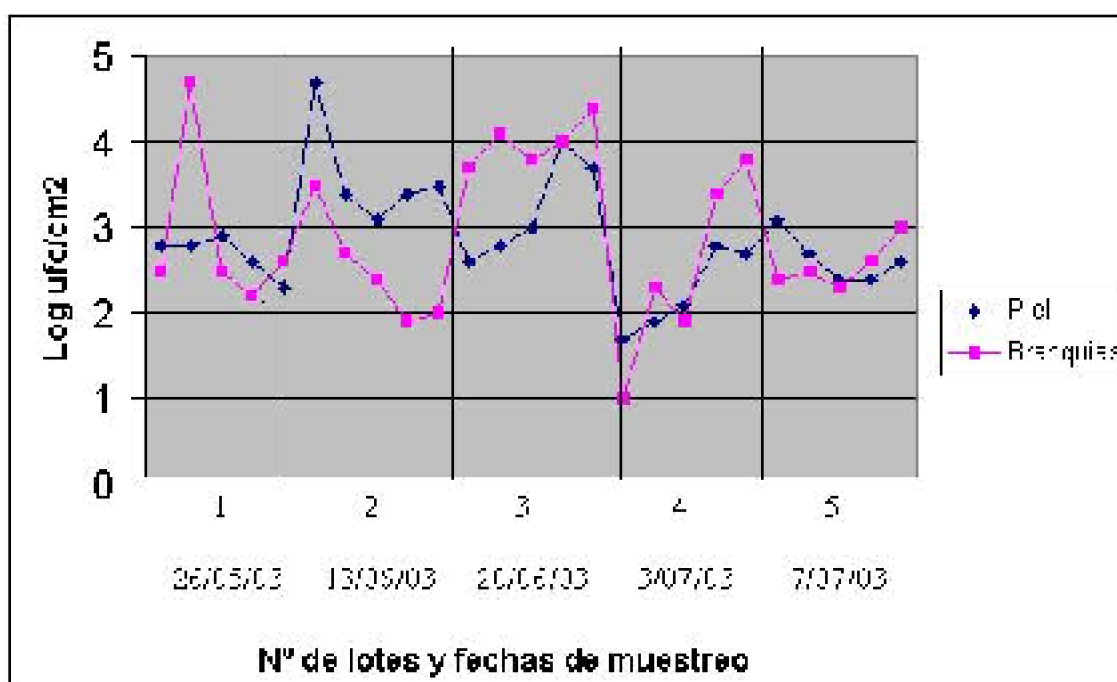


FIGURA 9. Variaciones en los recuentos de *Pseudomonas* en muestras de congrio entre distintos lotes de muestreo.

En la FIGURA 10 se muestran las variaciones de los recuentos de *Pseudomonas* para bacalao, tomadas en 5 distintas fechas de muestreo.

Los recuentos de *Pseudomonas* entre los lotes de pescado (piel y branquias) para bacalao, mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$), indicando que el lote N°4 presenta un promedio significativamente menor con respecto al resto de los lotes (ANEXO 7).

Esto pudo deberse a las condiciones de almacenamiento del producto. Las muestras fueron tomadas desde abril hasta septiembre y pudo haber existido una pérdida de la cadena de frío en alguno de los lotes muestreados, lo cual hizo variar los recuentos. Debe considerarse además los días de almacenamiento del producto aproximadamente 15 días, y en algunos muestreos 16-17 días lo que hace suponer un deterioro del producto.

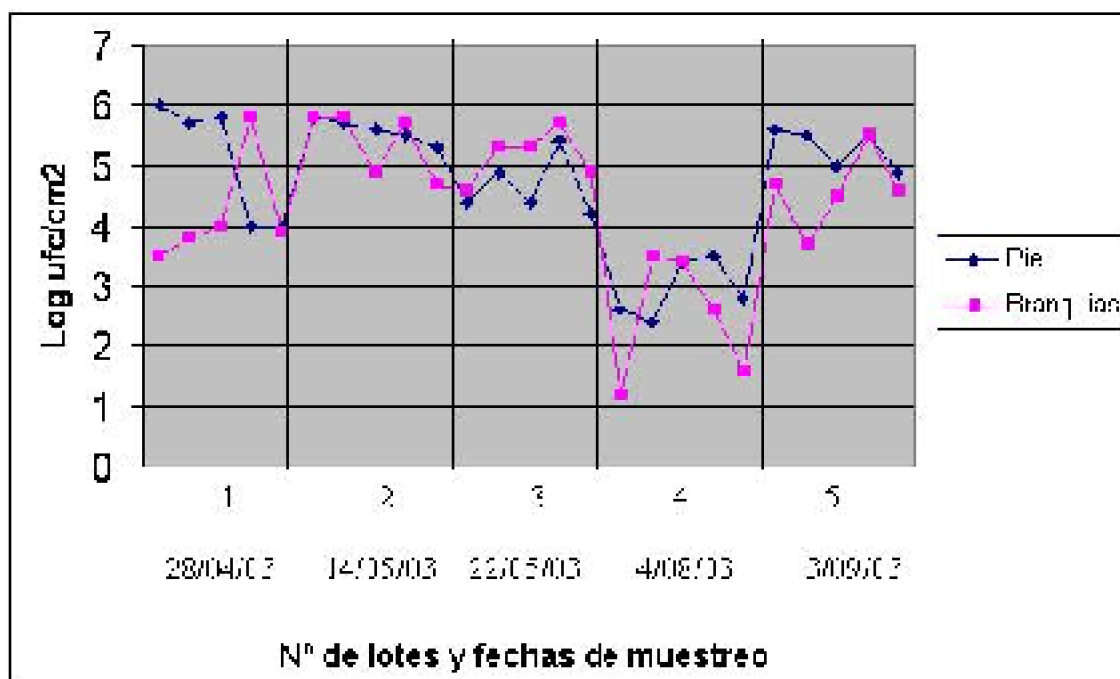


FIGURA 10. Variaciones en los recuentos de *Pseudomonas* en muestras de bacalao entre distintos lotes de muestreo.

Para enterobacterias y bacterias aerobias mesófilas en congrio y bacalao los resultados se muestran en los ANEXOS 3 y 4 y los análisis estadísticos en los ANEXOS 6 y 7.

4.3. Presencia de *Listeria monocytogenes* en muestras de bacalao y congrio

En la FIGURA 11 se puede apreciar los porcentajes de presencia de *L. monocytogenes* en bacalao y congrio. Como se observa en bacalao se encontró *L. monocytogenes* en un 4% de las muestras de un total de 25 muestras. Para congrio existió un mayor porcentaje de muestras positivas (40%) también de un total de 25 muestras.

