

**UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA EN SUPERFICIE DE LA PIEL Y CAVIDAD
ABDOMINAL DURANTE EL PROCESO DE PUTREFACCIÓN EN ESPECIES DE
PESCADOS DULCEACUÍCOLAS DE VALOR COMERCIAL DEL RÍO URUGUAY**

por

AMORÍN SENCIÓN Matías Gabriel

TESIS DE GRADO presentada como
uno de los requisitos para obtener el
título de Doctor en Ciencias
Veterinarias

Orientación: Higiene, Inspección,
Control Tecnología de los Alimentos
de Origen Animal

MODALIDAD ESTUDIO DE CASO

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2013**

PÁGINA DE APROBACIÓN

TESIS aprobada por:

Presidente de mesa

Cristina López

Segundo Miembro (Tutor)

José Pedro Dragonetti Saucero

Tercer Miembro

Cristina Friss de Kereki

Cuarto Miembro (Co Tutor)

Ana María Maquieira Rebollo

Fecha: _____

Autor:

Matías Gabriel Amorín Sención _____

AGRADECIMIENTOS

A la UdelaR y a la Facultad de Veterinaria por ser parte de esta formación profesional y personal.

Al Latu y a la Unidad Tecnológica Fray Bentos

Al Instituto de Investigaciones Pesqueras “*Prof. Dr. Víctor H. Bertullo*”

Al programa Acortando Distancias (ANEP-PEDECIBA)

A la empresa Acopios y procesados Río Uruguay

Al Dr. José Pedro Dragonetti Saucero

A la Dra. Ana María Maquieira Rebollo

A la Dra. Giorella Pinnacchio Scaldaferrì

A la Prof. Melina Arbolella

A la Q.F. Yemina Nemer (Yemi)

Al Biólogo Juan Clemente (Checho)

Al Sr. Ricardo Akar

A todos mis compañeros de trabajo y en particular al Departamento Microbiología

Y una dedicación especial a mi familia

A mis padres, a mi señora, a mi hija y a su futuro hermanito/a

Gracias a todos los amigos por su apoyo

<u>TABLA DE CONTENIDO</u>	PÁGINA
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE FIGURAS, CUADROS Y TABLAS.....	7
RESUMEN.....	9
SUMMARY.....	10
INTRODUCCIÓN.....	11
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	13
Contexto Mundial y Nacional sobre la comercialización y consumo de los productos pesqueros.....	13
Contexto a nivel Mundial.....	13
Contexto a nivel Nacional de la comercialización de productos Pesqueros.....	16
Contexto Nacional de la pesca Continental.....	17
Contexto Nacional del consumo de pescado.....	17
 ESPECIES DE PESCADO DE AGUA DULCE DEL RÍO URUGUAY.....	 18
Caracterización de las especies de mayor importancia comercial del río Uruguay.....	19
Boga.....	19
Sábalo.....	20
Definición de peces y pescado.....	21
 CAMBIOS <i>POST MORTEM</i> Y DETERIORO DEL PESCADO.....	 21
Producción de energía en músculo de pescado post mortem.....	22
Cambios de pH en pescado post mortem.....	23
Cambios y evaluación sensorial post mortem en pescado.....	24
Fases de deterioro observadas durante la evaluación sensorial.....	24
Otros parámetros para determinar la frescura del pescado.....	26
Deterioro por cambios autolíticos y por acción de las enzimas bacterianas.....	26
Cambios bioquímicos y fracciones extraíbles que contienen nitrógeno durante el deterioro.....	28
Cambios microbiológicos en pescado.....	29
Microflora bacteriana y Microorganismos Específicos del Deterioro (MED).....	29
Cambios bioquímicos inducidos por el crecimiento microbiológico durante el almacenamiento y el proceso de deterioro en pescado.....	34
Reducción del Óxido de Trimetilamina (OTMA).....	34
Efecto de la temperatura de almacenamiento en el deterioro del pescado.....	36
Efecto de la especie de pescado.....	37
Microorganismos patógenos e inocuidad del producto.....	37
 ESTUDIO DEL ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD.....	 42
Control microbiológico tradicional.....	42
Muestreo y ensayos microbiológicos del pescado fresco.....	42

Condiciones de inocuidad, límites microbiológicos y químicos establecidos en las diferentes referencias	43
Criterios microbiológicos para pescado fresco y listo para consumo	43
Indicadores de contaminación fecal en pescado	45
Estudio de las zonas de captura en el río Uruguay	46
OBJETIVOS	47
General	47
Específicos	47
MATERIALES Y MÉTODOS	48
DESARROLLO DEL TRABAJO EN CAMPO Y EN LABORATORIO	48
TRABAJO EN CAMPO	49
Estudio de las zonas de captura	49
Descripción de las zonas de captura y puntos de muestreo del Río Uruguay	49
Puntos de muestreo del Río Uruguay	50
Muestreo de agua para análisis microbiológicos de las zonas de captura	51
Mediciones de parámetros físicos y químicos del agua de río en las zonas de captura	51
Desembarque	52
Transporte	52
Recepción y selección en planta para almacenamiento en cámara	52
Trabajo práctico en planta acopiadora	53
Evaluación sensorial	53
Muestreo de ejemplares	53
pH muscular	54
Temperatura muscular	54
TRABAJO EN LABORATORIO	54
Análisis químico	54
Análisis microbiológicos realizados al pescado y al agua del Río Uruguay	54
Análisis químico	55
Valoración de las bases nitrogenadas volátiles totales por el método de Conway modificado	55
Ensayos microbiológicos utilizados para la evaluación de la calidad higiénica sanitaria del pescado	56
Coliformes fecales y <i>E.coli</i> por la técnica de NMP	56
Recuento de aerobios mesófilos totales a $35,5^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$	57
Búsqueda de microorganismos patógenos en pescado por el método de PCR	57
Ensayos utilizados para la determinación de microorganismos específicos del deterioro	58
Recuento de aerobios mesófilos totales a $35,5^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$	58
Aislamiento e identificación de aerobios mesófilos (anexo 5)	58
Ensayos utilizados para determinar la calidad microbiológica de las aguas en las zonas de captura	63

Coliformes termotolerantes a 44,5°C (fecales) y E.coli por el método de membrana filtrante en agua.....	63
Recuento de heterótrofos en agua.....	64
MATERIALES.....	65
Materiales de laboratorio.....	65
Reactivos.....	66
Equipos.....	66
Medios de cultivo.....	67
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	68
Resultados del trabajo en campo.....	68
Resultados del trabajo en Laboratorio.....	71
CONCLUSIONES.....	85
BIBLIOGRAFÍA.....	88
ANEXOS.....	94
ABREVIATURAS.....	101

LISTA DE FIGURAS, CUADROS Y TABLAS

FIGURAS	Página
Figura 1: Utilización y suministro mundial de pescado.....	13
Figura 2: Producción mundial de pesca de captura y acuicultura.....	15
Figura 3: <i>Leporinus obtusidens</i>	19
Figura 4: <i>Prochilodus lineatus</i>	20
Figura 5, Descomposición aeróbica y anaeróbica del glucógeno en el músculo del pescado.....	23
Figura 6: Degradación post mortem del ATP en el músculo de pescado. Enzimas que actúan: 1. ATP-asa; 2. miokinasa; 3. AMP-desaminasa; 4. IMP-fosfohidrolasa; 5a. nucleosida fosforilasa; 5b. inosina nucleosidasa; 6,7. xantina oxidasa	27
Figura 7: Recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales y recuento de Organismos Específicos del Deterioro (OED) en función del tiempo de almacenamiento en frío.....	32
Figura 8. Curvas características operativas para diferentes tamaños de muestra (n) y diferentes criterios de aceptación (c), para un plan de atributos de 2 clases.....	42
Figura 9: Zonas asignadas para pescadores artesanales.....	50
Figura 10: Punto de muestreo y zona de captura correspondiente a Las Cañas; y ubicación de la planta de acopio.....	50
Figura 11: Punto de muestreo y zona de captura cercana a Nuevo Berlín; y planta de acopio.....	51
Figura 12: Pescado eviscerado dividido en zonas.....	53
Figura 13: Reacción de citocromo oxidasa.....	60
Figura 14: Reacción positiva, test de fermentación de carbohidratos.....	60
Figura 15. Galería API 20E para la lectura de reacciones bioquímicas positivas y negativas (foto ilustrativa).....	63
Figura16: Registro promedio de valores de pH muscular.....	69
de todos los ejemplares en función del tiempo de almacenamiento en cámara de frío.....	70
Figura17: Registro de los valores promedio de temperatura muscular de todos los ejemplares en función del tiempo de almacenamiento en cámara de frío.....	70
Figura18: Valores promedios de las BNVT en músculo de todos los ejemplares, en función del tiempo de almacenamiento en cámara de frío.....	72
Figura19: Promedios de los valores de las BNVT por especie para los días de almacenamiento refrigerado 1, 3, 6 y 12.....	72
Figura 20: Resultados de E.coli para cinco muestras, en función de los límites establecidos por la UE.....	74
Figura 21: Resultados de E.coli para cinco muestras, en función de los límites establecidos por la CFIA.....	75
Figura 22: Promedio del recuento de aerobios mesófilos totales y psicrotrofos en función del tiempo de almacenamiento en cámara de frío.....	76
Figura 23: Recuento de aerobios mesófilos totales y límites establecidos por la ICMSF en productos pesqueros, para n=5.....	77
Figura 24: Recuento de aerobios mesófilos totales y límites establecidos por la UE en productos pesqueros, para n=5.....	78
Figura 25: Porcentaje de microorganismos gramnegativos	

(*Plesiomonas* s.; *Aeromonas* h.) y grampositivos aislados en piel de pescados dulceacuícolas en el proceso de deterioro en función del tiempo de almacenamiento. 80

Figura 26: Cambios en el recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales y en los microorganismos específicos del deterioro durante los doce días de almacenamiento en frío. 82

CUADROS

Cuadro 1: Producción y utilización de la pesca de captura y acuicultura en el mundo. 15

Cuadro 2: Exportaciones de Uruguay por especie de agua dulce 2008. 16

Cuadro 3: Volumen y destino de las exportaciones de Sábalo desde Uruguay (año 2009). 16

Cuadro 4: Tipo y cantidad neta de pescado adquiridos en el país urbano. 18

Cuadro 5: Resumen de los cambios autolíticos en pescado refrigerado. 27

Cuadro 6: Microflora bacteriana de pescado capturado en aguas limpias no contaminadas. 30

Cuadro 7: Microflora dominante y microorganismos específicos del deterioro de pescado blanco fresco (bacalao). 33

Cuadro 8: Compuestos típicos del deterioro, producidos durante el deterioro del pescado fresco almacenado aeróbicamente, empacado en hielo y a temperatura ambiente. 35

Cuadro 9: Sustratos y compuestos, de olores y sabores desagradables, producidos por las bacterias durante el deterioro del pescado. 36

Cuadro 10. Factores intrínsecos que afectan la velocidad de deterioro de especies de pescado almacenadas en hielo. 37

Cuadro 11: Planes de muestreo y límites microbiológicos para pescado fresco y congelado de la ICMSF. 43

Cuadro 12: Ejemplo de criterios y planes de muestreo para microorganismos, establecidos en la norma de la UE91/493/CEE para carne de pescado cocidos listos para el consumo. 44

Cuadro 13: Criterios microbiológicos establecidos en CFIA 2011, para *E.coli*, *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*. 45

Cuadro 14: Ejemplo de Batería de pruebas incluidas en API 20E y tablas de lectura con coloraciones positivas y negativas. 62

Cuadro 15: Pescados a ensayar. 65

Cuadro 16: Cantidad de muestra a utilizar según el ensayo. 65

TABLAS

Tabla1: Registro de los valores de BNVT en músculo de todos los ejemplares, los días 1, 3, 6 y 12 de almacenamiento en cámara de frío. 71

Tabla 2. Resultados de Coliformes fecales y *E. coli*, por gramo de pescado de dos zonas de captura, Nuevo Berlín (NB) y Las Cañas (LC). 73

Tabla 3: Recuento de aerobios mesófilos totales de todos los ejemplares en función del tiempo de almacenamiento en frío. 77

Tabla 4: Identificación en porcentajes de las especies utilizando el sistema miniaturizado API20E de microorganismos aislados a partir de PCA. 79

Tabla 5: Recuento de MED y de aerobios mesófilos totales en superficie de la piel en función del tiempo de almacenamiento. 81

Tabla 6: Resultados físico, químicos y microbiológicos para cinco puntos de muestreo del río Uruguay 253/79. 83

Tabla 7: Valores de referencia del decreto Nacional 253/79. 83

RESUMEN

En el presente trabajo se estudiaron las dos especies de pescado dulceacuícolas de mayor importancia comercial del Río Uruguay, con el objetivo de valorar microbiológicamente la flora deteriorante en superficie de piel y cavidad abdominal durante el proceso de putrefacción y determinar la presencia de microorganismos patógenos

Se utilizaron catorce ejemplares (n=14) de dos especies, Boga (*Leporinus obtusidens*) y Sábalo (*Prochilodus lineatus*) capturados en diferentes zonas del Río Uruguay. Estos ejemplares fueron eviscerados y lavados en agua de río y acondicionados en cajas plásticas cubiertas por hielo para su transporte y almacenamiento en cámara refrigerada por doce días. Para los análisis de laboratorio se obtuvieron muestras de todos los ejemplares los días post captura 1, 3, 6 y 12. Los ensayos realizados fueron recuento, aislamiento e identificación de microorganismos aerobios mesófilos totales y recuento de Psicrotrofos en medio PCA (Plate Count Agar); coliformes fecales y *E.coli* por el método de número más probable (NMP) como indicadores de contaminación fecal; presencia de microorganismos patógenos como *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* por el método PCR Bax y bases nitrogenadas volátiles totales (BNVT) como medida objetiva de frescura. El pH y temperatura muscular fueron registradas durante el proceso de deterioro. También se realizaron análisis de pH, temperatura, oxígeno disuelto, turbidez, coliformes fecales por el método de membrana filtrante en medio mFC y recuento de heterotróficos (mesófilos) en medio PCA en muestras de agua de río de los puntos de captura. Mediante la evaluación de los indicadores físico químico y microbiológicos se evidenció la influencia del agua del río sobre la calidad microbiológica del pescado. Los niveles de aerobios mesófilos totales y de *E.coli* superaron los límites permitidos para pescados frescos sin procesar. Los microorganismos deteriorantes que predominaron en piel fueron bacilos gramnegativos. Los aerobios mesófilos gramnegativos identificados en mayor proporción correspondieron a las especies *Aeromonas hydrophila* y *Plesiomona shigelloides*. Los bacilos gramnegativos dominaron la microflora, y los aerobios mesófilos predominaron frente a los psicrotrofos durante la etapa de putrefacción al día doce de almacenamiento en frío. Las muestras ensayadas por PCR fueron negativas a *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*. Podemos concluir que el ambiente de captura influye en la carga posterior de microorganismos en la superficie de la piel; y que el pescado fresco procesado bajo estas condiciones sanitarias y sin sufrir ningún proceso posterior en planta, representa un peligro para el consumidor y la salud pública.

SUMMARY

In the present paper two freshwater fish species (the more economically important species of the Uruguay River) were studied with the aim of assess the deteriorating microbiota in skin and abdominal cavity surfaces during the putrefaction process and determine the presence of pathogenic microorganisms.

For the study, fourteen specimens of two species were used, Boga (*Leporinus obtusidens*) and Sábalo (*Prochilodus lineatus*) captured in different Uruguay River areas. These specimens were hand processed, gutted, river water washed and packed in plastic trays with ice for their transportation and storage during twelve days in cold room. For laboratory tests samples were taken on days 1, 3, 6 and 12 after capture. The assays performed were count, isolation and identification of total aerobic mesophilic microorganisms and Psychrotrophics count in PCA (Plate Count Agar) mid; fecal Coliform and *E. coli* by the most probable number method (MPN) as fecal contamination indicators; pathogenic microorganisms as *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* presence by PCR Bax method and Total Volatile Nitrogenous Bases (TVNB) as an objective measure of freshness. Muscle pH and temperature were recorded during the deterioration process. Analysis of pH, temperature, dissolved oxygen, turbidity; Fecal Coliforms by the filtering membrane method in mFC mid and heterotrophic (mesophilic) count in PCA mid were also done in river water samples from the capture points. The influence of the river water on the fish microbiological quality was revealed by evaluating physicochemical and microbiological indicators. Total aerobic mesophilic gramnegative aerobic mesophilic and *E. coli* levels exceeded the allowed limits for raw fresh fish. The main deteriorating microorganisms in skin were gram negative bacillus. The microorganisms identified in greater proportion corresponded to the species *Aeromona hydrophila* and *Plesiomona shigelloides*. Gram negative bacillus dominated the microflora, and mesophilic aerobic prevailed against the Psychrotrophic during the putrefaction stage the twelfth day of cold storage. The samples tested by PCR were negative for *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*.