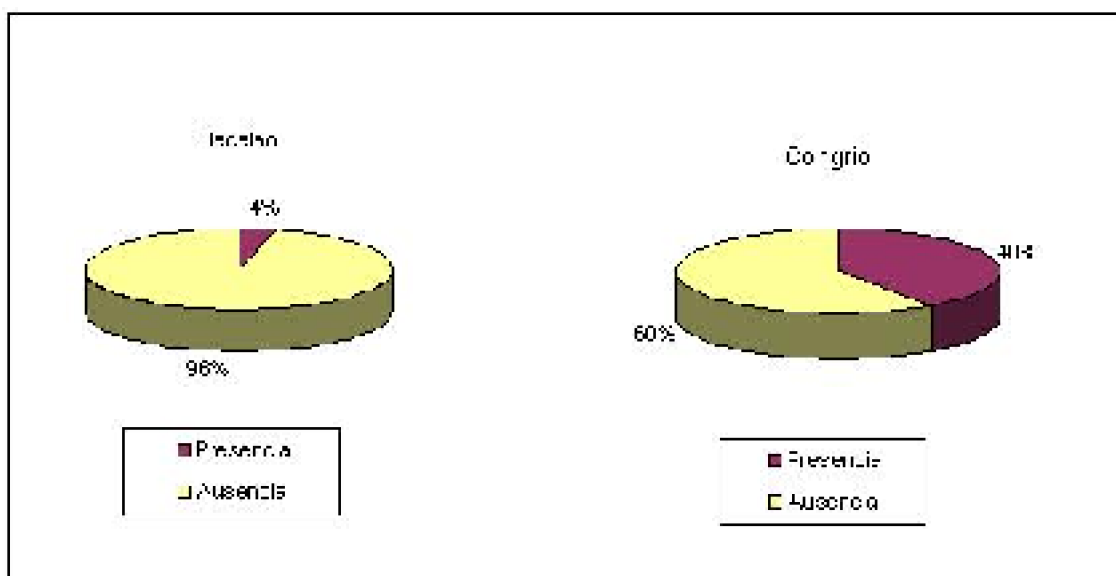


FIGURA 11. Presencia de *Listeria monocytogenes* en muestras de bacalao y congrio.

La mayor presencia de *L. monocytogenes* en congrio puede deberse a varios factores como por ejemplo, las aguas desde donde fueron capturados los pescados, materia vegetal, los insectos, pájaros (gaviotas), los manipuladores y el medio ambiente. Brackett, citado por FERRER (1993), afirma que los animales domésticos eliminan la bacteria por vía entérica, eliminando el microorganismo al suelo, el cual sobrevive por largos períodos de tiempo en el medio ambiente en forma saprofita. Por efecto de arrastre de las lluvias el microorganismo llega a los cauces de los ríos y acequias, que desaguan directamente al mar, contaminando el medio acuático.

COLBURN *et al.*, (1990), destaca el rol que pueden jugar las aves marinas y su influencia como contaminante del medio acuático, ya que las aves en sí constituyen un reservorio de importancia para *L. monocytogenes*. APHUN *et al.*, (1999), reportaron la distribución de bacterias en pescados de agua dulce e identificaron a *L. monocytogenes* como microflora común del intestino del pescado. Como parte de la microflora en el intestino del pescado esta bacteria constituye un alto riesgo en el proceso de evisceración. Cualquier derrame durante la remoción del tracto digestivo, puede contaminar la piel del pescado con *L. monocytogenes*, la cual puede sobrevivir aún cuando el pescado es mantenido a temperatura de refrigeración. Se debe tomar en cuenta que estos pescados fueron capturados en forma artesanal en lanchas y el tiempo transcurrido hasta su venta puede haber sido de aproximadamente 3 a 4 días, durante ese periodo puede haber existido contaminación cruzada entre los factores mencionados anteriormente y además el lugar donde fueron mantenidos los pescados refrigerados antes de su venta puede ser fuente de contaminación. Es muy importante destacar que las muestras fueron tomadas del pescado eviscerado, una de las posibles causas de contaminación por el intestino de los peces, si este no fue removido adecuadamente.

En el CUADRO 2 se puede apreciar la presencia de un mayor número de muestras positivas de *L. monocytogenes* en congrio para muestras de piel que en branquias. En bacalao se detectó sólo en una muestra de piel.

CUADRO 2. Frecuencia de aislamiento de *L. monocytogenes* después de 24 y 48 h de incubación de las muestras de piel y branquias en caldo de preenriquecimiento.

CONGRIO	PIEL	BRANQUIAS
Muestra N° 14	—	24 h
Muestra N° 15	48 h	—
Muestra N° 16	48 h	—
Muestra N° 17	24 h – 48 h	—
Muestra N° 20	24 h – 48 h	—
Muestra N° 21	24 h	24 h – 48 h
Muestra N° 22	48 h	48 h
Muestra N° 23	24 h – 48 h	—
Muestra N° 24	48 h	—
Muestra N° 25	24 h – 48 h	24 h – 48 h
BACALAO	PIEL	BRANQUIAS
Muestra N° 17	24 h – 48 h	—

Esto hace suponer que la contaminación de *L. monocytogenes* en piel para congrio pudo deberse exclusivamente por la manipulación inadecuada, el medio ambiente, el lugar de las aguas donde fue capturado el pescado y los pájaros.

En relación a las branquias donde la cantidad de muestras positivas es menor la contaminación pudo deberse a las aguas donde fueron capturados los pescados.

En este estudio se encontró un 40% de muestras positivas con *L. monocytogenes*, las cuales son mayores a las reportadas por otros países como Japón con un (6.4%), Norte América y Europa con un (10%) (YAMAZAKI *et al.*, 2000).

PULLELA *et al.*, (1998) reportaron la presencia de *L. monocytogenes* desde trucha arco iris crecidas en centros de cultivo en recirculación desde donde la frecuencia de las muestras positivas variaron desde un 20 a un 90%. Este estudio también muestra relación con las muestras positivas encontradas en congrio de un 40% en el mercado fluvial.

En la FIGURA 11 se aprecia que el porcentaje de *L. monocytogenes* encontrado en bacalao es bastante bajo al comparar con las muestras de congrio, y fue aislada sólo en piel lo que hace suponer que la contaminación es exclusivamente por manipulación, contaminación cruzada del lugar de mantención del producto y por el lugar de las aguas. Además se debe tomar en cuenta que *L. monocytogenes* también puede crecer a temperaturas de refrigeración (KARUNASAGAR *et al.*, 1999), ya que al momento de la toma de muestra el pescado se encontraba refrigerado. Se puede deducir que el porcentaje menor de muestras positivas con *L. monocytogenes* puede deberse a que el pescado se encontraban en un lugar cerrado durante el almacenamiento lo que reduce la contaminación por exposición con el medio ambiente y por medio de pájaros e insectos, y que el lugar de las aguas donde fueron capturados los pescados presentaban menor índice de contaminación con esta bacteria.

Debido a la alta tasa de mortalidad asociada a este microorganismo, la FDA ha

impuesto cero tolerancia para *L. monocytogenes*, en alimentos que no requieran de tratamiento térmico previo a su consumo (POYSKY *et al.*, 1997). Otros países de la Unión Europea, sin embargo, aceptan niveles bajos de < 10 ufc/g para este microorganismo. En Chile, no se acepta la presencia de este patógeno en productos pesqueros ahumados (SERNAPESCA, 1998).

MIETTINEN *et al.*, (2001) evaluaron la contaminación de las superficies, y la presencia de *L. monocytogenes* en fabricas procesadoras de pescado, y detectaron en pescado crudo un total de 12% en las muestras analizadas, en comparación con otros estudios donde la incidencia fue mas alta 27% y 15%, respectivamente. En relación a las muestras positivas encontradas en este estudio en bacalao el porcentaje fue bastante menor un 4% en comparación con los otros estudios.

FARBER, (1991) reportó la presencia de *L. monocytogenes* en salmón crudo desde USA, Chile, Noruega y Canadá. *L. monocytogenes* fue aislada desde el agua descongelada, desde la superficie del salmón crudo, desde la tabla de fileteo, desde el agua de lavado de los pescados, y desde los recortes de los diferentes productos de una planta de ahumado en frío, y concluyó que la inicial fuente de contaminación fue el pescado crudo.