We can conclude that the subsequent microorganisms amount on the skin surface is influenced by the capture environment; and that processed fresh fishes under these sanitary conditions and without suffering any subsequent process in plant, constitutes danger for the consumer and public health.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo a los últimos datos disponibles a nivel mundial, durante el 2011 la utilización y producción total de pesca de captura y acuicultura de agua continental fue de 55,8 millones de toneladas. El consumo humano de pescado correspondió a 130,8 millones de toneladas; en particular el consumo *per capita* de especies dulceacuícolas se situó en los 5,41 Kg (FAO, 2012).

En nuestro país, de acuerdo a datos del 2010, el consumo promedio de pescado fue de 6,74 kg *per capita* (Uruguay, 2010). Según datos publicados por FAO (2012), del total consumido, sólo 0,07 kg correspondieron a especies dulceacuícolas. Si bien dicho consumo es muy bajo, las capturas en aguas continentales no son nada despreciables, siendo su principal destino la exportación (Pinnacchio G., 2011).

La globalización del comercio de alimentos requiere la elaboración de un enfoque más integral y preventivo de los sistemas de inocuidad de los alimentos. No obstante, las posibles consecuencias de esta tendencia influyen en la posibilidad de que las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) se propaguen más fácilmente, e incluso de forma más rápida, entre los países ocasionando riesgos para la salud a los consumidores y riesgos financieros a los productores y elaboradores de alimentos que no cumplan las rigurosas y cada vez más globalizadas normas de inocuidad (Carro S., 2006).

La finalidad del análisis microbiológico de los productos pesqueros y en general de los alimentos es determinar la presencia de microorganismos patógenos de importancia para la salud pública, y proporcionar una impresión sobre la calidad higiénica sanitaria del mismo. En general, los resultados microbiológicos por sí solos no proporcionan ninguna información sobre la calidad comestible y la frescura del pescado, pero sí permiten descartarlo para su consumo (Huss, H.1997).

La pérdida inicial de frescura de las especies de pescado en su estado natural, con o sin refrigeración es debida a cambios autolíticos, mientras que el deterioro se debe principalmente a la acción de microorganismos. Muchas especies diferentes de microorganismos pueden ser encontradas en la superficie de los pescados (Huss, H.1997).

La flora microbiológica inicial del pescado es muy variada, aunque está dominada normalmente por las bacterias psicrótróficas gramnegativas. Durante el almacenamiento se desarrolla una microflora característica, pero sólo una parte contribuye al deterioro. Los microorganismos específicos del deterioro (MED) son los productores de los metabolitos que dan lugar a olores y sabores extraños relacionados con el deterioro (Huss, H. 1997).

Los microorganismos del intestino de estos animales son bastante distintos, siendo de naturaleza psicrótrófica y en cierta medida se cree que es un reflejo de la microflora nativa o de la contaminación general del medio acuático (Agüeria, D., 2008).

El actual conocimiento de los procesos de deterioro en pescados de origen fluvial es realmente pobre comparado con el que existe para los pescados marinos. Aunque existen muchas similitudes entre los patrones de deterioro en estas dos categorías de pescado (FAO, 1992).

En nuestro país, desde el año 2010 la Dirección Nacional de Recursos Acuáticos (DINARA), a través del Departamento de Industria Pesquera, por medio de la Unidad de control y certificación Internacional emitió la circular 4/2010 donde se establece que a efectos del estudio de vida útil de los productos de la pesca que realicen las empresas fabricantes para presentar ante la Inspección Veterinaria Oficial, se deben considerar las siguientes pautas:

- estudios microbiológicos y bibliografía sobre crecimiento y supervivencia de los microorganismos, según transformación riesgo de contaminación y vida útil prevista del producto.

Los datos que se encuentran registrados en Uruguay son escasos y corresponden a estudios desarrollados para especies marinas (Uruguay, 1982). En 2011 Pinnacchio G. realizó estudios dirigidos a la evaluación de la frescura de especies dulceacuícolas de importancia comercial en nuestro país, a través de análisis sensorial.

Considerando la importancia de la pesca para nuestro país y la escasa información disponible sobre la evaluación microbiológica de las especies más relevantes del río, se define realizar el presente estudio.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El origen de la pesca sucedió en aguas continentales como ríos, lagunas y estanques y con la creación de las grandes embarcaciones, el hombre se aventuró en la conquista del mar. Así la pesca marina comenzó su desarrollo superando ampliamente en la actualidad a la pesca continental (FAO, 2010; Pinnacchio G., 2011).

CONTEXTO MUNDIAL Y NACIONAL SOBRE LA COMERCIALIZACIÓN Y CONSUMO DE LOS PRODUCTOS PESQUEROS

Contexto a nivel Mundial

Con el crecimiento mantenido de la producción de pescado y la mejora de los canales de distribución, el suministro mundial de alimentos pesqueros ha aumentado considerablemente en las cinco últimas décadas, con una tasa media de crecimiento del 3,2% anual en el periodo de 1961 a 2009, superando el índice de crecimiento de la población mundial del 1,7% anual. Como se describe en el cuadro 1, el suministro mundial alimentario per cápita aumentó de 9,9 kg promedio (equivalente en peso vivo) en la década de 1960, hasta 18,8 kg promedio en el 2011 (Figura 1) (FAO, 2012).

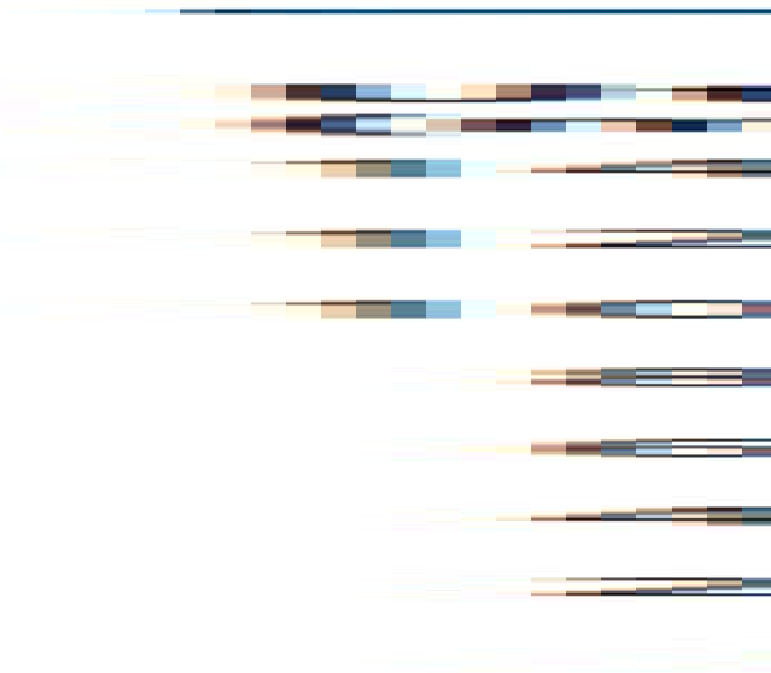


Figura 1: Utilización y suministro mundial de pescado (FAO, 2012)

En el 2010 la pesca de captura junto con la acuicultura (continental y marino) suministraron a nivel mundial unos 148 millones de toneladas de pescado (Figura 2), representando un valor total de 217 500 millones de dólares. De esta captura, aproximadamente unos 128 millones de toneladas se destinaron al consumo

humano. Según las estimaciones publicadas por el departamento de pesca y acuicultura de la FAO (SOFIA 2012) los datos preliminares para el 2011 denotaban un incremento en la producción hasta alcanzar los 154 millones de toneladas, de los cuales 131 millones de toneladas se destinaron a alimentos (Cuadro 1) (FAO, 2012). La producción continental (captura y acuicultura) representaron aproximadamente un 36% y la producción marítima un 64%. De los 154 millones se destinaron al consumo un 84%, que correspondieron a 130,8 millones de toneladas representando 18,8 kg *per cápita* (Figura 1) (FAO, 2012).

En lo que respecta a la distribución del consumo de pescado, de los 126 millones de toneladas disponible para consumo humano en 2009, el menor consumo se registró en África (9,1 millones de toneladas, con 9,1 kg per cápita), mientras que las dos terceras partes del consumo total correspondieron a Asia, con 85,4 millones de toneladas (20,7 kg per cápita), de las que 42,8 millones de toneladas se consumieron fuera de China (15,4 kg per cápita). Las cifras del consumo per cápita correspondientes a Oceanía, América del Norte, Europa, América Central y el Caribe fueron 24,6 kg, 24,1 kg, 22,0 kg y 9,9 kg, respectivamente. Aunque el consumo anual per cápita de productos pesqueros ha aumentado de forma continuada en las regiones en desarrollo (de 5,2 kg en 1961 a 17,0 kg en 2009) y en los países de bajos ingresos y con déficit de alimentos (PBIDA, de 4,9 kg en 1961 a 10,1 kg en 2009), este sigue siendo considerablemente inferior al de las regiones más desarrolladas (FAO, 2012).

China ha sido responsable de la mayor parte del incremento registrado en el consumo mundial de pescado per cápita, debido al considerable aumento de su producción pesquera, en particular de la acuicultura. La proporción de China en la producción mundial de pescado se incrementó del 7 por ciento en 1961 al 35 por ciento en 2010. Impulsado por el crecimiento de los ingresos internos y una mayor diversidad de pescado disponible, el consumo de pescado per cápita en China también registró un aumento espectacular, llegando a alcanzar en torno a los 31,9 kg en 2009. Si se excluye a China, el suministro anual de pescado al resto del mundo en 2009 fue de unos 15,4 kg por persona, una cifra superior a los valores medios de las décadas de 1960 (11,5 kg), 1970 (13,5 kg), 1980 (14,1 kg) y 1990 (13,5 kg) (FAO, 2012)

Cuadro 1: Producción y utilización de la pesca de captura y acuicultura en el mundo.

	2006	2007	2008	2009	2010	2011
PRODUCCIÓN						
<i>Pesca de Captura</i>		(millones de toneladas)				
<i>Continental</i>	9,8	10	10,2	10,4	11,2	11,5
<i>Marítima</i>	80,8	80,4	79,5	79,2	77,4	78,9
<i>Pesca de Captura total</i>	90	90,3	89,7	89,6	88,6	90,4
<i>Acuicultura</i>						
<i>Continental</i>	31,3	33,4	36	38,1	41,7	44,3
<i>Marítima</i>	16	16,6	16,9	17,6	18,1	19,3
<i>Acuicultura total</i>	47,3	49,9	52,9	55,7	59,9	63,6
<i>Producción pesquera mundial total</i>	137,3	140,2	142,6	145,3	148,5	154
UTILIZACIÓN						
<i>Consumo Humano</i>	114,3	117,3	119,7	123,6	128,3	130,8
<i>Usos no Alimentarios</i>	23	23	22,9	21,8	20,2	23,2
<i>Población (miles de millones)</i>	6,6	6,7	6,7	6,8	6,9	7
<i>Suministro de peces comestibles per cápita (kg)</i>	17,4	17,6	17,8	18,1	18,6	18,8

FAO, 2012

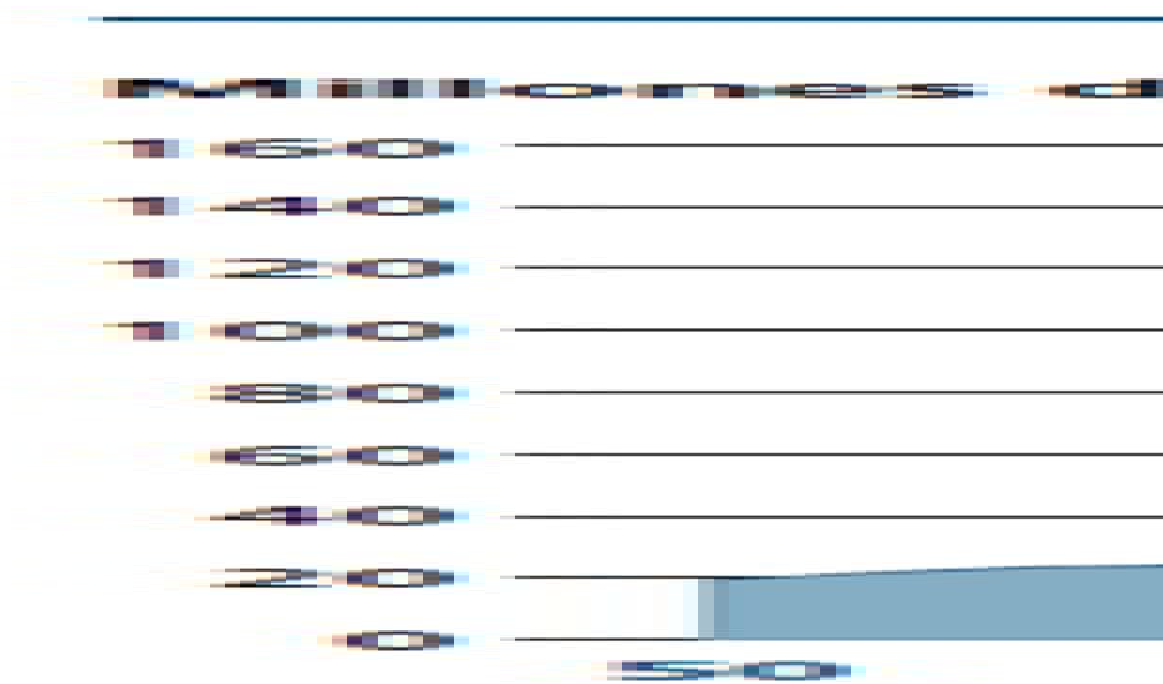


Figura 2: Producción mundial de pesca de captura y acuicultura (FAO, 2012)

Contexto a nivel Nacional de la comercialización de productos pesqueros

En nuestro país los desembarques totales en toneladas crecieron ininterrumpidamente desde 1975 hasta 1981, donde se alcanzó el máximo valor histórico con casi 147.000 toneladas. A partir de dicho año los desembarques totales han tenido oscilaciones, pero solamente en 1990 cayeron por debajo de las 100.000 toneladas. De acuerdo a estos datos se estima que en nuestro país los rendimientos de captura sostenible están en el entorno de las 150.000 toneladas métricas por año (Uruguay, 2012).

Uruguay exporta sus productos pesqueros a numerosos países, entre los que se destacan Brasil, Italia, Nigeria y España (Uruguay, 2009), contribuyendo significativamente al producto bruto interno del país (PBI), con más de 160 millones de dólares por año en ingresos de exportación (Defeo y col., 2011).

Los últimos datos oficiales registrados por la DINARA para el 2008, establecieron que las exportaciones de Sábalo en Uruguay fueron de 4.241 toneladas, representando el 2% del total de las exportaciones pesqueras del Uruguay.

En el cuadro 2 se registran los volúmenes de exportación de Sábalo, Boga, Bagre, Tararira y Dorado (Uruguay, 2009).

Cuadro 2: Exportaciones de Uruguay por especie de agua dulce en 2008.

Especie	Volumen en toneladas	% de exportación
Sábalo	4241	2
Boga	204	0,096
Bagre	136	0,064
Tararira	57	0,026
Dorado	37	0,017

(Adaptado: Uruguay, 2009).

De acuerdo a los valores publicados por CARU en su informe anual de 2009, la principal especie de agua dulce exportada, al igual que años anteriores fue el Sábalo. En el siguiente cuadro se presenta el volumen exportado de la mencionada especie durante el año 2009 que totalizó las 4.557 toneladas, contra las 4.241 toneladas del 2008 (CARU, 2010; Uruguay, 2009). Los países de destino de dicha exportación los constituyeron Brasil, Colombia, Nigeria y Camerún. El volumen señalado provino de capturas realizadas en el Río de la Plata interior y el río Uruguay (CARU, 2010).

Cuadro 3: Volumen y destino de las exportaciones de Sábalo desde Uruguay (año 2009)

País de destino	Volumen en toneladas
Brasil	1.920
Camerún	55
Colombia	1.770
Nigeria	812
Total	4.557

(CARU, 2010).

Contexto Nacional de la pesca continental

Las principales especies dulceacuícolas explotadas en nuestro país son Sábalo (*Prochilodus lineatus*) y Boga (*Leporinus obtusidens*), las cuales comprenden la mitad del total de capturas de la costa del Uruguay (Pinnacchio G., 2011, Defeo y col., 2011).

A nivel regional la especie más relevante desembarcada en los márgenes del río Uruguay en otoño del 2009, al igual que en años anteriores, fue el Sábalo (39%), seguida por el Bagre blanco (21%), la Boga (19%) y el Bagre amarillo (11%) (CARU, 2010).

En los centros de acopio las especies más representadas fueron el Sábalo en primer término (78%), valor superior al encontrado en otoño de 2008 de 62%; y la Boga en segundo término (13%), que presentó casi la mitad del valor porcentual del año anterior (CARU, 2010).

Contexto Nacional del consumo de pescado

Los últimos datos estadísticos publicados por el Instituto Nacional de Estadística (INE 2005-2006) registraron un consumo promedio nacional de 6,74 Kg *per capita*; 9,64 Kg *per capita* para el departamento de Montevideo y 4,77 Kg *per capita* para el resto del país (Uruguay, 2010).

Del total consumido en nuestro país solo 0,10 Kg correspondieron a especies dulceacuícolas, a diferencia del consumo mundial que es de 5,41 Kg *per capita* (FAOSTAT, 2012). Estos datos muestran la clara preferencia alimenticia de la población a nivel nacional (2009) a favor de otras carnes, como por ejemplo la bovina con 17,5 Kg *per capita* y la aviar con 18,9 Kg *per capita* (FAOSTAT, 2012).

En nuestro país, según los datos aportados por el Instituto Nacional de Estadística, los hogares con mayores ingresos alcanzan a cubrir una porción pequeña de consumo de pescados por semana. Como se describe en el cuadro 4, el pescado se adquiere principalmente en forma de bifes (merluza, corvina, cazón, brótola, pejerrey y pescadilla) y en segundo lugar productos enlatados. El tercer lugar lo ocupan los pescados frescos enteros, en una cantidad menor a la mitad que la correspondiente a los enlatados. Los mariscos son de bajísimo consumo (Bove M., 2008).

Cuadro 4: Tipo y cantidad neta de pescado adquiridos en el país urbano.

Tipo de pescado	Cantidad (gramos netos por persona)	
	DIARIO	SEMANTAL
Pescados frescos (no fileteado)	0,6	3,9
Bifes: merluza, corvina, cazón, brótola, pejerrey, pescadilla	5,0	34,7
Bifes de pez espada, atún y salmón	0,3	1,8
Pescado congelado	0,2	1,8
Mejillones frescos con cáscara	0	0,1
Pulpa de mariscos	0,2	1,7
Pescados secos, ahumados o salados	0	0,1
Pescados enlatados	1,3	9,2
Mariscos en conserva	0	0,1
Comidas preparadas a base de pescado	0	0,1
Total	7,7	54,1

(Bove M., 2008)

ESPECIES DE PESCADO DE AGUA DULCE DEL RÍO URUGUAY

El río Uruguay tiene un recorrido de aproximadamente 2.200 km y, juntamente con el río Paraná, da origen al Río de la Plata. Su cuenca imbrífera ha sido calculada en 350.300 km² (Tossini, 1959), de los cuales 75.300 km² pertenecen a Brasil, 65.000 km² a Argentina y 210.000 km² a Uruguay, donde abarca más de la mitad del territorio del país, incluyendo la falda occidental de las Cuchillas Grandes (CARU, 2006)

Desde el punto de vista ictiogeográfico, el río Uruguay, donde habitan más de 150 especies de peces, se considera incluido en la Región Guayano-Brasílica, y, dentro de ella, en la provincia Párano-Platense, cuyo límite sur es el Río de la Plata (CARU, 2006).

Existe una gran afinidad entre la ictiofauna del río Uruguay y la del sistema del Paraná, cuyas especies predominantes pertenecen a los órdenes Characiformes y Siluriformes que por otra parte, son los que han experimentados la más importante radicación adaptativa en los sistemas fluviales de Sudamérica, y ocupan actualmente los más diversos ambientes y nichos ecológicos (CARU, 2006).

Entre los Characiformes se encuentran especies carnívoras, fitófagas, iliófagas y omnívoras, con tamaños que van desde el de las pequeñas mojarra, de pocos centímetros, hasta el de los grandes dorados, de más de un metro de longitud y pesos que superan los 30 kg. Este grupo comprende además, entre otros, a los Dientudos, las Pirañas, la Tararira, Boga y Sábalo (CARU, 2006).

En el tramo inferior del río Uruguay, la especie con mayor biomasa es el Sábalo, cuya captura sustenta importantes pesquerías comerciales, ya sea para la elaboración de harina y aceite, como para el consumo directo. Otros peces migratorios de importancia comercial y deportiva en esta zona son la Boga, el Dorado, y el Patí (CARU, 2006).

A continuación se describen brevemente las características más relevantes de las principales especies dulceacuícolas explotadas en nuestro país, la Boga y el Sábalo.

Caracterización de la especie de mayor importancia comercial del Río Uruguay

BOGA

- Orden: Characiformes
- Familia: Anostomidae
- Especie: *Leporinus obtusidens*.

La figura a continuación muestra la distribución en Uruguay y una foto ilustrativa de la Boga



Figura 3: *Leporinus obtusidens* (Pinnacchio G., 2011).

Nombre común: Boga, Bogón, Piava, Piapara, Piará-uçu, Piau (Teixeira de Mello y col., 2011).

Distribución: cuencas de los ríos Paraná, Río de la Plata, Uruguay y San Francisco (Teixeira de Mello y col., 2011).

Distribución en Uruguay: río Uruguay y sus principales afluentes, tramo inferior del río Negro, así como río Santa lucía y Río de la Plata oeste y este (Teixeira de Mello y col., 2011).

Según Foti y col., el rango observado de longitud estándar (Ls) fue de 32 a 48 cm. Las capturas comerciales se encuentran entre los 2 y 4 Kg (CARU, 2010)

Especie omnívora, se alimenta de granos y semillas, vegetales, peces pequeños (Espinach y col., 2008). En el bajo Paraná y Río de la Plata se ha percibido un aumento poblacional, aparentemente relacionado con la inclusión de la almeja asiática *Limnoperna fortunei* (Pinnacchio G., 2011) en su dieta.

Prefiere las aguas profundas de ambientes lóticos, especie migradora (Espinach y col., 2008).

Segunda especie de importancia comercial en nuestro país (Uruguay, 2010; Foti y col., 2010).

Se captura en 3 modalidades: subsistencia, comercial y deportiva. Aparece como fauna acompañante en la pesca artesanal del Sábalo (Pinnacchio G., 2011).

SÁBALO

- Orden: Characiformes
- Familia: Prochilodontidae
- Especie: *Prochilodus lineatus* (Teixeira de Mello y col., 2011).

La figura a continuación muestra la distribución en Uruguay y foto ilustrativa del Sábalo.



Figura 4: *Prochilodus lineatus* (Pinnacchio G., 2011).

Nombre común: Sábalo, Lamepiedras, carimbatá, curimbatá, grumatá, grumatão, curimbá (Teixeira de Mello y col., 2011).

Distribución: cuencas de los ríos Paraná, Paraguay y Uruguay así como las cuencas de Paraíba do Sul (Teixeira de Mello y col., 2011).

Distribución en Uruguay: río Uruguay y principales afluentes, tramo inferior del río Negro, río Santa Lucía y Río de la Plata oeste (Teixeira de Mello y col., 2011).

Es la principal especie dulceacuícola de importancia comercial (Foti y col., 2010).

Se encuentra en grandes ríos y realiza extensas migraciones para su alimentación y reproducción (Teixeira de Mello y col., 2011).

Alimentación detrívora, teniendo gran importancia en la ecología del ecosistema (Teixeira de Mello y col., 2011). Los adultos y los juveniles se alimentan de los detritos, principalmente de origen vegetal, contenidos en los sedimentos del fondo del río y de los cuerpos de agua asociados. De este modo juegan un rol valioso en el proceso de la transformación de la materia orgánica, que se canaliza a niveles tróficos superiores a través de la predación sobre larvas, juveniles y adultos de esta especie (CARU, 2006).

Especie de gran tamaño, pudiendo alcanzar los 80 cm de largo total y superar los 7 kg de peso según Zaniboni (Teixeira de Mello y *col.*, 2011).

Rango de longitud estándar de 30 a 58 cm., en ejemplares muestreados en el 2009 (Foti y *col.*, 2010; CARU 2010).

Definición de peces y pescado

Según *Codex Alimentarius*, los peces son todos los vertebrados acuáticos de sangre fría designados de ordinario con dicho nombre. Se incluyen píscidos, elasmobranquios y ciclóstomos (Dragonetti, J.P., 2008), y define a los pescados o mariscos como un alimento fácilmente perecedero, o como alimentos que permitan el crecimiento progresivo de microorganismos que puedan causar envenenamiento u otras enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) (FAO, 1998).

Según la Norma Mercosur (Gmc/Res. N° 40/94), el pescado se entiende por el producto obtenido de animales acuáticos de sangre fría. Se excluyen los mamíferos acuáticos, los animales invertebrados y los anfibios.

Como pescado fresco, se entiende al producto obtenido de especímenes sanos y de calidad adecuada para el consumo humano, convenientemente lavado y que se ha preservado solamente enfriándolo a una temperatura próxima a la del punto de fusión del hielo. El pescado fresco, de acuerdo a los componentes anatómicos, se clasifica en:

- Entero: es el pescado entero y lavado,
- Eviscerado: es el producto del pescado fresco, luego de la remoción de las vísceras, pudiendo ser presentado con o sin cabeza, aletas y/o escamas (Normas Mercosur, 2003).

Según Reglamento Bromatológico Nacional (decreto 315/94) se entiende por pescado a los organismos vertebrados de sangre fría (poiquilotermos) extraídos del medio acuático natural o de ambientes creados por el hombre para la cría (tanto de agua salada como de agua dulce) que pertenecen a cualquier de las tres clases del grupo Peces Ciclostomos, Condrictios y Osteíctios (Uruguay, 2012)

CAMBIOS POSTMORTEM Y DETERIORO DEL PESCADO

El desarrollo de las condiciones de deterioro en el pescado y sus productos se debe a la combinación de fenómenos autolíticos, químicos y microbiológicos (Huss H., 1997). La condición denominada "deterioro" no está en términos objetivos claramente definida. La pérdida inicial de frescura de las especies de pescado magras en su estado natural, con o sin refrigeración se debe a cambios autolíticos, mientras que el deterioro se debe principalmente a la acción de los microorganismos (Huss H., 1997).

Según Sikorsky, los cambios que sufre el pescado luego de su captura dependen de los factores que afectan las concentraciones de sustratos y metabolitos de los peces vivos, actividades enzimáticas, contaminación microbiológica, y condiciones de captura (Dragonetti, J.P., 2008).

Producción de energía en músculo de pescado post mortem

Los peces tienen mayor proporción de tejido muscular en relación a otros vertebrados por lo que se obtienen mayor rendimiento en ellos. Las principales masas musculares de los peces se encuentran en el tronco y la cola. La musculatura esquelética se encuentra formada por cortas unidades, los miótomos, que se alternan con láminas de tejido conjuntivo, la miosepta y la miocomata según los casos (Dragonetti, J.P., 2008).

Las fibras musculares rojas o también llamadas fibras musculares lentas, son las utilizadas para largos desplazamientos, estas fibras representan entre un 0,5% y un 10% de la musculatura lateral aunque en atunes y otras especies pelágicas pueden representar un 30% de la misma. Estas fibras tienen un alto contenido en lípidos, y escaso en glucógeno y se caracterizan por poseer una importante cantidad en mitocondrias. Las fibras musculares blancas también llamadas rápidas debido a que actúan en la respuesta rápida y de corta duración. Se fatigan rápidamente y su recuperación es lenta (Dragonetti, J.P., 2008).

Al momento de la muerte, el suministro de oxígeno al tejido muscular se interrumpe porque la sangre deja de ser bombeada por el corazón y no circula a través de las branquias donde, en los peces vivos, es enriquecida con oxígeno. Dado que el oxígeno no está disponible para la respiración normal, se restringe la producción de energía a partir de los nutrientes ingeridos (Huss H., 1998).

La Figura 5, ilustra la ruta normal para la producción de energía muscular en la mayoría de los peces teleósteos vivos (peces óseos con aletas). El glucógeno (carbohidrato de almacenamiento) o las grasas son oxidadas o "quemadas" por las enzimas del tejido, en una serie de reacciones las cuales finalmente producen dióxido de carbono (CO_2), agua y adenosin trifosfato (ATP), un compuesto orgánico rico en energía (Huss H., 1998).

Este tipo de respiración se efectúa en dos etapas: una anaeróbica y otra aeróbica. La última depende de la continua presencia del oxígeno (O_2), sólo disponible en el sistema circulatorio. La Figura 5, también ilustra el hecho de que en condiciones de anaerobiosis, el ATP puede ser sintetizado a través de otras dos importantes rutas a partir de la creatina fosfato o la arginina fosfato (Huss H., 1998).

La primera fuente de energía está restringida al músculo de los vertebrados (peces teleósteos), mientras que la segunda es característica de algunos invertebrados como los cefalópodos (calamar y pulpo). En cualquiera de los dos casos, la producción de ATP cesa en cuanto se agotan la creatina fosfato o la arginina fosfato (Huss H., 1998).

Resulta interesante resaltar que el producto final del metabolismo anaeróbico es de naturaleza ácida (Acido láctico), que es el producto final en los peces teleósteos, (Huss H., 1998).

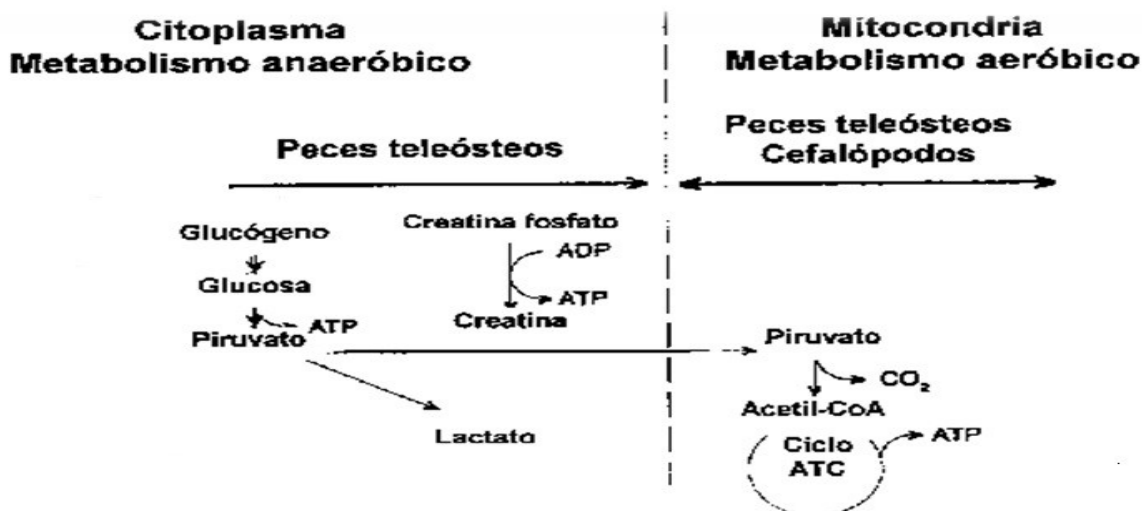


Figura 5, Descomposición aeróbica y anaeróbica del glucógeno en el músculo del pescado (adaptado: Huss H., 1998).

Para la mayoría de los peces óseos, la glucólisis es la única ruta posible para la producción de energía en cuanto el corazón deja de latir. Este proceso, más ineficiente, genera principalmente ácido láctico y ácido pirúvico como productos finales. Además, mediante la glucólisis se producen dos moles de ATP por cada mol de glucosa, en comparación con los 36 moles de ATP producidos por cada mol de glucosa si los productos glucolíticos finales son oxidados aeróbicamente en la mitocondria del animal vivo. Así, después de la muerte, el músculo anaeróbico no puede mantener su nivel normal de ATP, y cuando el nivel intracelular declina de 7-10 μ moles/g a $\leq 1,0$ μ moles/g de tejido, el músculo entra en *rigor mortis*. La glucólisis *post mortem* resulta en la acumulación de ácido láctico, con la concomitante disminución del pH en el músculo (Huss H., 1998).

Cambios de pH en pescado post mortem

Como se menciona la glucólisis anaerobia *post mortem*, resulta en la acumulación de ácido láctico, con la concomitante disminución del pH en el músculo (Huss H., 1998).