4.4. Presencia de *E. coli* en muestras de congrio y bacalao

En la FIGURA 12 se aprecia que no se encontró *E. coli* en bacalao. En congrio se observa un 28% de muestras positivas. En congrio los factores que puedan haber influenciado la contaminación con *E. coli* pueden ser varios entre ellos medio ambiental, manipulación, lugar de conservación del producto, lugar de las aguas donde fueron capturados los pescados. En relación al lugar de las aguas donde fueron capturados los pescados, estas pueden haber tenido algún grado de contaminación por aguas servidas, y animales pertenecientes a terrenos aledaños al estuario del río Valdivia. Las cajas de madera donde se dejaban los peces pudieron haber estado contaminadas, también por el medio ambiente por pájaros como por ejemplo gaviotas, el lugar de conservación del producto antes de su venta al público pudo haber estado contaminado y con poca higiene, y además la manipulación de las personas con manos sucias. Altas cifras de *E. coli* en un alimento sugieren una falta general de limpieza en el manejo del mismo y en el almacenamiento inadecuado (VILLALOBOS, 2000).

E. coli está normalmente asociada con contaminación fecal de animales de sangre caliente y el hombre, no está naturalmente presente en pescado o productos marinos, cuando se encuentra es producto de procesos de contaminación y manipulación (OROZCO, 2000).

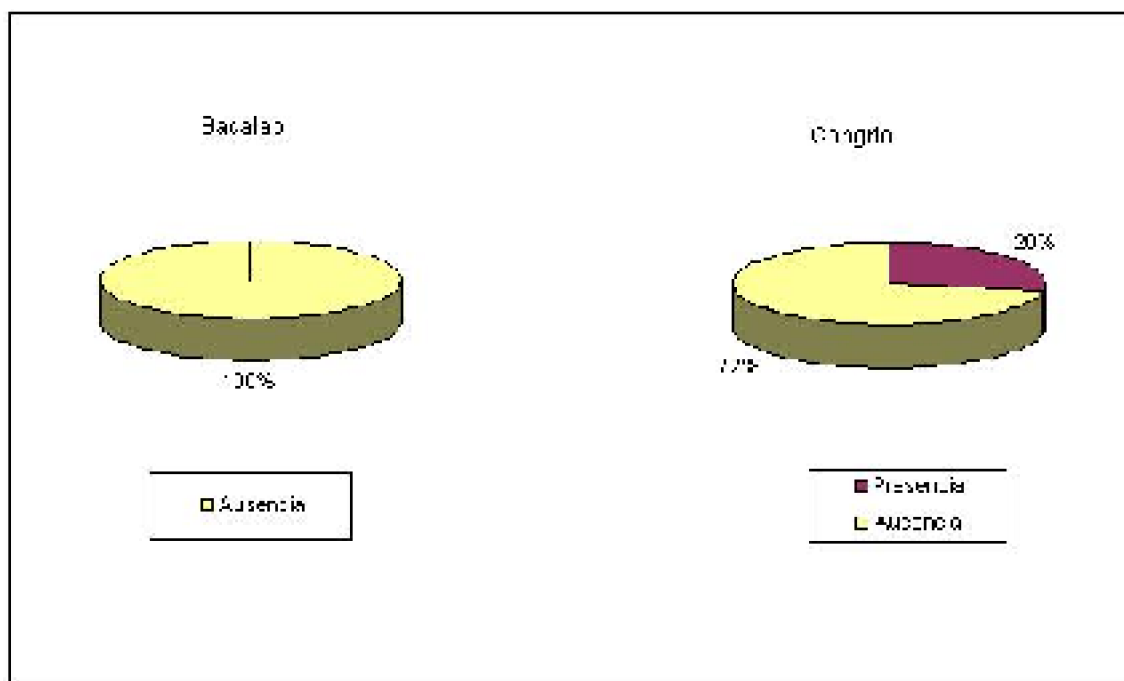


FIGURA 12. Presencia de *E. coli* en muestras de bacalao y congrio.

Otro de los factores importantes que contribuye a la contaminación es que el pescado durante su venta se encontraba en un lugar abierto y a temperatura ambiente, próximo al río, durante 3 a 4 días y refrigerado durante la noche, esto concuerda con lo afirmado por (SCHÖBITZ *et al.*, 1985) para la especie jurel (*Trachurus murphy*), en el cual el área de estudio posee características similares a este trabajo, ya que la toma de las muestras ocurrió en el mismo lugar donde estas especies se comercializaban.

CUADRO 3. Presencia de *E. coli* en muestras de piel y branquias para congrio

muestras	Nº 6	Nº 7	Nº 8	Nº 9	Nº 16	Nº 17	Nº 19
Piel	$1,5 \times 10^2$	$5,1 \times 10^2$	$9,3 \times 10^1$	$5,4 \times 10^2$	(-)	$8,0 \times 10^1$	(-)
Branquias	(-)	$2,8 \times 10^1$	(-)	$1,7 \times 10^1$	$1,8 \times 10^1$	(-)	$9,3 \times 10^1$

En el CUADRO 3 se puede observar que la mayor presencia de *E. coli* se encuentra en piel, lo que hace suponer que la mayor contaminación es por medio de la manipulación después de haber sido capturado el pescado, por condiciones del medio ambiente, y el lugar de mantención del producto. En relación a la contaminación en las branquias esto puede deberse exclusivamente al lugar de las aguas donde se capturaron los pescados. AL-HARBI (2003) realizó un estudio donde detectó la flora bacteriana de Tilapia híbrida (*Oreochromis niloticus*) y encontró *E. coli* en 6 muestras de branquias que correspondían a un 3.28%, en relación a este estudio el número de muestras positivas en branquias (4) es similar. Se debe destacar que las muestras tomadas de un lote se encontraba fuera de los límites establecidos por el Reglamento Sanitario de los alimentos (CHILE, MINISTERIO DE SALUD, 2003), donde la cantidad máxima de unidades defectuosas que puede contener el lote es de $c = 3$, y el tamaño de muestra a ser examinadas $n = 5$, se encontró cuatro muestras positivas de un lote de 5 muestras.

GONZALES et al., (2001) analizaron filetes de trucha y salmón fresco obtenidos de una cadena de supermercados, y evaluó la frescura y calidad bacteriológica durante el almacenamiento a 3°C, cuando las muestras fueron analizadas para coliformes fecales y *E. coli* fueron detectados en dos lotes de filetes de trucha después de 10 días de almacenamiento y un lote de filetes de salmón, después de 7 días de almacenamiento. Cabe destacar que *E. coli* solo fue detectada cuando el pescado se encontraba deteriorado. Este análisis concuerda con el presente estudio donde se detectó *E. coli* en dos lotes muestreados.

Con respecto a la especie bacalao no se encontró *E. coli*, resultado que pudo deberse al lugar de las aguas donde fueron capturados los peces, posiblemente las aguas estaban libres de contaminación, y el lugar donde son almacenados los peces luego de su captura se debe haber encontrado con mayor grado de higienidad. Además, estos peces se encontraban con hielo, lo que hace presumir que por la temperatura óptima de crecimiento de *E. coli*, este microorganismo no pudo desarrollarse. ESTEVAO y PUCCI (2000) afirman que estos microorganismos son malos competidores en condiciones de refrigeración. El lugar de conservación de los peces es cerrado, por lo que se presume que no hubo contaminación del medio ambiente como insectos, pájaros (gaviotas).