Estudios realizados en el Bacalao demostraron que el pH puede disminuir desde 6.8 hasta un pH extremo de 6.1-6.5. En otras especies de pescado el pH final puede ser menor, como en caballas grandes, el pH extremo en el *rigor mortis* puede llegar a ser tan bajo como 5.8-6.0, y en atunes e hipoglosos se han encontrado valores tan bajos como 5.4-5.6 (Huss H., 1998).

Sin embargo, estos niveles tan bajos de pH no son frecuentes en teleósteos marinos. Este pH rara vez es tan bajo como los observados en el músculo *post mortem* de mamíferos. Por ejemplo, el pH del músculo de vacuno generalmente disminuye a niveles de 5.1 durante el *rigor mortis*. La cantidad de ácido láctico producido está relacionada con la cantidad de carbohidrato almacenado (glucógeno) en el tejido vivo.

En general, el músculo de pescado contiene niveles relativamente bajos de glucógeno, comparado con los mamíferos y por esta razón se genera mucho menos ácido láctico después de la muerte. También el estado nutricional del pez, la cantidad y grado de agotamiento al momento de la muerte, tienen un efecto dramático en los niveles de glucógeno almacenado y consecuentemente en el pH *post mortem* final (Huss H., 1998).

Como regla, el pescado bien descansado y bien alimentado contiene más glucógeno que el pescado exhausto y hambriento. La disminución *post mortem* en el pH del músculo de pescado tiene un efecto en las propiedades físicas del músculo. A medida que el pH disminuye, se reduce la carga neta de la superficie de las proteínas musculares, causando su desnaturalización parcial y disminuyendo su capacidad de enlazar agua (Huss H., 1998).

Cambios y evaluación sensorial post mortem en pescado

La evaluación sensorial se define como la disciplina científica empleada para evocar, medir, analizar e interpretar reacciones características del alimento, percibidas a través de los sentidos de la vista, olfato, gusto, tacto y audición (Huss H., 1998)

Fases del deterioro observadas durante la evaluación sensorial:

Según el *Codex Alimentarius* la mejor manera de evaluar el grado de frescura o descomposición del pescado consiste en aplicar técnicas de evaluación sensorial (Dragonetti J.P., 2008).

La evaluación sensorial del pescado crudo en mercados y sitios de desembarque se efectúa mediante la evaluación de la *apariencia, textura y olor*. La mayoría de los sistemas de puntuación están basados en los cambios que se producen durante el almacenamiento en hielo derretido. Debe recordarse que los cambios característicos varían dependiendo del método de almacenamiento. Se puede detectar un patrón característico del deterioro del pescado almacenado en hielo, el cual puede ser dividido en las cuatro fases (Huss H., 1998).

Fase 1 El pescado es muy fresco y tiene un sabor a algas marinas, dulce y delicado. El sabor puede ser muy ligeramente metálico. En el bacalao, la merluza, el merlán y el lenguado, el sabor dulce se hace más pronunciado a los 2-3 días de la captura.

Fase 2 Hay una pérdida del olor y del gusto característicos. La carne es neutral pero no tiene olores extraños. La textura se mantiene agradable.

Fase 3 Aparecen signos de deterioro y, dependiendo de la especie y del tipo de deterioro (aeróbico o anaeróbico), se producen una serie de compuestos volátiles de olor desagradable. Uno de estos compuestos volátiles puede ser la trimetilamina (TMA) derivada de la reducción bacteriana del óxido de trimetilamina (OTMA).

La TMA tiene un olor a "pescado" muy característico. Al inicio de esta fase pueden aparecer olores y sabores ligeramente ácidos, afrutados y ligeramente amargos, especialmente en peces grasos. En los últimos estadios de esta fase se desarrollan olores nauseabundos, dulces, amoniacales, sulfurosos y rancios. La textura se toma suave y aguada, o dura y seca.

Fase 4 El pescado puede caracterizarse como deteriorado y pútrido (Huss H., 1998).

La *apariencia general* del pescado almacenado en condiciones de enfriamiento sin hielo no cambia tanto en relación con el pescado en hielo, pero su deterioro es más rápido y se hace necesario efectuar una evaluación sensorial del pescado cocido. Por consiguiente, es esencial conocer la historia tiempo/temperatura del pescado al momento del desembarco (Huss H., 1998).

La apariencia general se utiliza para toda la partida del lote de pescado, tomando en cuenta las condiciones de almacenamiento, cantidad de hielo utilizado por caja, presencia de sustancias extrañas, y posibilita también la evaluación simultánea de los parámetros sensoriales de frescura como son el *olor*, *color* y *textura* (Dragonetti J.P., 2008).

El cambio más dramático que sufre el pescado es el *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. La resolución del *rigor mortis* depende de la activación enzimática responsable de los procesos autolíticos que permiten que el músculo se relaje nuevamente y recupere la flexibilidad, pero no la elasticidad previa al *rigor* (Huss H., 1998).

El *rigor mortis* (RM) se inicia inmediatamente o poco después de la muerte, en el caso de peces hambrientos y cuyas reservas de glucógeno están agotadas, o en peces exhaustos (Dragonetti J.P., 2008).

Según Sikorski la presencia del RM indica absoluta frescura debido a que no ha transcurrido mucho tiempo desde la muerte del animal (Dragonetti J.P., 2008).

Para la *comprobación del RM* se sostiene al pescado de la cabeza y verificando que el mismo se mantiene rígido estamos en presencia del R.M., esto es debido a la contractura muscular que caracteriza este estado (Dragonetti J.P., 2008)

También en este punto evaluamos color y olor para lo cual debemos tener en cuenta las características particulares de la especie evaluada. El olor es el atributo que en general percibimos primero, y se recomienda comenzar la evaluación desde las regiones de menor a mayor intensidad de olor, para así evitar la fatiga del sentido (Dragonetti J.P., 2008)

Como se menciona otro parámetro que evaluamos es el *olor*, y según el tipo de compuestos que predominen es el olor que vamos a percibir, podemos encontrar “*olor a mar*” en pescados muy frescos (predomina OTMA); “*olor neutro*” (equilibrio entre OTMA – TMA); “*a pescado*” (predominio de TMA) y “*a podrido*” (predominio de amoníaco) (Dragonetti J.P., 2008; Pinnacchio G., 2011).

Para los peces de agua dulce un olor y sabor extraño a lodo / tierra es muy frecuente en muchas especies. Esto es debido principalmente por dos compuestos: la geosmina (1a, 10b - dimetil - 9^a- decalol; GEO) y el 2- metilisoborneol (MIB) (Huss, 1998). Estos compuestos son producidos por cianobacterias de los géneros *Oscillatoria*, *Anabaena* y *Simploca* (Kubitza, 1999) y por *Actinomyces* (Kubitza, 1999) y *Streptomyces* (Huss H., 1998).

Las cianobacterias son organismos del fitoplancton y se encuentran principalmente en cuerpos de agua con altos niveles tróficos (Pérez y col. 2008). Estos organismos son los responsables de la producción de GEO, asociada al gusto u olor de tierra o barro, y del MIB responsable del gusto u olor a moho (olor de papel o libro mojado) (Kubitza, 1999).

El olor de la GEO es detectable en concentraciones de 0.01- 0.1 mg. /litro (Huss H., 1998) y el gusto es detectado con cantidades de 0,6 ppm (Ching, 2006). La Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA) considera aceptable para el consumo humano, concentraciones de 0,7 mg. de GEO/ Kg. de filete de pescado (Ching, 2006; Pinnacchio G., 2011).

Otros parámetros para determinar la frescura del pescado

Evaluación de los ojos: a medida que avanza el deterioro el cristalino pierde su transparencia, ya que aumenta la concentración de los solutos en el humor acuoso. También se produce la deshidratación del panículo adiposo que rodea al globo ocular, lo cual provoca la pérdida de la convexidad hasta la enoftalmia (Dragonetti J.P., 2008; Pinnacchio G., 2011)

Evaluación de las branquias: se debe levantar el opérculo para su correcta visualización. Se observa color, olor y presencia de moco que en el pescado fresco se aprecia como una fina capa brillante, y a medida que avanza el deterioro se espesa hasta formar grumos (Dragonetti J.P., 2008; Pinnacchio G., 2011)

Textura y elasticidad: la textura la evaluamos observando el grado de protrusión de los miótomos, evidenciando la degradación del tejido conectivo pericelular. Se realiza un corte a la altura de la cola y rodeando la porción cortada con dedos índice y pulgar, y ejercemos presión sobre la masa muscular (Dragonetti J.P., 2008). La elasticidad se evalúa ejerciendo presión moderada sobre los músculos laterales y valorando su capacidad de respuesta (Dragonetti J.P., 2008; Pinnacchio G., 2011).

Deterioro por cambios autolíticos y por acción de las enzimas bacterianas

Autólisis significa "auto-digestión". Se sabe desde hace muchos años que existen por lo menos dos tipos de deterioro en el pescado: por microorganismos y enzimático (Huss H., 1998).

Los cambios autolíticos (cuadro 5) son los que determinan las pérdidas iniciales de calidad en el pescado fresco, pero contribuyen muy poco al deterioro del pescado refrigerado o de sus productos refrigerados (Huss H., 1997).

Un ejemplo es la reducción del óxido de trimetilamina (OTMA) en pescado refrigerado, por un proceso bacteriano con formación de trimetilamina (TMA). No obstante, en el pescado congelado la acción bacteriana está inhibida y el OTMA es descompuesto por la acción de enzimas autolíticas en dimetilamina (DMA) y formaldehído (FA). Los efectos del FA formado en el pescado congelado son: el aumento de la desnaturalización del músculo del pescado, cambios en la textura y la pérdida de la capacidad de retención del agua (Huss H., 1997).

Surette y col., se encargaron de estudiar la autólisis en especies como el bacalao estéril y no estéril, mediante los catabolitos de ATP. La velocidad de formación y descomposición del Inosin monofosfato (IMP) fue la misma tanto en las muestras de tejido del pescado estéril como en las del pescado no estéril, lo cual indica que la ruta catabólica para la degradación de ATP hasta inosina es debida en su totalidad a enzimas autolíticas. La conversión de inosina a hipoxantina se aceleró 2 días en las muestras no estériles. Esto sugiere que la nucleosida fosforilasa bacteriana (enzima 5^a en la figura 6 desempeña un papel principal en la producción *post mortem* de hipoxantina en bacalao refrigerado (Huss H., 1998).

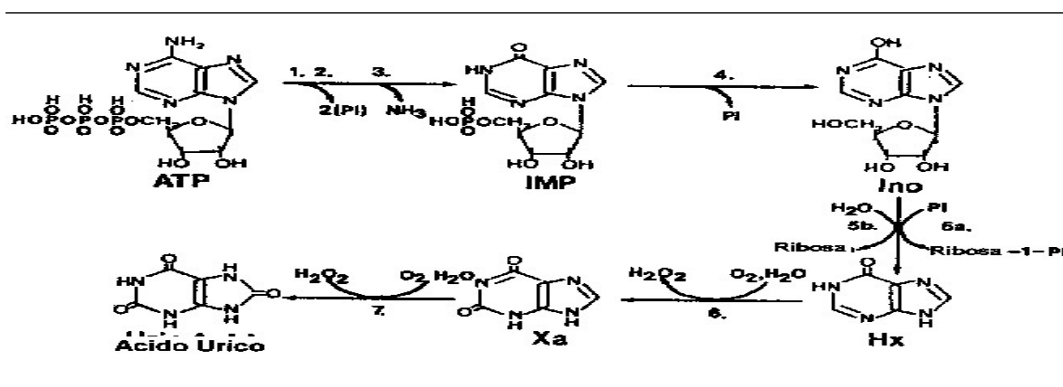


Figura 6: Degradación *post mortem* del ATP en el músculo de pescado. Enzimas que actúan: 1. ATP-asa; 2. miokinasa; 3. AMP-desaminasa; 4. IMP-fosfohidrolasa; 5^a. nucleosida fosforilasa; 5^b. inosina nucleosidasa; 6,7. xantina oxidasa (adaptado Huss H., 1998).

Cuadro 5: Resumen de los cambios autolíticos en el pescado refrigerado

Enzima (s)	Sustrato	Cambios encontrados
Enzimas glucolíticas	glucógeno	producción de ácido láctico, disminución del pH de los tejidos, pérdida de la capacidad de enlazar agua en el músculo altas temperaturas durante el <i>rigor</i> pueden ocasionar "desgajamiento"
Enzimas autolíticas, involucradas en la degradación de nucleótidos	ATP ADP AMP IMP	pérdida del sabor a pescado fresco, producción gradual del sabor amargo con Hx (estados finales)
Catepsinas	proteínas, péptidos	ablandamiento del tejido dificultando o impidiendo su procesamiento
Quimotripsina, tripsina carboxipeptidasas	proteínas, péptidos	autólisis de la cavidad visceral en pelágicos (estallido de vientre)
Calpaína	proteínas miofibrilares	ablandamiento, ablandamiento inducido por muda en crustáceos
Colagenasas	tejido conectivo	"desgajamiento" de filetes ablandamiento
OTMA desmetilasa	OTMA	endurecimiento inducido por formaldehído (gádidos almacenados en congelación)

(Huss H., 1998).

Cambios bioquímicos y fracciones extraíbles que contienen nitrógeno durante el deterioro

Dentro del desarrollo de las condiciones de deterioro podemos encontrar compuestos volátiles en vías de alteración donde se incluyen las bases volátiles totales (BVT), ácido volátiles totales (AVT), sustancias volátiles totales (SVT), y bases nitrogenadas volátiles totales (NVT) entre ellas el amoníaco y el óxido de trimetilamina (OTMA), creatina, aminoácidos libres, nucleótidos y bases purínicas y, en el caso de peces cartilaginosos, urea (Huss H., 1998).

Los compuestos extractables que contienen nitrógeno pueden definirse como compuestos de naturaleza no proteica, solubles en agua, de bajo peso molecular y que contienen nitrógeno. Esta fracción NNP (nitrógeno no proteico) constituye en los teleósteos entre un 9 y un 18 por ciento del nitrógeno total (Huss H., 1998).

Hebard y col. 1989, demostraron que el OTMA se encuentra en todas las especies de peces de agua de mar en cantidades del 1 al 5 por ciento del tejido muscular (peso seco), pero está virtualmente ausente en especies de agua dulce y en organismos terrestres (Huss H., 1998).

Una excepción fue encontrada recientemente en un estudio sobre la percha del Nilo y la tilapia del Lago Victoria, en las cuales se encontró tanto como 150-200 mg de OTMA/100g de pescado fresco (Huss H., 1998).

Aunque se han efectuado muchos trabajos sobre el origen y el papel del OTMA, Stroem *et al.* (1979) han demostrado que el OTMA se forma por biosíntesis de ciertas especies del zooplancton. Estos organismos poseen una enzima (TMA monooxigenasa) que oxida la TMA a OTMA. (Huss H., 1998).

La TMA comúnmente se encuentra en plantas marinas, al igual que otras aminas metiladas (monometilamina y dimetilamina). El pez que se alimenta de plancton puede obtener OTMA de su alimentación (origen exógeno) (Huss H., 1998).

Belinski (1964) y Agustsson y Stroem (1981) han demostrado que algunas especies de peces son capaces de sintetizar OTMA a partir de TMA, pero esta síntesis se considera de menor importancia (Huss H., 1998).

En Japón y Australia las BN (Bases Nitrogenadas) se han utilizado como método para evaluar la calidad de productos de la pesca, aceptándose un máximo de 30 mg/100 g de alimento, siempre y cuando el contenido de Trimetilamina (TMA) no supere los 5 mg/100g de alimento. Por encima de estos valores límites el alimento se rechaza porque sus características sensoriales son desagradables.

Una de las ventajas de este método es que no depende de un único metabolito para evaluar el grado de frescura del pescado, pero presenta una incapacidad para detectar grados incipientes de alteración (James M. Jay, 2009)

Cambios Microbiológicos en pescado

Microflora bacteriana y Microorganismos Específicos del Deterioro (MED)

Los microorganismos se encuentran en todas las superficies externas (piel y branquias) y en los intestinos de los peces vivos y recién capturados. El número total de microorganismos varía enormemente, Liston estableció como rango normal 10^2 - 10^7 ufc /cm² en la superficie de la piel y, según Shewan las branquias e intestinos contienen entre 10^3 y 10^9 ufc/g (Huss H., 1998).

La microflora bacteriana en pescados recién capturados depende más del medio ambiente de captura, que de la propia especie. Los pescados capturados en aguas muy frías y limpias contienen un menor número de microorganismos, mientras que el pescado capturado en aguas cálidas presenta recuentos ligeramente superiores. Recuento altos, por ejemplo 10^7 ufc/cm², se encuentran en pescados capturados en aguas muy contaminadas (Huss H., 1998).