5. CONCLUSIONES

No se obtuvieron diferencias significativas entre los recuentos de *Pseudomonas*, enterobacterias, y bacterias aerobias mesófilas entre las muestras tomadas de piel y branquias, para bacalao y congrio, obtenidos en una planta procesadora y la feria fluvial de la ciudad de Valdivia.

En bacalao el microorganismo predominante fue *Pseudomonas*, en cambio en congrio los mayores recuentos se presentaron para bacterias aerobias mesófilas. Lo cual refleja el estado de frescura del producto y las condiciones higiénicas.

Se encontraron diferencias significativas entre lotes de muestreo para bacalao en los recuentos para *Pseudomonas*, enterobacterias, y bacterias aerobias mesófilas. En congrio en cambio se obtuvieron diferencias significativas en los recuentos de *Pseudomonas* y bacterias aerobias mesófilas. Lo cual indica variaciones en los niveles de contaminación, y diferencias en las temperaturas de conservación de los pescados.

Listeria monocytogenes fue detectada en ambas especies de pescado, con un 40% en congrio y un 4% en bacalao. *E.coli*, se encontró en un 28% de las muestras de congrio y no se detectó en bacalao. La mayor contaminación patógenos en congrio indicó que existe un mayor riesgo en el consumo crudo de este pescado.

BIBLIOGRAFIA

- AL- HARBI, A. 2003. Quantitative and qualitative studies on bacterial flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultures in earthen ponds in Saudi Arabia. *Aquac. Reser.* 34 (2): 43-48.
- ALVARADO, V., SCHAFER, W., ENRIQUEZ, R., MONRAS, M. 1989. Enfermedades bacterianas en peces y sus técnicas diagnosticas. Curso de post-grado. Universidad Austral de Chile Valdivia, Facultad de Ciencias Veterinarias. Instituto de Ictiopatología. 90 pp.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. (APHA). 1992. (R.T. Marshal ed.) Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 16 th ed. American Public Health Association, Washington D.C. 546 pp.
- APHUN, K., YUSOF, A.M. y JUGANG, K. 1999. Distribution of bacteria in tropical freshwater fish and ponds. *Int. J. Environ Health Res.* 9 (4): 285-292.
- ARRIZAGA, A., OYARZUN, C., TRONCOSO, A., FERNANDEZ, S., SOTO, V., y AVELLO, E. 1984. Antecedentes biológicos y pesqueros (preliminares) de *D. eleginoides*. Smitt 1898. Perciformes. Nototheniidae en el litoral de la VIII Región. Resumen cuarta Jornada de Ciencias del Mar. 03/05/84. 56 p.
- AUSTIN, B. y AUSTIN, D.A. 1999. Bacterial fish pathogens. Disease of farmed and wild fish. Published in association with Praxis Publishing, Chichester. 455 pp.
- AUSTIN, B. y AUSTIN, D.A. 1987. Bacterial microflora of fish. In : Bacterial fish pathogens. Ellis Horwos Limited Publications. England. 457pp.

- BORE, D. y MARTINEZ, E. 1981. Catálogo de recursos pesqueros. Chile. Instituto de Recursos Pesqueros (IFOP). Chile. 92 pp.
- BRAUDE. A. I. 1981. Medical Microbiology and Infectious diseases. Vol II. W. B. Saunder Company Philadelphia. 1935 pp.
- BREMNER, H.A. y HALLET, I.C. 1985. Muscle fiber-connective tissue junctions in the blue grenadier (*Macruronus novaezelandiae*). A scanning electron microscope study. J. Food. Sci. 50: 975-980.
- BROWN, M.H. 1982. Meat microbiology. Applied Science Publishers Ltd. Essex, England. 529 pp.
- CAMPOS, P. 1995. Determinación de los puntos críticos de contaminación bacteriana en la línea de proceso de una industria elaboradora de pescado fresco congelado de la décima región. Tesis Med. Veterinaria. Valdivia. Universidad Austral de Chile. Instituto de Medicina Preventiva, Facultad de Ciencias Veterinaria. 60 p.
- CHILE, MINISTERIO DE SALUD, 2003. Reglamento Sanitario de los Alimentos. Editorial Publibley. Santiago. Chile. pp. 77.
- CHILE, SERVICIO NACIONAL DE PESCA (SERNAPESCA), 1998. Programa de certificación de producto final. Norma técnica sección 1. Productos pesqueros de exportación destinados al consumo humano. Planes de muestreo y estándares de certificación de producto final. 67 p.
- CHILE, SERVICIO NACIONAL DE PESCA (SERNAPESCA), 1999. Anuario estadístico de pesca. República de Chile. Ministerio de economía, fomento y reconstrucción. Santiago. Chile. 106p.
- CHILE, SERVICIO NACIONAL DE PESCA (SERNAPESCA), 2000. Anuario estadístico de pesca. República de Chile. Ministerio de economía, fomento y reconstrucción. Santiago. Chile. 98p.
- COLBURN, K.C., KAYSNER, C.A., ABEYTA, C. Y WEKELL, M.M. 1990. *Listeria* species in a California coast estuarine environment. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2007-2011.
- DEVARAJU, A.N. y SETTY, T.M.T. 1985. Comparative study of fish bacteria from tropical and cold temperate marine water. In: Reilly, A. (ed). Spoilage of tropical fish and product development. FAO Fish. Rep. 317: Suppl., 97- 107.
- DOYLE, M.E., MAZZOTTA, A.S., WANG, T., WISEMAN, D.W., y SCOTT, V.N. 2001. Heat Resistance of *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 64 (3): 410-429.
- EDWARDS, R.A., DAINY, R.H. y HIBBARD, C.M. 1987. Volatile compounds produced by meat *Pseudomonas* and related reference strains during growth on been stored in air at chill temperatures. J. Appl. Bacteriol. 62: 403-412.
- ESTEVAO, S., PUCCI, O.H. 2000. Controles microbiológicos y puntos de control en una planta elaboradora de filete de merluza para exportación. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 50 (2): 171-176
- FARBER, J.M. 1991. *Listeria monocytogenes* in fish products. J. Food Prot. 54 (12): 922-924.
- FERRER, J.A. 1993. Detección de *L. monocytogenes* en pescado fresco y en agua, provenientes de cuatro áreas de recolección de productos marinos. Tesis Med.

- Veterinaria. Valdivia. Universidad Austral de Chile. Instituto de medicina preventiva, Facultad de Ciencias Veterinarias. 39p.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, (FAO). 1998. El pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad. Documento Técnico de Pesca. N° 348. Roma. Huss, H.H. (ed.). 202p.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, (FDA). 1992. Bacteriological Analytical Manual. (7th ed) Published and Distributed by AOAC. Wilson Blvd, Suite 400 Arlington, VA. 529 pp.
- GELMAN, A., GLATMAN, L., DRABKIN, V., y HARPAZ, S. 2001. Effects of storage temperature and preservative treatment on shelf life of the pond-rised freshwater fish, silver perch (*Bidyanus Bidyanus*). J. Food Prot. 64 (10): 1584-1591.
- GONZALEZ, C.J., LOPEZ, T.M., GARCIA, M.L., PRIETO, M. y TERO, A. 1999. Bacterial microflora of wild brown trout (*Salmo trutta*), wild pike (*Esox lucius*), and aquacultures rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Food Prot. 62 (11): 1270-1277.
- GONZALEZ, M.N., SANZ, J.J., SANTOS, J.A., OTERO, A., y GARCIA, M.L. 2001. Bacteriological quality of aquacultured freshwater fish portions in prepackaged trays stored at 3°C. J.Food Prot. 64 (9): 1399-1404.
- GRAM, L., WEDELL-NEERGAARD, C. y HUSS, H.H. 1990. The bacteriology of spoiling Lake Victorian Nile perch (*Lates niloticus*). Int. J. Food Microbiol. 10: 303-316.
- HARRIGAN, W.F. y McCANCE, M.E. 1976. Laboratory methods in food and Dairy microbiology. Techniques in Applied microbiology part II. Academic Press. London New York. San Francisco. 451p.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS, (ICMSF). 1980. Ecología microbiana de los alimentos. Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos en los alimentos. Editorial Acirbia. Zaragoza. España. 332 pp.
- KARUNASAGAR, I., KARUNASAGAR, P. y REILLY, A. 1999. *Listeria monocytogenes*, a new microbiological hazard in seafood. In: Aquaculture and biotechnology. Science Publishers. pp. 13-33.
- KOOHMARAIE, M. 1992. The role of Ca²⁺ dependent proteases in *post mortem* proteolysis and meat tenderness. Biochimie. 74: 239-245.
- KOUTSOUMANIS, K., LAMPROPULOU, K. y NYCHAS, G.E. 1999. Biogenic amines and sensory changes associated with the microbial flora of mediterranean gilt - head sea bream (*sparus aurata*) stored aerobically at 0,8 and 15°C. J. Food Prot. 62 (4): 398-342.
- LOPEZ-SABATER, E.I., RODRIGUEZ-JEREZ, J.J., ROIG-SAGUEZ, A.X., y MORA-VENTURA, M.A. 1994. Bacteriological quality of tuna fish (*Thunnus thynnus*) destined for canning: Effect of tuna handling on presence of histidine decarboxylase bacteria and histamine level. J. Food Prot. 4: 318-323.
- MIETTINEN, H., AARNISALO, K., SATU, S. Y SJOBERG, A. 2001. Evaluation of surface contamination and the presence of *L. Monocytogenes* in fish processing factories. J. Food Prot. 64(5): 635-639.
- NAVARRO, J. 1991. Flora bacteriana de hígado y riñón en salmonideos del sur de Chile. Estandarización de un método de identificación y determinación de

- sensibilidad antimicrobiana. Tesis. Med Veterinaria. Universidad Austral de Chile. Instituto de patología animal, Facultad de Ciencias Veterinarias. 78p.
- NEDOLUHA, P.C y WESTHOFF, D. 1997. Microbiological analysis of striped bass (*Morone saxatilis*) grown in a recirculating system. J. Food Prot. 60 (8): 948-953.
- NEDOLUHA, P.C y WESTHOFF, D. 1993. Microbiological flora of aquaculture hybrid striped bass. J. Food Prot. 56 (12): 1054-1060.
- OROZCO, L.N. 2000. The occurrence of *Listeria monocytogenes* and microbiological quality of cold smoked and Gravad fish on the Icelandic retail. Fisheries training program. The United National University Project. México. 45p.
- OROSTEGUI, M. 1999. Estructura comunitaria y respuesta a antibacterianos de bacterias Gram negativas aisladas desde la columna de agua y del sedimento en un centro de cultivo de salmones. Tesis Biol Marina. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias. 96p.
- POULTER, N.H. y NICOLAIDES, L. 1985. Studies of the iced storage characteristics and composition of a variety of Bolivian freshwater fish. 1. Altiplano fish. J. Food. Technol. 20: 437-449.
- POYSKY, F., PARANJPYE, R., PETERSON, M., PELROY, G., GUTTMAN, A., y EKLUND, M. 1997. Inactivation of *Listeria monocytogenes* on hot-smoked salmon by the interaction of heat and smoke or liquid smoke. J. Food Prot. 60(6): 649-654.
- PULLELA, S., FERNANDEZ, C.F., FLICK, G.J., LIBEY, G.S., SMITH, S.A., y COALE, C.W. 1998. Indicative and pathogenic microbiological quality of aquaculture finfish grown in different production systems. J. Food Prot. 61 (2): 205-210.
- RINGOE, E., STEINBERG, E., y STROEM, A.R. 1984. Amino-acid and lactate catabolism in trimethylamineoxidation of *Alteromonas putrefaciens*. Appl. Environ. Microbiol. 47: 1084-1089.
- RUBILAR, P. 1993. Edad, crecimiento y mortalidad natural de *Dissostichus eliginoides* (SMITT, 1898), en la costa centro sur de Chile (38°19' a 43° Lat. Sur) y su utilización en la evaluación del recurso. Tesis Biol. Marina. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias. 72p.
- SATO, K., OHASHI, C., OHTSUKI, K., y KAWABATA, M. 1991. Type V collagen in trout (*Salmo Gairdneri*) muscle and its solubility change during chilled storage of muscle. J. Agric. Food. Chem. 39: 1222-1225.
- SAVVAIDIS, I.N., SKANDAMIS, P., RIGANAKOS, K.A., PANAGIOTAKIS, N., y KONTOMINAS, M.G. 2002. Control of natural microbial flora and *L. Monocytogenes* in vacuum-packaged trout at 4 and 10°C using irradiation. J. Food Prot. 65 (3): 515-522.
- SCHÖBITZ, R., TAMAYO, R. y DAVIS, M. 1985. Microbiological quality of the fish species *Trachurus murphy*, sold at the retail level in the town of Valdivia, Chile. Food Microbiol. 2: 243-247.
- SIEVERT, L. 1979. Mariscos y peces de importancia comercial en el sur de Chile. Editado por la Dirección de Investigación de la Vice-Rectoría académica y la Vice - Rectoría de Extensión y Comunicación. UACH. 380 pp.
- SILVA, S. 1997. Respuesta de *Aeromonas* móviles y *Pseudomonas* sp. Aisladas desde merluza de cola (*Macruronus Magallanicus*) a cuatro antimicrobianos utilizados en la

- salmonicultura. Tesis Med. Veterinaria. Valdivia. Universidad Austral de Chile. Instituto de Patología Animal, Facultad de ciencias Veterinaria. 94p.
- STOSKOPF, M.K. 1992. Fish medicine. W. B. Saunder company. Philadelphia 882 p.
- TRYFINOPOULOU, P., TSAKALIDOU, E. y NYCHANS, G.E. 2002. Characterization of *Pseudomonas spp.* Associated with spoilage gilt- head sea bream stored under various conditions. Appl. Environ Microbiol 68 (1): 65-72.
- VENEGAS, N., MARAMBIO, E., INSUNZA, M., SOTO, A., ARRIETA, A. 1990. Control microbiológico de alimentos, técnicas actualizadas y métodos acelerados. Editorial Santiago. Universidad de Chile. 135 pp.
- VENUGOPAL, V. 1990. Extracellular proteases of contaminant bacteria in fish spoilage: A review. J. Food Prot. 53 (4): 341-350.
- VILLALOBOS, K. 2000. "*Listeria. monocytogenes* en productos pesqueros elaborados y su relación con indicadores bacterianos". Tesis Esc. Pedagogía. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Filosofía y Humanidades. 39p.
- WAAGBO, R.K., SANDES, A. y LIE, Oe. 1991. Feeding three levels of n-3 polyunsaturated fatty acids at two levels of vitamin E to Atlantic salmon (*Salmo salar*). Growth and chemical composition. J. Agric. Food. Chem. 41: 1379-1384.
- YAMASAKI, K., TATEYAMA, T., KAWAY, Y. y INOUE, N. 2000. Occurrence of *Listeria. Monocytogenes* in retail fish and processed seafood products in Japan. Fish. Sci. 66(6): 1191-1193.
- YOUNG, Z., ARANDA, E., SALAS, R., LA-PLAZA, C., BADILLA, M. y ORTIZ, J. 1984. Congrio colorado (*Genypterus chilensis*). Perfiles indicativos del sector pesquero nacional: Recursos, tecnología, producción y mercado. Editor: Santiago. CORFO. 81p.