Muchas especies diferentes de microorganismos pueden ser encontradas en la superficie de los pescados. Los microorganismos en peces de aguas templadas son clasificados en psicrotrófos y psicrófilos, de acuerdo al rango de su temperatura de crecimiento. Los psicrotrófos (tolerantes al frío) son microorganismos capaces de crecer a 0 °C pero su óptimo es alrededor de los 25 °C. Los psicrófilos (amantes del frío) son microorganismos con una temperatura máxima de crecimiento alrededor de los 20 °C y su óptimo a 15 °C. En las aguas cálidas pueden aislarse un mayor número de mesófilos (Huss H., 1998).

Como se observa en el cuadro 6, la microflora en peces de aguas templadas está dominada por microorganismos psicrófilos gramnegativos con forma de bastones, pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella* y *Flavobacterium*. Miembros de las *Vibrionáceas* (*Vibrio* y *Photobacterium*) y de las *Aeromonadáceas* (*Aeromonas* spp.) son también microorganismos acuáticos comunes y típicos de la microflora bacteriana en pescado. Microorganismos grampositivos como *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* y coryneformes también pueden ser encontrados en distintas proporciones. Pero en general, los microorganismos gramnegativos dominan la microflora (Huss H., 1998).

Las *Aeromonas* spp. son típicas de los peces de agua dulce, mientras que otras bacterias requieren sodio para su crecimiento y, por lo tanto, son típicas de aguas marinas. Este grupo incluye *Vibrio*, *Photobacterium* y *Shewanella* (Huss H., 1998).

Di Christina y DeLong, 1993; Gram *et al*; 1990; Spanggaard *et al.*, 1993 demostraron que a pesar de que *Shewanella putrefaciens* se caracteriza como dependiente de sodio, también pueden aislarse a partir de ambientes de agua dulce. Lima dos Santos, 1978; y Gram, 1990; determinaron que *S. putrefaciens* aislada de aguas dulces tropicales, no resultaba de importancia en el deterioro del pescado de agua dulce (Huss H., 1998).

Cuadro 6: Microflora bacteriana de pescado capturado en aguas limpias no contaminadas

Gramnegativas	Gram-positivas	Comentarios
<i>Pseudomonas</i>	<i>Bacillus</i>	
<i>Moraxella</i>	<i>Clostridium</i>	
<i>Acinetobacter</i>	<i>Micrococcus</i>	
<i>Shewanella</i>	<i>Lactobacillus</i>	
<i>putrefaciens</i>		
<i>Flavobacterium</i>	Coryneformes	
<i>Cytophaga</i>		
<i>Vibrio</i>		<i>Vibrio</i> y <i>Photobacterium</i> son típicas de aguas marinas;
<i>Photobacterium</i>		
<i>Aeromonas spp.</i>		<i>Aeromonas</i> es típica de agua dulce

(Huss H., 1998)

Dentro de los microorganismos presentes en pescados de agua dulce describimos al género *Aeromonas* spp. como bacilos gramnegativos acuáticos perteneciente anteriormente a la familia *Vibrionaceae* pero se las han incluido en la actualidad dentro de las *Aeromonadaceas*. Como se deduce del nombre del género, producen gas durante la fermentación de los carbohidratos. Su hábitat normal es el Intestino del pescado y algunos son patógenos para los peces. El contenido Guanina+Citosina del ADN del genero es 57- 65%. Como se comento anteriormente este género originalmente fue clasificado como perteneciente al género *Vibrio*, pero en base a estudios de hibridación de ADN fue propuesta la creación de la familia *Aeromonadaceae* (James M. Jay, 2009).

Son bacilos cortos que miden 1,1 a 4,4 por 0,4 a 1 μm . y son muy móviles por un solo flagelo polar, no forman cápsula y son aerobios y anaerobios facultativos.

Producen oxidasa y catalasa, fermentan glucosa y otros carbohidratos en ácidos y gas, y reducen nitratos a nitritos. Existen dos grupos del género; el grupo móvil, indol positivo con crecimiento óptimo de 35 a 37°C cuyas especies son: *A. hydrophila*, *A. sobria* y *A. caviae*, consideradas patógenas para el hombre; y el grupo inmóvil de crecimiento óptimo a 20°C y que comprende la especie salmonicida. (Romero Cabello R., 1997).

La Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos de América incluye a las especies del género *Aeromonas* dentro de las lista de patógenos emergentes (Majano A., y col 2009).

La Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA) considera a las cepas de *Aeromona hydrophila* como microorganismos capaces de causar enfermedades en los peces y anfibios, así como en los seres humanos que pueden adquirir infecciones a través de heridas abiertas o por la ingestión de un número suficiente de los organismos en los alimentos o el agua (FDA, 2013). Esta especie presenta como factores de virulencia enterotoxinas, hemolisinas, citotoxinas y adhesinas (Romero Cabello R., 2007).

En los últimos años, la *Aeromona hydrophila* se la ha relacionado con procesos infecciosos en humanos, causando diarrea, celulitis y bacteriemia en pacientes inmunodeprimidos. Por primera vez en 1937, se considero a *Aeromonas spp* como microorganismo colonizador de peces, reptiles y anfibios y en la década de 1970 en humanos (Romero Cabello R., 2007).

En 1962, Habs y Schubert definieron el género *Plesiomonas* con base en las diferencias morfológicas con *Aeromonas spp.* y *Vibrio*. El género *Plesiomonas* identificada también como microorganismo deteriorante en pescados, son bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos que pertenecen a la familia *Vibrionaceae*, presenta de dos a cinco flagelos polares y puede medir de 2 a 3 por 0,1 a 1,0 μm . Este género posee una sola especie, *P. shigelloides* (Romero Cabello R., 2007)

Otro microorganismo que se encuentra en la superficie de los pescados corresponde al género *Pseudomonas*, este bacilo perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae*, está conformado por una gran variedad de especies que habitan en el suelo y en las aguas estancadas, y forman parte de la microflora nativa del intestino de varias especies animales. Los miembros de este género son bacilos gramnegativos, aerobios y anaerobios facultativos (James M. Jay, 2009).

Ruskol y Bendsen (1992) mostraron mediante exámenes microscópicos que las bacterias pueden ser detectadas en el músculo cuando el número de microorganismos en la superficie de la piel se incrementa por encima de las 10^6 ufc/cm². Este resultado fue observado tanto en el almacenamiento en hielo como en ambiente refrigerado. Dado que sólo un número limitado de microorganismos realmente invade el músculo y el crecimiento microbiano se lleva a cabo principalmente en la superficie, el deterioro es probablemente una consecuencia de la difusión de enzimas bacterianas hacia el interior del músculo y de la difusión externa de nutrientes (Huss H., 1998).

En una investigación con 159 cepas gramnegativas aisladas de pescado de agua dulce deteriorado, las cuales presentaron recuentos de aerobios totales en el entorno de 10^8 ufc/g, el 46% correspondieron al género *Pseudomonas* y alrededor del 38% fueron *Shewanella spp.* (James M. Jay, 2009).

El estudio microbiológico realizado de la piel de cuatro diferentes especies de pescado ha revelado que los microorganismos más comunes en este sustrato son *Pseudomonas* y *Alteromonas* en una relación de 32 y 60% y *Moraxella* y *Acinetobacter* en 18%-37%, (James M. Jay, 2009).

Los microorganismos presentes en pescados capturados en aguas templadas, entran en fase exponencial de crecimiento casi inmediatamente después de la muerte de los peces.

Esto también ocurre cuando el pescado es colocado en hielo, probablemente porque la microflora se encuentra adaptada a las temperaturas de enfriamiento. 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, por gramo de músculo o cm de piel (Huss H., 1998)

A temperatura ambiente (25 °C), la microflora en el punto de deterioro está dominada por *Vibrionáceas* mesofílicas y, particularmente si el pescado proviene de aguas contaminadas por *Enterobacteriáceas* (Huss H., 1998).

Otros estudios realizados por Morita, 1975; Devaraju y Setty en 1985, demostraron que la composición de la microflora cambia dramáticamente durante el almacenamiento. De esta forma, después de 1 - 2 semanas de almacenamiento aeróbico en hielo, la microflora está constituida casi exclusivamente por *Pseudomonas* spp. y *S. putrefaciens*. Esto, se cree, es debido a su relativo corto tiempo de generación a temperaturas de enfriamiento. Este hecho ha sido confirmado por numerosos estudios llevados a cabo en peces de aguas tropicales y de aguas templadas. Una gran parte de los microorganismos presentes en el pescado deteriorado no desempeñan ningún papel en lo absoluto en el deterioro (Huss H., 1998).

Como se observa en la figura 7, cada producto pesquero posee sus propios microorganismos específicos del deterioro y es el número de estos microorganismos, y no el número total de ellos, lo que guarda relación con la duración en almacenamiento del producto (Huss H., 1998).

No es una tarea fácil determinar, entre los microorganismos aislados del pescado deteriorado, los verdaderos responsables del deterioro, pues se requieren extensos estudios sensoriales, microbiológicos y químicos (Huss H., 1998).

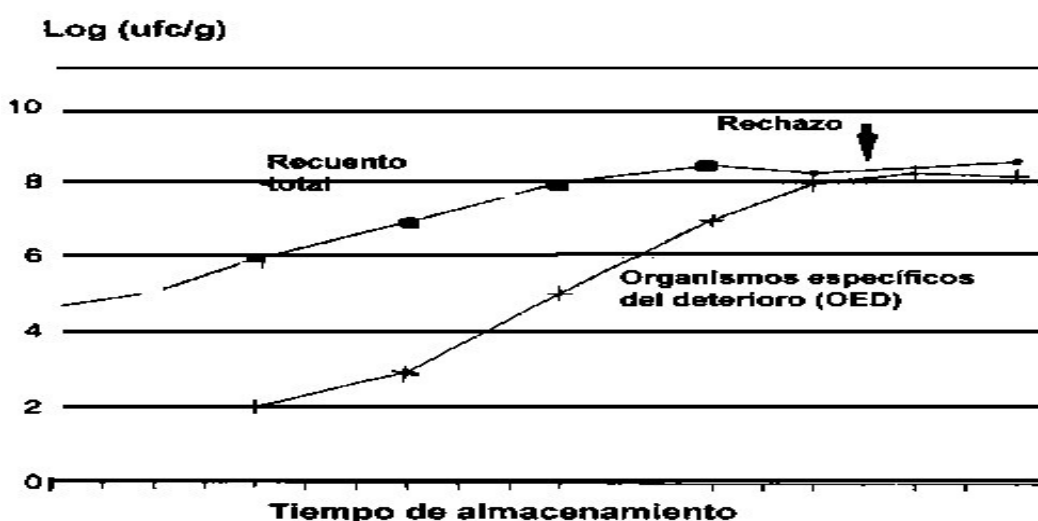


Figura 7: Recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales y recuento de Organismos Específicos del Deterioro (OED) en función del tiempo de almacenamiento en frío. (Huss H., 1998)

Como se detalla en el cuadro 7, *Shewanella putrefaciens* ha sido identificada como el microorganismo específico del deterioro del pescado de aguas templadas almacenado aeróbicamente en hielo. Si este producto se empaca al vacío, *P. phosphoreum* participa en el deterioro y pasa a ser el específico del deterioro del pescado empacado en presencia de CO₂.

La microflora del deterioro, del pescado tropical de mar almacenado en hielo, está compuesta casi exclusivamente de *Pseudomonas* spp. y *S. putrefaciens*. Algunas *Pseudomonas* spp. son específicas del deterioro del pescado tropical de agua dulce almacenado en hielo y conjuntamente con *S. putrefaciens*, son también las causantes del deterioro del pescado marino tropical almacenado en hielo (Huss H. 1998).

Diferentes trabajos demostraron que a temperatura ambiente las *Aeromonas* móviles son específicas del deterioro del pescado de agua dulce almacenados aeróbicamente. Barile y col (1985), demostraron que una gran proporción de la microflora en caballa almacenada a temperatura ambiente, estaba constituida por *S. putrefaciens*, indicando que esta bacteria quizá participaba también en el deterioro, (Huss H., 1998).

Cuadro 7: Microflora dominante y microorganismos específicos del deterioro de pescado blanco fresco (bacalao).

Temperatura de almacenamiento	Atmósfera de envasado	Microflora dominante	Organismos específicos del deterioro (OED)
0°C	Aeróbica	Bacilos Gram negativos psicrótróicos, no fermentativos (<i>Pseudomonas</i> spp., <i>S. putrefaciens</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Acinetobacter</i>)	<i>S. putrefaciens</i> <i>Pseudomonas</i> ₃
	Vacío	Bacilos Gram negativos, psicrótróicos o con carácter psicrófilo (<i>S. putrefaciens</i> , <i>Photobacterium</i>)	<i>S. putrefaciens</i> <i>P. phosphoreum</i>
	EAM ¹	Bacilos Gram negativos fermentativos con carácter psicrófilo (<i>Photobacterium</i>) Bacilos Gram negativos no fermentativos psicrótróicos (1-10% de la microflora: <i>Pseudomonas</i> , <i>S. putrefaciens</i>) Bacilos Gram positivos (BAL ²)	<i>P. phosphoreum</i>
5°C	Aeróbica	Bacilos Gram negativos psicrótróicos (<i>Aeromonadaceae</i> <i>Vibrionaceae</i>), <i>S. putrefaciens</i>)	<i>Aeromonas</i> spp. <i>S. putrefaciens</i>
	Vacío	Bacilos Gram negativos psicrótróicos (<i>Aeromonadaceae</i> , <i>Vibrionaceae</i> <i>S. putrefaciens</i>)	<i>Aeromonas</i> spp. <i>S. putrefaciens</i>
	EAM ¹	Bacilos Gram negativos psicrótróicos (<i>Aeromonadaceae</i>)	<i>Aeromonas</i> spp.
20 - 30 °C	Aeróbica	Bacilos Gram negativos mesófilos fermentativos (<i>Aeromonadaceae</i> , <i>Vibrionaceae</i> <i>Enterobacteriáceas</i>)	<i>Aeromonas</i> spp. móvil (<i>A. Hydrophila</i>)

EAM¹ -Envasado en atmósfera modificada

(Huss H., 1998)

Cambios bioquímicos inducidos por el crecimiento microbiológico durante el almacenamiento y el proceso de deterioro en pescado

Al comparar los compuestos químicos desarrollados durante el deterioro natural del pescado y el pescado estéril; Shewan en el año 1962, demostró que la mayoría de los componentes volátiles son producidos por microorganismos. Estos incluyen trimetilamina (TMA), compuestos sulfurosos volátiles, aldehídos, cetonas, ésteres, hipoxantina, así como también otros compuestos de bajo peso molecular (Huss H., 1998).

Los sustratos para la producción de volátiles son los carbohidratos (la lactosa 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 (Huss H., 1998).

Reducción del Oxido de Trimetilamina (OTMA)

Es típico de muchos microorganismos específicos del deterioro del pescado emplear el OTMA como aceptor terminal de electrones durante la respiración anaeróbica. El componente reducido, la TMA; uno de los compuestos dominantes del pescado deteriorado, tiene el olor típico del pescado (cuadro 7), (Huss H., 1998).

La reducción del OTMA está generalmente asociada con géneros de microorganismos típicos del ambiente marino (*Alteromonas*, *Photobacterium*, *Vibrio* y *S. putrefaciens*), pero también es llevada a cabo por *Aeromonas* y microorganismos intestinales de las *Enterobacteriáceas* (cuadro 7), (Huss H., 1998).

El OTMA es un compuesto típico de los peces marinos, y Anthoni sugirió recientemente que también algunos peces de agua dulce contienen altas cantidades de OTMA (Huss H., 1998).

En muchas especies de pescado el desarrollo de la TMA es paralelo a la producción de hipoxantina. La hipoxantina, puede ser formada por la descomposición autolítica de nucleótidos, pero también puede ser formada por microorganismos; la tasa de formación por la acción de microorganismos es mayor que por autólisis.

Algunos microorganismos del deterioro producen hipoxantina a partir de inosina o de inosina monofosfato, incluyendo a las *Pseudomonas* spp., *S. putrefaciens*, *P. phosphorum*.

En algunas especies hasta que ocurre el deterioro, la TMA constituye la mayor parte de las denominadas bases volátiles totales; BNVT (también conocidas como nitrógeno volátil total, NVT). 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. En las primeras semanas del almacenamiento en hielo también se forma un poco de amoníaco debido a la autólisis. En algunos pescados que no contienen OTMA, o en los cuales el deterioro es debido a una microflora no reductora de OTMA, se observa un leve incremento en las BVT durante el almacenamiento, probablemente como resultado de la desaminación de aminoácidos.