ANEXOS

Anexo1. Recuento microbiológico en especie congrio, promedio y desviación estándar.

Tratamiento	Lugar	Mesófilas $R \pm S \log (\text{ufc/cm}^2)$	Pseudomonas $R \pm S \log (\text{ufc/cm}^2)$	Enterobacterias $R \pm S \log (\text{ufc/cm}^2)$
M1	Piel Branquia	$3,8 \pm 0,26$ $4,0 \pm 0,59$	$2,7 \pm 0,23$ $2,9 \pm 0,39$	$1,6 \pm 0,30$ $2,1 \pm 0,91$
M2	Piel Branquia	$5,1 \pm 0,59$ $3,9 \pm 0,82$	$3,6 \pm 0,63$ $2,5 \pm 0,62$	$1,9 \pm 0,65$ $1,5 \pm 0,30$
M3	Piel Branquia	$5,1 \pm 0,90$ $5,7 \pm 0,44$	$3,2 \pm 0,58$ $4,0 \pm 0,28$	$1,9 \pm 0,57$ $2,6 \pm 0,20$
M4	Piel Branquia	$3,6 \pm 0,91$ $4,2 \pm 0,91$	$2,3 \pm 0,48$ $2,5 \pm 1,1$	$1,8 \pm 0,38$ $1,7 \pm 0,28$
M5	Piel Branquia	$3,7 \pm 0,18$ $3,7 \pm 0,14$	$2,7 \pm 0,26$ $2,6 \pm 0,26$	$1,8 \pm 0,42$ $2,0 \pm 0,79$
MT	Piel Branquia	$*4,3 \pm 0,57$ $*4,4 \pm 0,58$	$*2,8 \pm 0,43$ $*2,8 \pm 0,53$	$*1,8 \pm 0,46$ $*2,0 \pm 0,49$

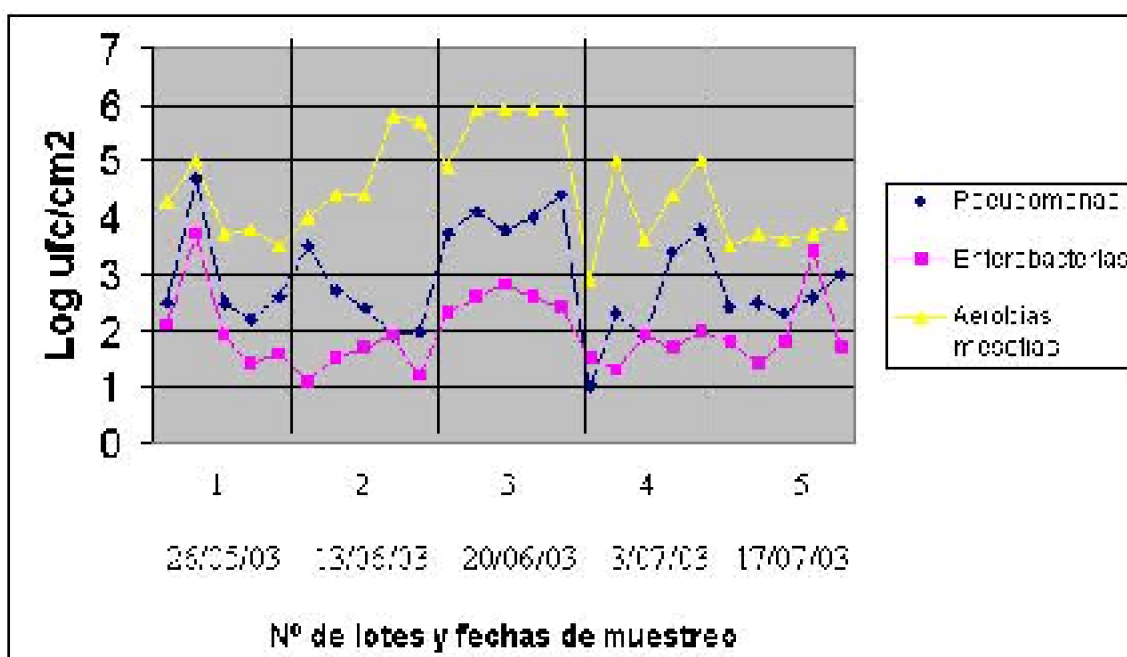
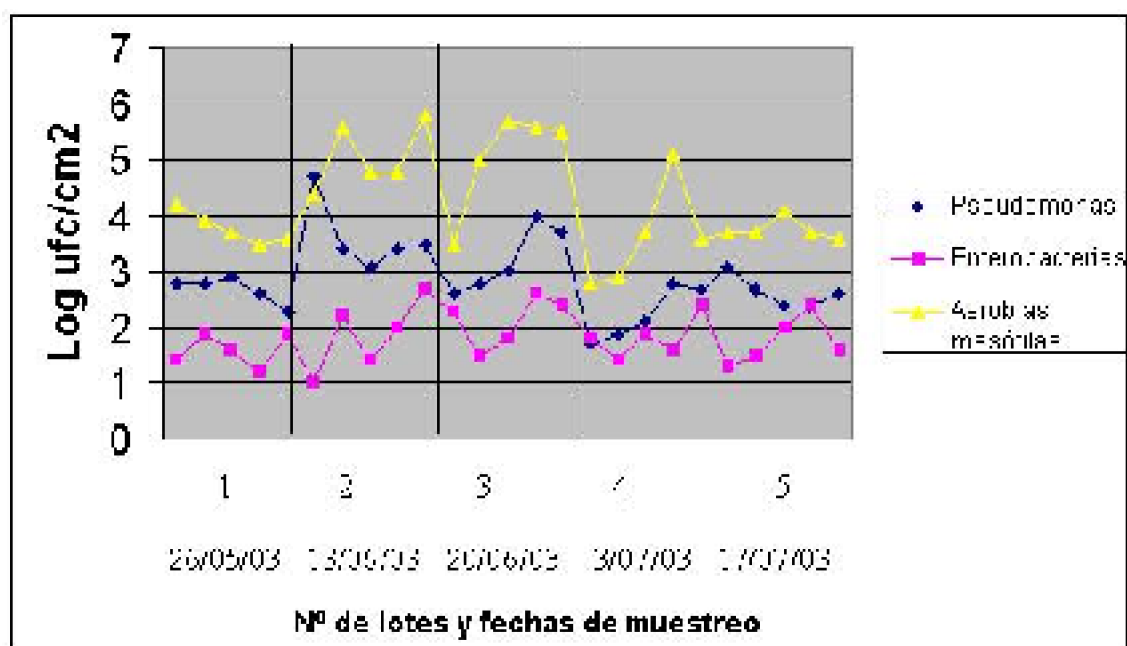
* Promedio corresponde a 5 determinaciones

Anexo2. Recuento microbiológico en especie bacalao, promedio y desviación estándar.

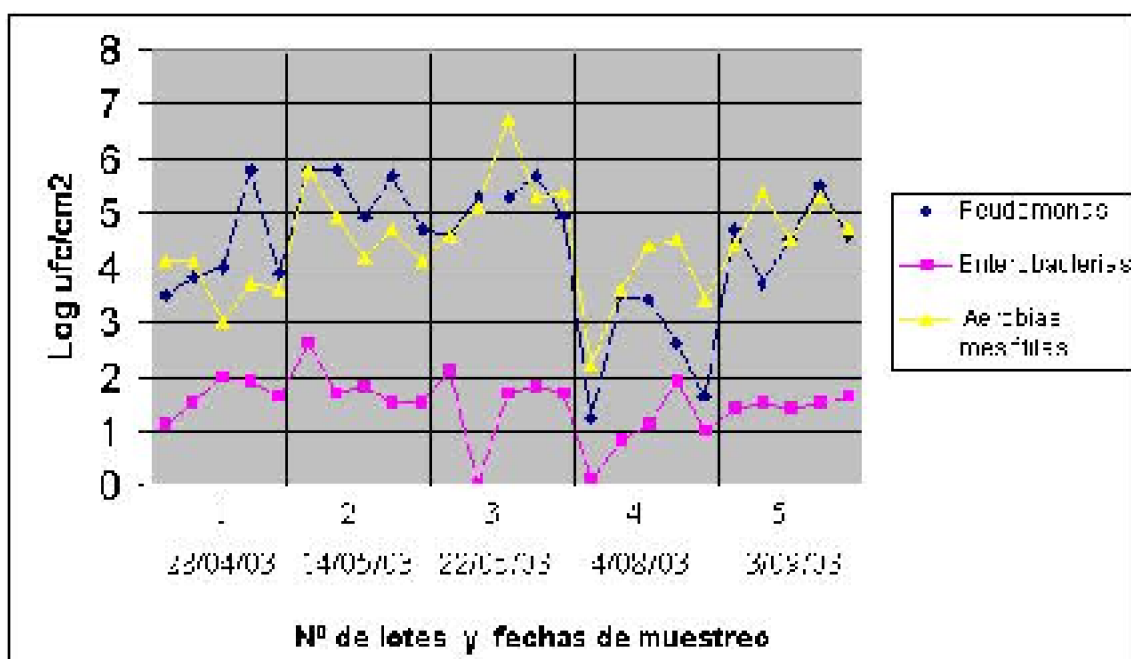
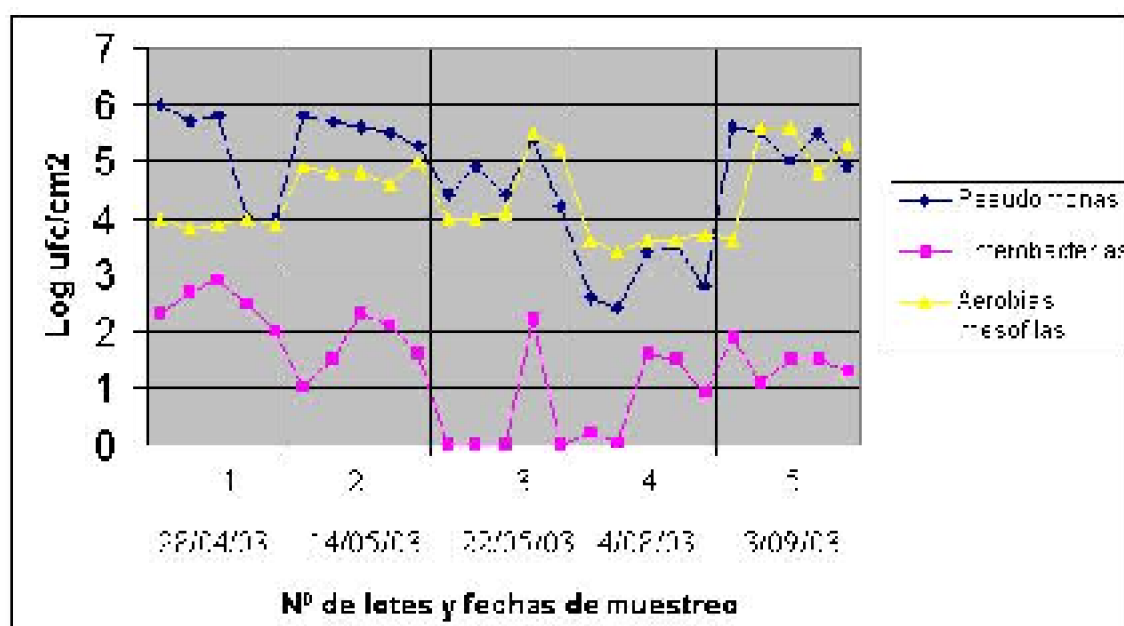
Tratamiento	Lugar	Mesófilas R $\pm$ S log (ufc/cm ²)	Pseudomonas R $\pm$ S log (ufc/cm ²)	Enterobacterias R $\pm$ S log (ufc/cm ²)
M1	Piel Branquia	3,9 $\pm$ 0,07 3,7 $\pm$ 0,45	5,1 $\pm$ 0,99 4,2 $\pm$ 0,92	2,5 $\pm$ 0,36 1,6 $\pm$ 0,33
M2	Piel Branquia	4,8 $\pm$ 0,16 4,7 $\pm$ 0,67	5,6 $\pm$ 0,19 5,4 $\pm$ 0,53	1,7 $\pm$ 0,51 1,8 $\pm$ 0,46
M3	Piel Branquia	4,6 $\pm$ 0,74 5,4 $\pm$ 0,77	4,7 $\pm$ 0,49 5,2 $\pm$ 0,42	0,45 $\pm$ 0,97 1,5 $\pm$ 0,82
M4	Piel Branquia	3,6 $\pm$ 0,11 3,6 $\pm$ 0,93	2,9 $\pm$ 0,50 2,5 $\pm$ 1,03	0,9 $\pm$ 0,73 1,0 $\pm$ 0,65
M5	Piel Branquia	4,9 $\pm$ 0,86 4,9 $\pm$ 0,44	5,3 $\pm$ 0,30 4,6 $\pm$ 0,64	1,5 $\pm$ 0,31 1,5 $\pm$ 0,06
MT	Piel Branquia	*4,4 $\pm$ 0,38 *4,5 $\pm$ 0,65	*4,7 $\pm$ 0,49 *4,4 $\pm$ 0,70	*1,4 $\pm$ 0,58 *1,5 $\pm$ 0,46

* Promedio corresponde a cinco determinaciones.

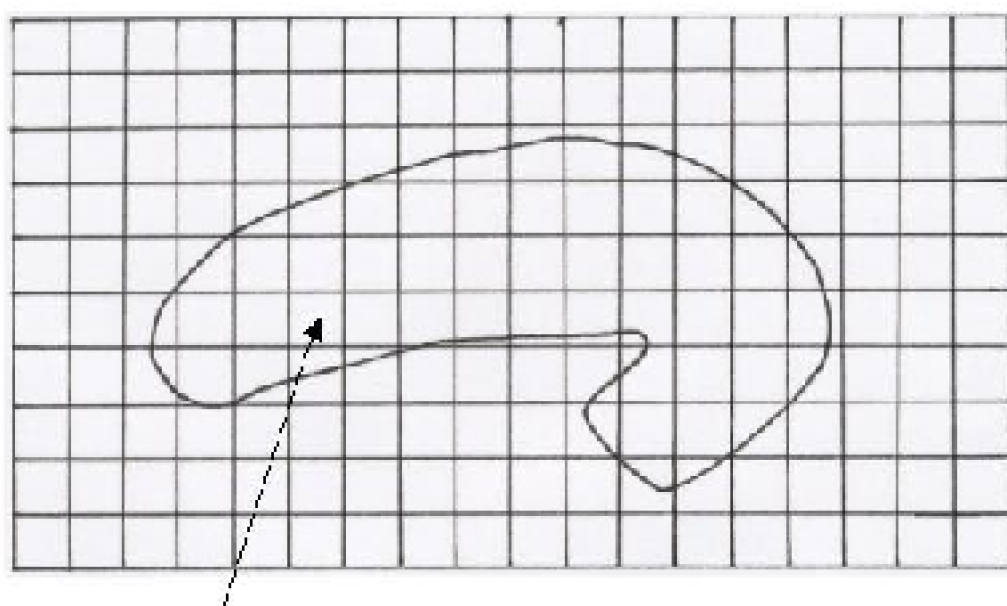
Anexo 3. Variaciones en los recuentos entre lotes en muestras de congrio