Stenstroem y Molin en 1990, estudiaron que los compuestos sulfurados volátiles son componentes típicos del pescado deteriorado y la mayoría de los microorganismos identificados como microorganismos específicos del deterioro

producen uno o algunos sulfuros volátiles. *S putrefaciens* y algunas *Vibrionaceae* producen H₂S a partir del aminoácido sulfurado 1-cisteína (Huss H., 1998).

Por el contrario, ni *Pseudomonas* o *P. phosphoreum* producen cantidades significativas de H₂S. 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. El metilmercaptano (CH₃SH) y el dimetilsulfuro ((CH₃)₂S) son formados a partir del otro aminoácido sulfurado, la metionina. La taurina, que también contiene sulfuro, se presenta como aminoácido libre en muy altas concentraciones en el músculo del pescado. Los compuestos sulfurados volátiles tienen un olor muy desagradable y pueden ser detectados hasta en niveles de ppb, incluso estas mínimas cantidades tienen un efecto considerable en la calidad (Cuadro 8 y 9).

Ringo (1984), demostró que la cisteína es utilizada como sustrato en el ciclo de Krebs cuando los electrones son transferidos al OTMA, de este modo la formación de ácido sulfhídrico (H₂S) y TMA son hasta cierto punto reacciones vinculadas (Huss H., 1998).

Cuadro 8: Compuestos típicos del deterioro, producidos durante el deterioro del pescado fresco almacenado aeróbicamente, empacado en hielo y a temperatura ambiente

Microorganismo específico del deterioro	del	Compuesto típico del deterioro
<i>Shewanella putrefaciens</i>		TMA, H ₂ S, CH ₃ SH, (CH ₃) ₂ S y Hx
<i>Photobacterium phosphoreum</i>		TMA, Hx
<i>Pseudomonas</i> spp.		Cetonas, aldehídos, ésteres, sulfuros no H ₂ S
<i>Aeromonadaceae</i>	antes	TMA, H ₂ S
<i>Vibrionaceae</i>		
Anaeróbicos deteriorativos		NH ₃ , ácidos: acético, butírico y propiónico
<i>Vibrionaceae</i> (<i>Plesiomonas</i> s.)		

(Huss H., 1998)

Según se mencionó anteriormente, el nivel de las BVT continúa incrementando incluso después que la TMA ha alcanzado su máximo. Lo anterior es debido a la proteólisis que se inicia cuando algunos de los aminoácidos libres han sido utilizados.

En un estudio realizado por Lerke separaron el extracto de pescado en fracciones proteicas y no proteicas, e inocularon microorganismos del deterioro en cada fracción y en el extracto total. La fracción no proteica del extracto de pescado se deterioró como todo el extracto, mientras que en la fracción proteica del extracto sólo se detectaron leves olores desagradables.

Aunque, algunos autores han empleado el número de microorganismos proteolíticos como un indicador del deterioro, se debe concluir que el volumen de la fracción proteica es de menor importancia en el deterioro del pescado fresco (Huss H., 1998).

Cuadro 9: Sustratos y compuestos, de olores y sabores desagradables, producidos por las bacterias durante el deterioro del pescado.

Sustrato	Compuestos producidos por la acción de los microorganismos
OTMA	TMA
Cisteína	H ₂ S
Metionina	CH ₃ SH, (CH ₃) ₂ S
Carbohidratos y lactato	acetato, CO ₂ , H ₂ O
Inosina, IMP	Hipoxantina
Aminoácidos (glicina, serina, leucina)	ésteres, cetonas, aldehídos
Aminoácidos, urea	NH ₃

(Huss H., 1998)

Durante el almacenamiento en hielo del pescado graso fresco, los cambios en la fracción lipídica son causados casi exclusivamente por la acción química, por ejemplo la oxidación, por cuanto el ataque bacteriano en la fracción lipídica contribuye muy poco al perfil de deterioro.

Efecto de la temperatura de almacenamiento en el deterioro del pescado

Se conoce que tanto la actividad enzimática como la microbiológica están altamente influenciadas por la temperatura. Sin embargo, en el rango de temperatura de 0 a 25 °C, la actividad microbiológica es relativamente más importante, y los cambios en la temperatura tienen mayor impacto en el crecimiento microbiológico que en la actividad enzimática (Huss H., 1998).

Muchos microorganismos son incapaces de crecer a temperaturas por debajo de 10 °C. Incluso los microorganismos psicrótrofos crecen muy despacio y en algunos casos presentan prolongadas fases de demora a medida que la temperatura se acerca a 0 °C, temperatura en cual la tasa de crecimiento es más o menos un décimo de la tasa a la temperatura óptima de crecimiento.

La actividad microbiológica es responsable del deterioro de la mayoría de los productos pesqueros frescos, por lo tanto su duración se extiende marcadamente cuando son almacenados a bajas temperaturas (Huss H., 1998).

La microflora responsable del deterioro del pescado fresco cambia con las modificaciones en la temperatura de almacenamiento. A bajas temperaturas (0-5°C), *Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum*, *Aeromonas* spp y *Pseudomonas* spp. causan deterioro. Sin embargo, a altas temperaturas de almacenamiento (15-30°C) diferentes especies de *Vibrionáceas*, *Enterobacteriáceas* y organismos grampositivos son responsables del deterioro (Huss H., 1998).

Efecto de la especie de pescado

La piel de los peces pelágicos grasos generalmente es muy delgada y esto puede contribuir a aumentar la velocidad de su deterioro. Esto permite que las enzimas y los microorganismos penetren más rápidamente. Por el contrario, la piel gruesa y los compuestos antibacterianos encontrados en el mucus de los peces planos, pueden también contribuir a su duración. Según fue descrito anteriormente, el mucus de los peces planos contiene enzimas bacteriológicas, anticuerpos y algunas otras sustancias antibacterianas. A pesar de las grandes diferencias existentes en el contenido de OTMA, esto no pareciera afectar la duración del pescado almacenado aeróbicamente tanto como el perfil de deterioro químico de las especies (Huss H., 1998).

Cuadro 10. Factores intrínsecos que afectan la velocidad de deterioro de especies de pescado almacenadas en hielo

Factores que afectan la velocidad de deterioro	Velocidad relativa de deterioro	
	rápida	lenta
tamaño	pescado pequeño	pescado grande
pH <i>post mortem</i>	pH alto	pH bajo
contenido de grasa	especies grasas	especies magras
propiedades de la piel	piel delgada	piel gruesa

(Huss H., 1998)

En general, el lento deterioro de algunas especies de pescado ha sido atribuido al lento crecimiento microbiológico; Liston, indicó que "la velocidad de deterioro parece estar relacionada, al menos parcialmente, con la velocidad de incremento de los microorganismos presentes (Huss H., 1998).

Microorganismos patógenos e inocuidad del producto

La higiene de los alimentos comprende las condiciones y medidas necesarias para la producción, elaboración, almacenamiento y distribución de los alimentos, destinadas a garantizar un producto inocuo, en buen estado y comestible, apto para el consumo humano. Se busca alcanzar, alimentos libres de contaminantes, tanto microbiológicos, químicos o físicos con el objetivo de que no representen riesgos para la salud del consumidor (Organización Panamericana de la Salud, 2002).

Las enfermedades de transmisión alimentaria (ETAs) asociadas al consumo de pescado, constituyen en la actualidad un grave problema sanitario a nivel mundial, ya que la aparición de patologías gastrointestinales se ha hecho cada vez más frecuente, quizás originada directamente por microorganismos presentes en especies de peces dulceacuícolas (Huss H., 1998)

Según el Sistema de Información Regional de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (SIRVETA), coordinadas por el Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (INPPAZ) de la Organización Panamericana de la Salud (OPS / OMS), y teniendo en cuenta los “subregistros”, se produjeron en los países de América Latina, 6930 brotes Etas entre 1993 y 2002. De ellos, un 17,8% se debieron a pescado (Lima dos Santos C. A., 2012).

En el caso del pescado, entre las enfermedades causadas por bacterias patógenas predominaron la salmonelosis (23 brotes, 779 casos) (Lima dos Santos C. A., 2012).

Los datos sobre los brotes transmitidos por ETAs del consumo de pescado en los países del Cono Sur, muestran la ausencia de incidentes causados por bacterias patógenas en Argentina y en Uruguay, donde no se ha descrito ningún caso durante el periodo 1980-2008 (Lima dos Santos C. A., 2012).

Bean y Griffin (1990), entre 1973 y 1987 en Estados Unidos comunicaron en total 7.458 brotes de enfermedades transmitidas por alimentos que supusieron 237.545 casos (sólo en 3.699 brotes (50%) se identificó un alimento como agente específico. De estas partidas de alimentos el pescado fue el alimento que con más frecuencia se identificó con la enfermedad.

En Holanda (1980–1981) Beckers (1986) y col., registraron que el 8,7 % de todos los brotes había sido transmitido por pescados. No obstante, Turnbull y Gilbert (1982) señalaron que no se identifican frecuentemente los alimentos específicos en los incidentes de intoxicación alimentaria, pero en los casos identificados, el pescado y los mariscos estaban involucrados en menos del 3 por ciento de todos los brotes generales registrados en Gran Bretaña (Huss H., 1998).

Se ha estimado que solo el uno por ciento de los casos reales de Etas son comunicados o denunciados a los organismos oficiales por falta de regulación de las denuncias. Esta situación sumada a la falta de alimento que origino el brote para su análisis, determina un subjetivo diagnostico del agente etiológico causante de la enfermedad. Por lo tanto podemos decir que los números citados anteriormente solo se presentan para identificar tendencias y áreas de interés (Huss H., 1998).

Los brotes ocurridos en febrero del 2001 están bien documentados en Europa. En Noruega y Suecia se notificaron 60 casos, aislándose *Salmonella livingstone* a partir de productos derivados del pescado (P.J.Guerin y col., 2004).

Algunos de los microorganismos patógenos transmitidos por el pescado son considerados autóctonos y no autóctonos. Las especies como *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides* y *Listeria monocytogenes* se las consideran dentro del grupo autóctono; ya que son comunes y están ampliamente distribuidas en los medios acuáticos de diferentes lugares del mundo. La temperatura del agua tiene claramente un efecto selectivo. *Salmonella spp.* y *E.coli* están dentro del grupo no autóctono (Huss H., 1997).

En relación a *Listeria spp.* cada vez se acepta más que los alimentos contaminados son un vehículo importante de la especie *L. monocytogenes*. Los aislamientos frecuentes a partir del pescado y la demostración en diferentes trabajos del potencial de proliferación por ejemplo en salmón ahumado almacenado en frío son pruebas de que el pescado puede ser importante en la transmisión de *Listeria monocytogenes* (Huss, H., 1997).

Gonzales M.N y col. (2002), durante su estudio detectaron la presencia *Listeria innocua* y *monocytogenes* en filetes de Trucha arco iris y en porciones de Salmon, en este trabajo también evidenciaron el aumento exponencial de ufc/g de *Aeromonas spp.* hasta su deterioro. Las *Aeromonas* identificadas en este trabajo fueron *A. caviae*, *A. veronii*, *A hydrophila*, *A eucrenophila*.

En un trabajo realizado por Morales G., y col (2004) se evaluó la microflora normal y patógena asociada a la Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Los resultados obtenidos confirmaron que desde el punto de vista microbiológico, los niveles de coliformes encontrados fueron inaceptables para el consumo humano. No se logró aislar *Listeria spp.*, pero el aislamiento de *Salmonella spp.* confirmó la contaminación fecal de las aguas donde se cría la tilapia, aparte de su importancia a nivel de salud pública. También encontraron que la tilapia presentaba un número elevado de *Aeromonas spp.* como parte de su microflora normal.

Youssef, H., y col. (1992) también estudiaron la presencia de patógenos en Tilapia (*Oreochromis niloticus*), y determinaron la presencia de 11,9% de patógenos intestinales, correspondiendo 7,9% a *E.coli* y 3,9% a especies de *Salmonella*.

En la mayor parte de la bibliografía se indica que el pescado es un vehículo mucho menos común, respecto a *Salmonella*, que otros alimentos, y que el pescado es vehículo de tan sólo una pequeña proporción del número total de casos de *Salmonella* descritos en los Estados Unidos y en otros países (Ahmed, 1991).

La mayoría de los langostinos y los camarones se cocinan antes de su consumo y, por lo tanto, estos productos representan riesgos mínimos para la salud del consumidor, excepto por contaminación cruzada post-elaboración en cocinas. Esto se deduce de las pruebas epidemiológicas presentadas por Ahmed (1991), en un artículo sobre siete brotes de salmonelosis transmitida por pescado en los Estados Unidos en el período 1978–1987. Tres de estos brotes se debieron a pescado contaminado, de los cuales, dos brotes se debieron al consumo de ostras crudas recogidas en aguas contaminadas por aguas residuales (Huss, H., 1997).

El centro de control y prevención de enfermedades de EEUU (CDC) hasta octubre del 2005 reportaba 29.886 casos de salmonelosis. Según Heinritz y col. (2000) el porcentaje de casos asociados al consumo de pescados o mariscos representó solo 8 de 160 brotes correspondiendo a 7,42% del total de casos.

La FDA (*Food and Drug Administration*), presento un estudio para el periodo 1990 al 1998 donde la incidencia de *Salmonella spp.* fue de 1,3% para productos autóctonos y 12,2% para importados, siendo estos últimos los que presentaron una mayor incidencia en EEUU (Henitz, 2000).

Con relación a la baja presencia de *Salmonella* en pescados frescos obtenidos de aguas sanitariamente limpias, Herrera, F.C y col en el 2006 tampoco lograron aislar *Salmonella* spp. a partir de muestras de pescado de origen marino en la localidad de Leon, España. Se describe en este trabajo que en 1997 el 6% de las cepas de *Salmonella* serotipificadas por el laboratorio de referencia nacional de *Salmonella* fueron de pescados y mariscos, y cinco años más tarde esta cifra fue del 15,7%. Con respecto a *Listeria monocytogenes* presentaron una prevalencia del 10% siendo este resultado comparable a la incidencia del 4 a 12% en pescados, mariscos y productos del mar de las zonas templadas según lo informado por Ben Embarek en 1994 (Herrera, F.C y col, 2006)

García J. A. y col., (2003), realizaron estudios similares con el objetivo de caracterizar la calidad microbiológica del cultivo de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (200 muestras de peces) y del agua de producción (260 muestras) de la misma, se muestrearon en invierno y verano. Se determinaron de la superficie de los pescados y del agua: mesófilos aerobios, *Salmonella* spp., Coliformes totales y fecales, además de la temperatura y el oxígeno. Los resultados encontrados indicaron que en la trucha sólo existió diferencias entre época ($P < 0.05$) para mesófilos aerobios (398.11 ufc/mL en invierno y 489.45 ufc/mL en verano), y no aislaron *Salmonella* spp.

En otros trabajos cuyo objetivo fue realizar el estudio e identificación de los géneros de microorganismos presentes en lesiones externas de bagre; se encontró que en 35 de los 100 ejemplares utilizados para el estudio se aislaron e identificaron 11 géneros de microorganismos diferentes, identificados como patógenas para los peces: entre ellas, *Plesiomonas shigelloides* en 15%, y *Aeromonas* spp. en un 6% (Shama S. y col. 2000).

Herrera Arias F., y col (2005) en su estudio encontraron una alta prevalencia del *Salmonella* spp. y una incidencia del 12% ,en pescado fresco expedido en la ciudad de Pamplona. Esta prevalencia fue similar para muestras de lugares de expendio formalmente instalados como para los locales informales, siendo el lugar de procedencia el parámetro más importante a considerar.

Los miembros del género *Aeromonas* spp. identificados como microorganismos deteriorantes del pescado, son habitantes de los ecosistemas acuáticos y desempeñan un papel importante como patógeno primario en el tracto gastrointestinal. Han sido reconocidos por la Agencia de Protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos de Norteamérica como patógenos emergentes y la Organización Mundial de la Salud los considera como microorganismos de Riesgo II (OMS, 2005).

Definiendo agentes del grupo de riesgo II como agentes de moderado riesgo individual y riesgo comunitario limitado (Requieren nivel de contención 2).

Este grupo incluye patógenos que pueden causar enfermedades a humanos o animales, pero bajo circunstancias normales no producen riesgos serios a trabajadores de laboratorio, la comunidad, los recursos naturales o el medioambiente. Las exposiciones de laboratorio rara vez conducen a infecciones que produzcan enfermedades serias. Existen tratamientos efectivos, medidas preventivas y el riesgo de dispersión en la comunidad es bajo (OMS, 2005).