Anexo 4. Variaciones en los recuentos entre lotes en muestras de bacalao



Anexo 5. Dibujo de branquia de pescado en papel cuadriculado.



$$7\text{mm} \times 7\text{mm} = 49 \text{ mm}^2$$

Ejemplo: $42 \text{ cuadrados} \times 49 = 2058 \text{ mm}^2 \times 3 \times 2 = 123,48 \text{ cm}^2$ (área de superficie)

Anexo 6. Análisis estadístico para especie congrio

Análisis de varianza para recuento de *Pseudomonas* - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F Ratio	F Value
MAIN EFFECTS					
A lote	9.392	4	2.348	4.83	0.0026
B piel/branquias	0.0162	1	0.0162	0.03	0.8560
RESIDUAL	21.2568	44	0.486291		
TOTAL (CORRECTED)	30.805	49			

All F-ratios are based on the residual mean square error

Prueba de Tukey para recuento de Pseudomonas por lote

Method: 95.0 percent Tukey HSD

lote	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
4	10	2.36	0.22052	X
5	10	2.6	0.22052	X
1	10	2.72	0.22052	X
2	10	3.06	0.22052	XX
3	10	3.6	0.22052	X

Contrasts	Difference	+/- Limits
1 - 2	-0.34	0.88703
1 - 3	*-0.88	0.88703
1 - 4	0.36	0.88703
1 - 5	0.12	0.88703
2 - 3	0.55	0.88703
2 - 4	0.7	0.88703
2 - 5	0.46	0.88703
3 - 4	*1.25	0.88703
3 - 5	*1.01	0.88703
4 - 5	0.24	0.88703

*denotes a statistically significant difference

Análisis de varianza para recuento de Enterobacterias - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F-Ratio	P-Value
--------	----------------	----	-------------	---------	---------

MAIN EFFECTS

Aislable	0.3355	4	0.4592	1.51	0.2161
Especie/branquias	0.405	1	0.405	1.33	0.2549

RESIDUAL	13.392	44	0.304354		
----------	--------	----	----------	--	--

TOTAL (CORRECTED)	15.6333	49			
-------------------	---------	----	--	--	--

All F ratios are based on the residual mean square error

Análisis de varianza para recuento de Aerobias mesófilas - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F-Ratio	P-Value
--------	----------------	----	-------------	---------	---------

MAIN EFFECTS

Aislable	2.1423	4	5.3557	13.75	0.0000
Especie/branquias	0.6728	1	0.6728	1.67	0.2028

RESIDUAL	17.7132	44	0.402573		
----------	---------	----	----------	--	--

TOTAL (CORRECTED)	40.5288	49			
-------------------	---------	----	--	--	--

All F ratios are based on the residual mean square error

Prueba de Tukey para recuento de Aerobias mesófilas por lote

Method: 95.0 percent Tukey HSD

lotc	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
5	10	3.72	0.200642	X
4	10	3.88	0.200642	X
1	10	3.91	0.200642	X
2	10	4.97	0.200642	X
3	10	5.36	0.200642	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	*-1.06	0.807072
1 - 3	*-1.45	0.807072
1 - 4	0.03	0.807072
1 - 5	0.19	0.807072
2 - 3	-0.39	0.807072
2 - 4	*-0.09	0.807072
2 - 5	*-1.25	0.807072
3 - 4	*-1.48	0.807072
3 - 5	*-1.64	0.807072
4 - 5	0.16	0.807072

*denotes a statistically significant difference.

Anexo 7. Análisis estadístico para especie bacalao

Análisis de varianza para recuento de Pseudomonas - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F-Stat.	P-Value
MAIN EFFECTS					
A lote	45.7672	4	11.4418	24.33	0.0000
B pie tranquia	1.5135	1	1.5135	3.22	0.0797
RESIDUAL	20.6912	40	0.470255		
TOTAL (CORRECTED)	67.9722	45			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Prueba de Tukey para recuento Pseudomonas por lote.

Method: 95.0 percent Tukey LSD

lote	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
4	10	2.7	0.216354	X
1	10	4.64	0.216354	X
3	10	4.9	0.216354	X
5	10	4.95	0.216354	X
2	10	5.43	0.216354	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	-0.84	0.872282
1 - 3	-0.25	0.872282
1 - 4	*1.94	0.872282
1 - 5	-0.31	0.872282
2 - 3	0.58	0.872282
2 - 4	*2.78	0.872282
2 - 5	0.53	0.872282
3 - 4	*2.2	0.872282
3 - 5	-0.05	0.872282
4 - 5	*2.25	0.872282

*denotes a statistically significant difference.

Análisis de varianza para recuento de Enterobacterias- Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:lote	9.88113	4	2.47029	6.01	0.0006
B:pielbranca	0.10125	1	0.10125	0.25	0.6222
RESIDUAL	18.095	44	0.411243		
TOTAL (CORRECTED)	28.0774	49			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Prueba de Tukey para recuento de Enterobacterias por lote

Method: 95.0 percent Tukey HSD

lote	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
4	10	0.912	0.202793	X
3	10	0.955	0.202793	XX
5	10	1.46	0.202793	XXX
2	10	1.76	0.202793	XX
1	10	2.05	0.202793	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	0.29	0.815723
1 - 3	*1.095	0.815723
1 - 4	*1.138	0.815723
1 - 5	0.59	0.815723
2 - 3	0.805	0.815723
2 - 4	*0.848	0.815723
2 - 5	0.3	0.815723
3 - 4	0.043	0.815723
3 - 5	-0.505	0.815723
4 - 5	-0.548	0.815723

*denotes a statistically significant difference.

Análisis de varianza para recuento de Aerobias Mesófilas - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
Alote	17.49	4	4.3725	11.73	0.0000
Epiphytaxis	0.1152	1	0.1152	0.31	0.5812
RESIDUAL	16.4148	44	0.373064		
TOTAL (CORRECTED)	34.02	49			

All F-ratios are based on the residual mean square error

Prueba de Tukey para recuento Aerobias mesófilas por lote

Method: 95.0 percent Tukey HSD

lote	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
4	10	3.6	0.193149	X
1	10	3.81	0.193149	X
2	10	4.73	0.193149	X
5	10	4.92	0.193149	X
3	10	4.99	0.193149	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	*-0.97	0.77693
1 - 3	*-1.18	0.77693
1 - 4	0.21	0.77693
1 - 5	*-1.11	0.77693
2 - 3	-0.21	0.77693
2 - 4	*1.18	0.77693
2 - 5	-0.14	0.77693
3 - 4	*1.39	0.77693
3 - 5	0.07	0.77693
4 - 5	*-1.32	0.77693

*denotes a statistically significant difference.