Las especies patógenas de *Aeromonas* con mayor implicación clínica en casos de diarreas son: *A. hydrophila*, *A. veronii* biovar *sobria*, *A. caviae* y, en menor proporción, *A. veronii* biovar *veronii*, *A. jandae* y *A. schubertii*. Algunas de estas especies han estado asociadas con la presencia de enterotoxinas, citotoxinas y con marcadores fenotípicos específicos relacionados con la enfermedad gastrointestinal en el hombre (Bravo L. y col., 2012)

Actualmente Herrera Arias F. y col. (2012) demostraron que la frecuencia de los factores de virulencia en las cepas de *Aeromonas* estudiadas fueron en el 87% de los casos producción de nucleasas; el 83% fueron β -hemolíticas sobre eritrocitos humanos; el 68% expresaron producción de lipasas, el 63% fueron proteolíticas y el 53% resultaron ser hemolíticas sobre eritrocitos de cordero, indicando estos datos el posible potencial patogénico de las cepas. Estos resultados mostraron que el pescado comercializado donde se aislaron las cepas, puede ser una fuente importante de especies de *Aeromonas* que expresan factores asociados a la virulencia para el hombre (Herrera A., 2012).

En un estudio acerca de la prevalencia de *Aeromonas spp.*, en Siluros (*Ictalurus punctatus*), se analizaron muestras de la canal recogidas de tres plantas de procesado y se determina que *A. hydrophila* como *A. sobria* representaron el 36% de las cepas aisladas mientras que el 11% fueron *A. caviae* (James M. Jay, 2009).

Otra de las especie ampliamente distribuida en especies de agua dulce corresponde a *Plesiomonas shigelloides*. Esta especie es un bacilo gramnegativo también asociado a la microflora deteriorante, anaerobio facultativo, móvil, perteneciente a la familia de las *Vibrionaceae*. No forma parte de la microflora normal del humano, mientras que los peces dulceacuícolas como las tilapias se tienen como su reservorio primario. Recientes análisis filogenéticos y perfiles antigénicos indican que existe una relación estrecha entre *P. shigelloides* y miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, familia en la cual ha sido ubicada taxonómicamente desde el año 2001. *P. shigelloides* es la única especie del género.

Este patógeno ha sido aislado de heces de pacientes con gastroenteritis relacionadas con el consumo de ostras y pescado crudo o mal cocido, y ha sido asociado a diarreas espontáneas e infecciones extra intestinales de elevada mortalidad, tales como septicemias y meningitis del recién nacido. Aún no han sido totalmente esclarecidos sus mecanismos de patogenia, atribuyéndosele en parte a la invasividad, enterotoxigenicidad y asociación a plásmidos, (Moreno M., 2006).

ESTUDIO DEL ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

Control microbiológico tradicional

Tradicionalmente los organismos de contralor oficial y la industria alimentaria han utilizado tres métodos principales para el control de los microorganismos en los alimentos según enumera la Comisión Internacional sobre Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos ICMSF en el año 1988. Estos son: (a) educación y formación, (b) inspección de las instalaciones y actividades y (c) ensayos microbiológicos. Estos programas se han dirigido hacia el desarrollo del conocimiento de las causas y consecuencias de la contaminación microbiana, y a la evaluación de las instalaciones, procedimientos y cumplimiento de las buenas prácticas de manipulación.

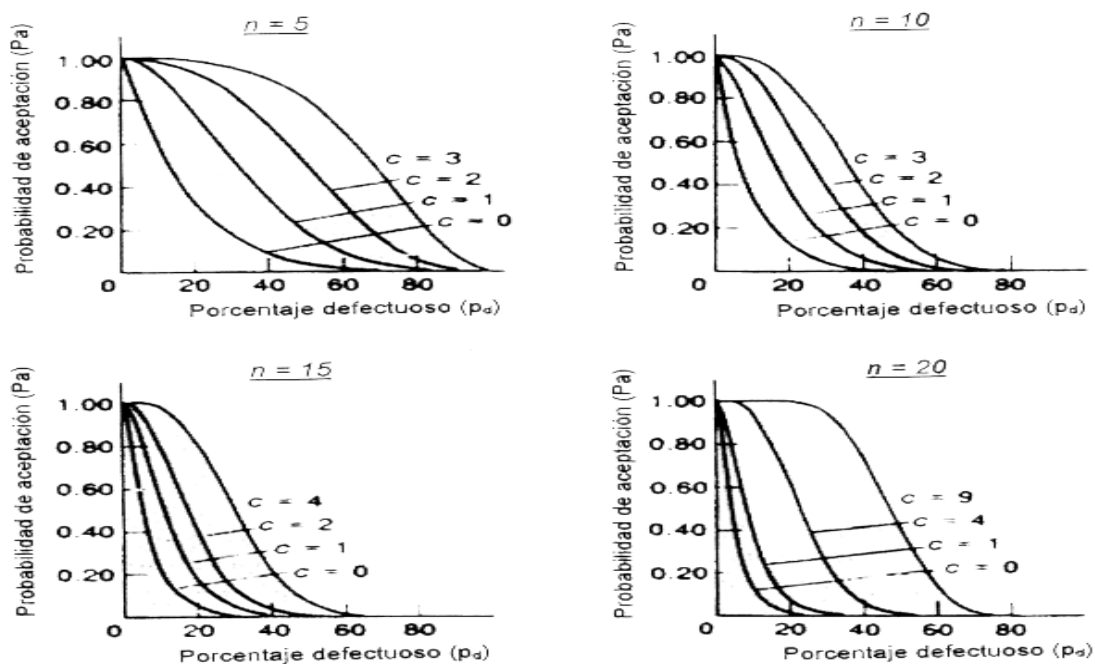


Figura 8. Curvas características operativas para diferentes tamaños de muestra (n) y diferentes criterios de aceptación (c), para un plan de atributos de 2 clases (ICMSF 1986). (Huss H., 1997)

Muestreo y ensayos microbiológicos del pescado fresco

Para aumentar la importancia del muestreo y de los ensayos microbiológicos, la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos (ICMSF) ha introducido el concepto de relacionar la rigurosidad del plan de muestreo con el nivel de riesgo del alimento (figura 8) (ICMSF 1986).

El riesgo puede variar desde una condición de no riesgo para la salud humana pero sólo de utilidad, pasando por un riesgo indirecto para la salud de nivel bajo a moderado, hasta un riesgo directo grave para la salud.

En caso de riesgos moderados o graves, se utiliza normalmente un plan de muestreo de atributos de 2 clases. Cuando el riesgo para la salud es bajo y en aplicación de las directrices microbiológicas, se sugiere un plan de 3 clases.

Un plan típico de 2 clases con $n = 5$ y $c = 0$ precisa que se ensayen 5 unidades de muestra, y el lote debería rechazarse si una de las 5 unidades de muestra es inaceptable.

En algunos casos la presencia de un microorganismo (p. ej. *Salmonella*) será inaceptable. En el plan de muestreo de 2 clases se rechaza un "lote" si más de "c" de "n" muestras ensayadas son inaceptables.

En un plan de muestreo de 3 clases, "m" separa recuentos aceptables de recuentos marginalmente aceptables, y otra cifra "M" indica el límite entre los recuentos marginalmente aceptables y los recuentos inaceptables (Huss H., 1998).

Condiciones de inocuidad, límites microbiológicos y químicos establecidos en las siguientes referencias:

Criterios microbiológicos para pescado fresco y listo para consumo

Referencias Nacionales:

- a. Reglamento Bromatológico Nacional (Uruguay, decreto 315/94).

Referencias regionales e Internacionales:

- b. ICMSF (Cuadro 11)
- c. Normativa Unión Europea (UE); (Cuadro 12)
- d. Normativa Mercosur;
- e. Agencia de Inspección Canadiense de Alimentos (CFIA, 2011); (Cuadro 13)

- a. Reglamento Bromatológico Nacional (Uruguay, decreto 315/94).

Establece como límite aceptable un recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales igual a 1.0×10^6 ufc/gramo de de músculo para pescado fresco, y ausencia de microorganismos patógenos.

- b. Comisión Internacional sobre Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos (ICMSF), (Cuadro 11).

En el siguiente cuadro se presenta los criterios establecidos por la ICMSF.

Cuadro 11: Plan de muestreo y límites microbiológicos en unidades formadoras de colonias (ufc) para pescado fresco y congelado establecido por la ICMSF

Productos	Ensayo	Clase de Plan	n	c	ufc/Límite por gramo o por cm^2	
					m	M
Pescado fresco y congelado;	APC (Aerobic Plate Count)	3	5	3	5×10^5	10^7

(Huss H., 1997)

c. Unión Europea

Otras referencias como la Directiva del Consejo de la Unión Europea UE 91/493/CEE (EEC 1991b) establece las condiciones sanitarias para la producción y la puesta en el mercado de los productos pesqueros.

En el cuadro 11 se proporcionan las disposiciones para establecer criterios de calidad para análisis microbiológicos, incluidos los planes de muestreo.

Cuadro 12: Criterios y planes de muestreo para microorganismos, establecidos en la norma de la UE91/493/CEE para carne de pescado cocidos listos para el consumo

Microorganismo	n	c	m	M	Criterios de acción
<i>Salmonella</i> spp.	5	0			Rechazar si c=1
Coliformes fecales	5	2	10	100	Rechazar si 3 o más unidades exceden m, o si cualquier unidad supera M
<i>E. coli</i>	5	1	10	100	Rechazar si 2 o más unidades exceden m, o si cualquier unidad supera M
Recuento de aerobios totales en ufc/g	5	2	1,0x10 ⁴	1,0x10 ⁵	Rechazar si 2 o más unidades exceden m, o si cualquier unidad supera M

(UE91/493/CEE)

d. Normativa Mercosur

La referencia del Mercosur /GMC/RES. N° 40/94, en el capítulo "Identidad y calidad de pescado fresco"; establece:

- Los pescados estarán exentos de microorganismos patógenos y parásitos que puedan representar peligro para la salud del consumidor.

e. Criterios de la CFIA

La Agencia de Inspección Canadiense de Alimentos (CFIA, 2011) mediante el Bacteriological Guidelines for Fish and Fish Products (Appendix 2), establece los criterios que se detallan en el siguiente cuadro 12.

Cuadro 13: Criterios microbiológicos establecidos en CFIA 2011, para *E.coli*, *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes*.

Microorganismos	Tipo de producto	n	C	m/g	M/g	Criterios de acción
<i>Escherichia coli</i>	Cocidos o listos para el consumo	5	1	4	40	Rechazar si 2 o más unidades exceden m, o si cualquier unidad supera M
<i>Escherichia coli</i>	Los demás tipos pescado	5	2	4	40	Rechazar si 3 o más unidades exceden m, o si cualquier unidad supera M
<i>Salmonella spp.</i>	Todos los tipos de pescado	5	Ausente en cada muestra de 25 g, o en grupos de muestras de 125 g.		-	Rechazar si se detecta <i>Salmonella spp</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Todos los tipos de pescado	5	Presencia/ausencia en 125g, o en 5 unidades de 25g		-	Rechazar si se detecta.

(CFIA, 2011)

La finalidad de los ensayos microbiológicos es detectar la presencia de microorganismos patógenos (*Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* y *E. coli*), así como estudiar los indicadores de contaminación fecal u otros tipos de contaminación general o de prácticas de elaboración deficientes (Coliformes fecales, recuento de aerobios en placa) en los alimentos (Huss H. 1997)

Indicadores de contaminación fecal en pescado

El grupo de Coliformes termotolerantes a 44,5°C (fecales) son microorganismos utilizados como indicadores de contaminación directa o indirecta de heces humanas y animales en el producto.

Su presencia en las aguas y alimentos indica posible presencia de contaminación por patógenos entéricos o enterobacterias como, *Salmonella spp.* Estos patógenos podrían estar presentes en los peces, en su tubo digestivo, tejido superficial, y branquias (Huss H. 1998).

Dentro del grupo de los Coliformes totales pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, existe un subgrupo que es el de los Coliformes fecales. Los Coliformes fecales son bacilos gramnegativos, aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados. De este grupo forman parte varios géneros:

Escherichia, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, etc. Se encuentran en el intestino del hombre y de los animales, pero también en otros ambientes como agua, suelo, plantas, cáscara de huevo y otros.

Son microorganismos que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas en 24-48 horas a temperaturas comprendidas entre 44 y 45°C en presencia de sales biliares. Los Coliformes fecales comprenden principalmente *Escherichia coli* y algunas cepas de *Enterobacter* y *Klebsiella* (Organización Internacional de Normalización, 1990).

Los Coliformes totales son las *Enterobacteriaceae* lactosa-positivas y constituyen un grupo de bacterias que se definen más por las pruebas usadas para su aislamiento que por criterios taxonómicos. y se caracterizan por su capacidad para fermentar la lactosa con producción de ácido y gas, más o menos rápidamente, en un periodo de 48 horas y con una temperatura de incubación comprendida entre 30-37°C (Organización Internacional de Normalización, 1990).

Estudio de las zonas de captura en el río Uruguay

El estudio se basa en los límites establecidos para parámetros físico químicos y microbiológicos en aguas clase 3 del el decreto nacional 253/79

Aguas clase 3, son las aguas destinadas a la preservación de los peces en general y de otros integrantes de la flora y fauna hídrica, o también aguas destinadas al riego de cultivos cuyo producto no se consume en forma natural o en aquellos casos que siendo consumidos en forma natural se apliquen sistemas de riego que no provocan el mojado del producto (Uruguay, 1979).

OBJETIVOS

General

- Estudiar los microorganismos específicos del deterioro (MED) en superficie de la piel y cavidad abdominal durante el almacenamiento en refrigeración hasta su putrefacción, y determinar la presencia de microorganismos patógenos en especies de pescados dulceacuícolas de valor comercial del río Uruguay.

Específicos

- Valorar la presencia de microorganismos alterantes en superficie y cavidad abdominal de las especies en estudio durante el proceso de deterioro.
- Estudiar la presencia de *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes* en pescado eviscerado fresco crudo refrigerado.
- Determinar la calidad sanitaria del pescado procesado en forma artesanal mediante el estudio de los indicadores de contaminación fecal y el recuento de aerobios mesófilos totales.
- Determinar la influencia del medio ambiente de captura sobre la carga microbiológica de las especies en estudio.
- Dosar las bases nitrogenadas volátiles totales BNVT por método de Conway modificado en músculo.
- Evaluar los cambios sensoriales en el pescado fresco crudo según planilla y cartillas fotográficas.
- Determinar la influencia del pH muscular y de la temperatura de almacenamiento en el desarrollo de los MED

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de campo estuvo comprendido entre dos zonas de captura del río Uruguay, Las Cañas y Nuevo Berlín. Parte del trabajo práctico se desarrolló en una planta de acopio (Acopio Río Uruguay), localizada en la ruta Puente Puerto de la ciudad de Fray Bentos. El trabajo de laboratorio se realizó en el Instituto de Investigaciones Pesqueras “Prof. Dr. Victor H. Bertullo” (IIP), Facultad de Veterinaria, ubicado en Tomas Basáñez 1160, Montevideo; y en el Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) de la ciudad de Fray Bentos, ubicado en el ex Frigorífico Anglo, Parque Industrial Barrio Anglo.

Para el análisis microbiológico del pescado se utilizó un plan de muestreo basado en las curvas características operativas para diferentes tamaños de muestra (n) y diferentes criterios de aceptación (c), en un plan de atributos de 2 y 3 clases (ICSMF 1986).

Se utilizó un total de catorce ejemplares (n=14) capturados en el río Uruguay. Dichos ejemplares pertenecen a las especies *Leporinus obtusidens* (Boga) y *Prochilodus lineatus* (Sábalo). Los mismos fueron eviscerados en forma artesanal y lavados con agua de río. Sin sufrir ningún tratamiento en planta, se acondicionaron en bandejas plásticas recubriéndolos con hielo y almacenándolos por doce días en cámara de frío.

Estadísticamente el trabajo incluyó análisis de varianza (ANOVA) mediante el uso de planillas de Microsoft office Excel 2007 (James N. Miller, 2009).

DESARROLLO DEL TRABAJO EN CAMPO Y EN LABORATORIO

Día cero

- Recepción en planta del lote de pescados capturados
- Identificación de las especies
- Numeración de los diferentes ejemplares
- Pesaje de los ejemplares
- Evaluación sensorial de los ejemplares recién llegado a planta
- Acondicionamiento por especie de los ejemplares en cajas de plástico con hielo
- Almacenamiento en cámara para su posterior estudio
- Recepción en laboratorio de muestras de agua del Río Uruguay
- Recepción del registro de parámetros físicos químicos tomados *in situ* en los puntos de captura del río correspondientes al lote recepcionado.

Día uno, tres, seis y doce

- Evaluación sensorial y observaciones pertinentes de los ejemplares
- Registro en planillas de campo del pH y temperatura muscular de los pescados
- Toma de muestra de músculo, piel y cavidad abdominal en forma aséptica y en bolsas estériles
- Identificación de las muestras
- Acondicionamiento de las muestras en conservadora con hielo
- Acondicionamiento de los ejemplares en las cajas plásticas con hielo, hasta próximo muestreo
- Transporte de las muestras al laboratorio
- Análisis de laboratorio (LATU, IIP).

TRABAJO EN CAMPO

Estudio de las zonas de captura

La zona de captura correspondió al tramo del río Uruguay comprendido entre Nuevo Berlín (NB) y balneario Las Cañas (LC)

El estudio de los parámetros de calidad del agua del río se basó en la reglamentación establecida en el Decreto Nacional 253/79 (Uruguay, 2012).

Descripción de las zonas de captura y puntos de muestreo del Río Uruguay

Como se muestra en la figura 9 de acuerdo a la división de zonas pesqueras artesanales del territorio nacional realizadas por DINARA, la zonas correspondientes al estudio son las denominadas B y C (Uruguay, 2010).

Descripción de las zonas B y C:

B. Desde 1000 metros al Sur de la Represa de Salto Grande, hasta el Puerto de Fray Bentos. Incluye los afluentes del Río Uruguay en el tramo (Uruguay, 2010).

C. Desde Fray Bentos hasta el paralelo de Punta Gorda. Incluye los afluentes del Río Uruguay en el tramo (Uruguay, 2010).

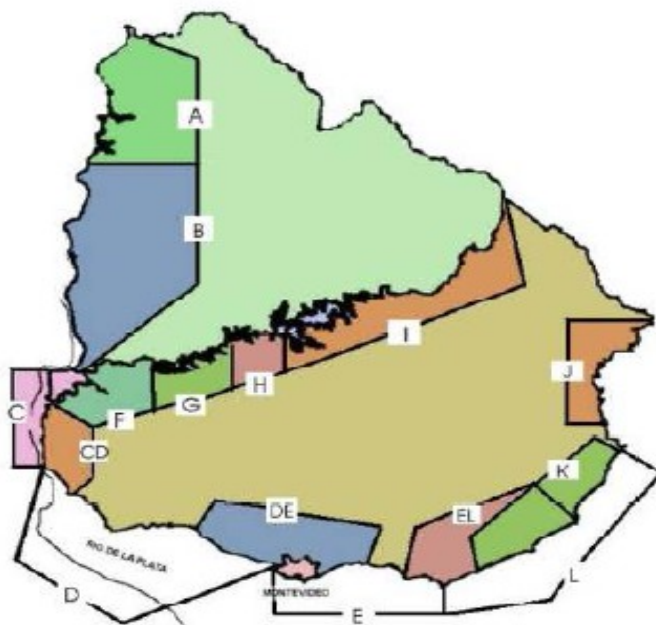


Figura 9: Zonas asignadas para pescadores artesanales.

Uruguay, 2010

Puntos de muestreo del Río Uruguay

Los puntos de muestreo utilizados entre Las Cañas y Nuevo Berlín, se indican en las figuras 10 y 11. A su vez, se señala la ubicación de la planta de acopio (en rojo) en la que se desarrolló el trabajo práctico.

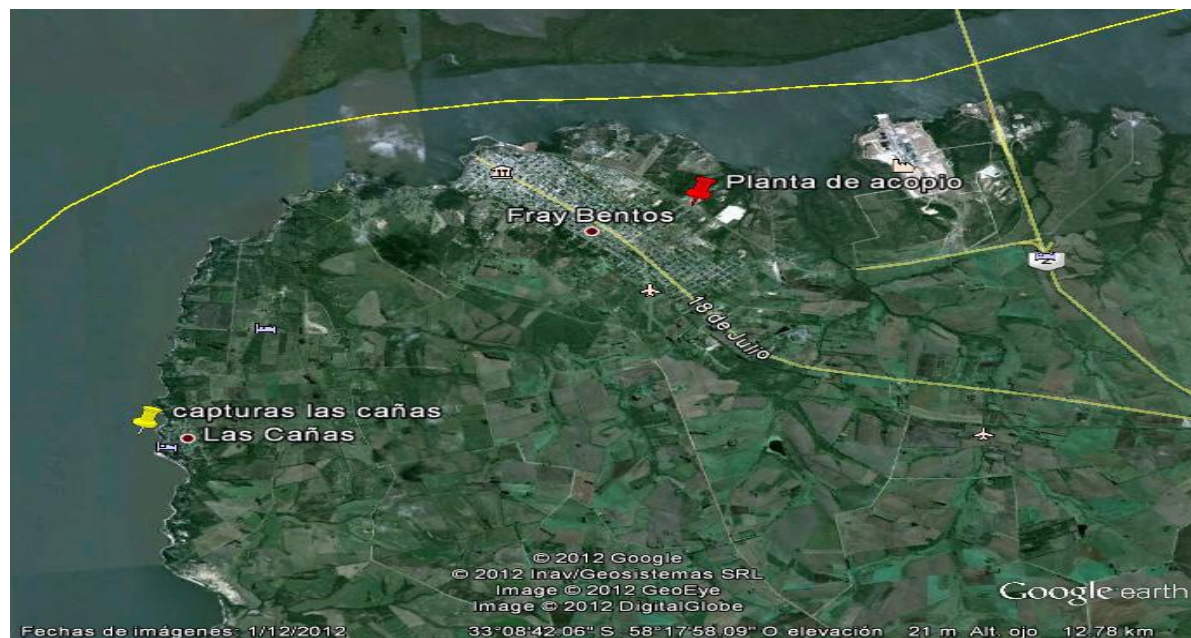


Figura 10: Punto de muestreo y zona de captura correspondiente a Las Cañas; y ubicación de la planta de acopio.

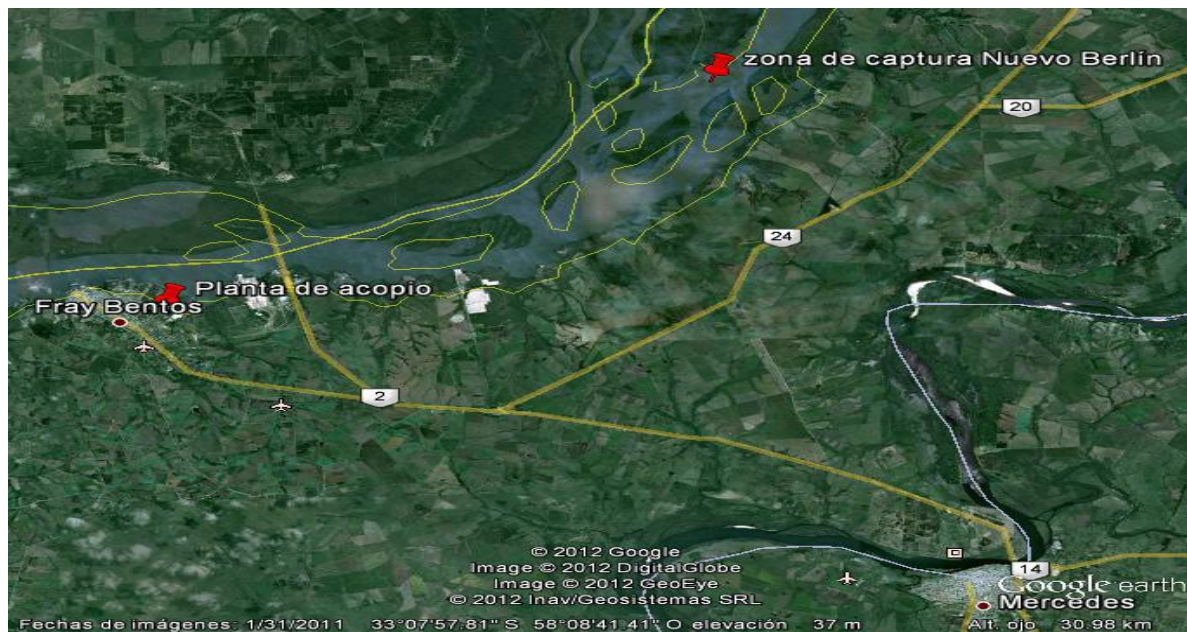


Figura 11: Punto de muestreo y zona de captura cercana a Nuevo Berlín; y planta de acopio.

Muestreo de agua para análisis microbiológicos de las zonas de captura

Se colectaron muestras de agua de río superficiales, en cinco puntos de las zonas de NB-LC. Dichas muestras se utilizaron para determinar el grado de calidad según indicadores microbiológicos y compararlos con los límites establecidos en el decreto Nacional 253/79, para aguas clase 3.

El muestreo de agua para análisis microbiológico se basó en APHA *“Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater”* Part 9060 A– 21st Edition, 2005.

Se tomaron cinco muestras de la zona NB-LC en frascos nalgene estériles de 125ml, a 30cm de la superficie.

Estas muestras llegaron rotuladas y refrigeradas en conservadoras al LATU, donde fueron analizadas.

Mediciones de parámetros físicos y químicos del agua de río en las zonas de captura

Coincidiendo con la fecha de captura se realizaron mediciones de temperatura, pH, oxígeno disuelto y conductividad en cinco puntos de muestreo del río Uruguay entre NB y LC. Estos puntos coincidieron con los de muestreo de agua superficial para los análisis microbiológicos descritos en el punto anterior.

Estas mediciones fueron tomadas *in situ* con sonda multiparámetro calibrada y verificada. Las mismas se basaron en *U.S. Geological Survey, variously dated, National field manual for the collection of water-quality data. U.S. Florida Department of Environmental Protection. ASTM Standard D6771-02 (2005).*

Parámetros medidos:

Temperatura: procedimiento utilizado para medir temperatura en aguas superficiales y aguas subterráneas en el rango de 0 a 40°C. La medición de la temperatura del agua en el sitio de campo es esencial para los estudios de calidad del agua. Las determinaciones de concentración de oxígeno disuelto, conductividad, pH, reacciones químicas, actividades biológicas se basan en una medición exacta de la temperatura.

Potencial de Hidrogeno (pH): el procedimiento utilizado aplica a medidas de pH entre 4 y 10, rango que, salvo raras excepciones, cubre valores usuales en aguas naturales. El pH del agua es un parámetro crítico en el control de la contaminación.

Conductividad: el método usado aplica a medidas de conductividad de entre 25 y 50000 $\mu\text{S}/\text{cm}$. La conductancia eléctrica del agua es una función del tipo y cantidad de sustancias disueltas en el agua, por lo que frecuentemente se utiliza como medida sustitutiva de esto.

Concentración de oxígeno disuelto: los métodos de campo para determinar la concentración de oxígeno disuelto (OD) en aguas superficiales y subterráneas incluyeron el uso de sensores amperométricos y de sensores ópticos (o de luminiscencia).

El oxígeno disuelto es necesario en los sistemas acuáticos para la sobrevivencia y crecimientos de muchos organismos acuáticos y es utilizado como indicador del estado de los cuerpos de aguas superficiales.

Desembarque

Los desembarques se realizaron a unos 35 km por ruta de la planta acopiadora ubicada en la ciudad de Fray Bentos (figura 10 y 11).

Transporte

Los pescados fueron acondicionados en cajas plásticas recubiertos por hielo y transportados en camión con caja de isopaneles sin refrigeración.

Recepción y selección en planta para almacenamiento en cámara

Se seleccionaron e identificaron los ejemplares de las dos especies y se acondicionaron en cajas plásticas recubiertos por hielo, sin sufrir ningún tratamiento. Posteriormente fueron almacenados en cámara de refrigeración

Trabajo práctico en planta acopiadora

Evaluación sensorial

Se utilizaron cartillas y planillas generadas para tal fin en el trabajo de investigación de Pinnacchio, G. 2011 (anexos 1, 2, 3 y 4).

La evaluación se realizó en la propia planta de acopio los días 1, 3, 6 y 12 del estudio. Se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones para cada punto:

- a) Apariencia general: este atributo se evaluó a través de las características externas de la piel de ejemplar, presencia o ausencia de lesiones, moco, etc.
- b) Color: color general de ejemplar teniendo en cuenta las características individuales de cada especie, brillo, intensidad, definición de los colores
- c) Olor: general del ejemplar a nivel externo de la piel
- d) Ojos: forma, espacio ocupado en la cavidad, color, brillo, transparencia, definición
- e) Branquias: se evaluó color (intensidad, brillo), el olor y el moco (color,olor y apariencia) (H.H. Huss, 1998).

Muestreo de ejemplares

Los días 1, 3, 6 y 12 se tomaron muestras representativas de los catorce ejemplares. Se obtuvieron asépticamente 100g de muestra de la zona hipoaxial media, cavidad abdominal, superficie de piel y músculo, como se indica en la figura 12.

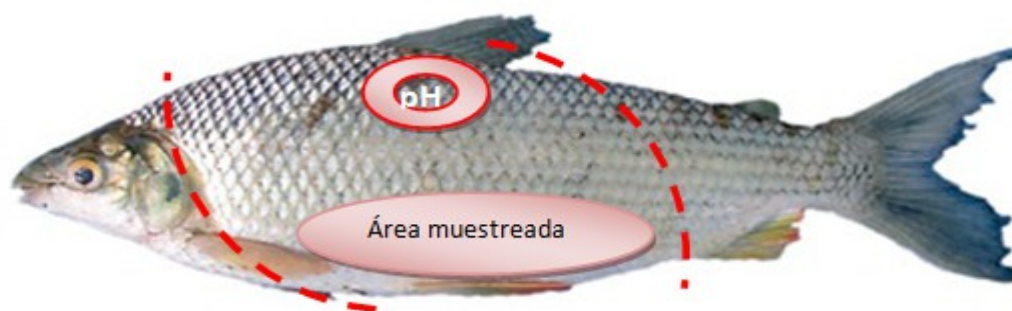


Figura 12: Pescado eviscerado dividido en zonas

Las muestras fueron colocadas en bolsas *Nasco Whirl-Pak* estériles, con precinto de seguridad, rotuladas y acondicionadas en conservadora con hielo para su posterior procesamiento en el laboratorio.

Al mismo tiempo se midió temperatura, con termómetro de penetración y pH del músculo de todos los ejemplares (figura12).

pH muscular

Como se detalla en la figura 12 con un círculo rojo se midió el pH muscular en la región epiaxial cercano a la columna vertebral de todos los ejemplares, los días 1, 3, 6 y 12 de almacenamiento refrigerado.

Las mediciones se realizaron con pHmetro portátil, colocando el electrodo directamente dentro de la carne. El punto de medición en el ejemplar se detalla en la figura 12, con un círculo en rojo. El pHmetro fue previamente calibrado en los rangos 4,00; 7,00 y 10,00 y verificado con un buffer de 6,00.

Temperatura muscular

Como se detalla en la figura 12 con un círculo rojo se midió la temperatura muscular en la región epiaxial cercano a la columna vertebral de todos los ejemplares, los días 1, 3, 6 y 12 de almacenamiento refrigerado. La temperatura del músculo se tomó como referencia para determinar la temperatura de crecimiento microbiológico durante el periodo de deterioro del pescado almacenado en refrigeración.

TRABAJO EN LABORATORIO

Se realizaron análisis químicos y microbiológicos en LATU Fray Bentos a las muestras de pescado con el objetivo de evaluar su frescura, su calidad higiénica sanitaria y su relación con el proceso de deterioro. A su vez, se realizaron análisis microbiológicos a las muestras de agua tomadas en los puntos de muestreo entre NB y LC, con el fin de evaluar la influencia de las condiciones ambientales del medio acuático sobre la calidad de los pescados.

Análisis químico

La selección de los ensayos y métodos a utilizar para determinar la frescura y el grado de deterioro del pescado se realizó en base a los criterios establecidos en la normativa Nacional.

El ensayo definido fue:

- Valoración de las Bases Nitrogenadas Volátiles Totales por el Método de Conway modificado.

Este análisis fue realizado a todos los ejemplares muestreados.

Análisis microbiológicos realizados al pescado y al agua del Río Uruguay

La selección de los ensayos a utilizar para determinar la calidad higiénica sanitaria del producto se realizó en base a los criterios establecidos en la normativa Nacional, del Mercosur, de la Unión Europea y a las directrices brindadas por la ICMSF y la CFIA.

Los ensayos microbiológicos realizados a todos los ejemplares, fueron los siguientes:

- Coliformes termotolerantes a 44,5°C (fecales) por NMP
- *E.coli* por NMP
- Recuento de aerobios mesófilos totales en PCA
- Recuento de aerobios Psicrotrofos en PCA
- Búsqueda de microorganismos patógenos (*Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*) en pool de 125g de muestra, por el método de PCR.

A su vez, para la determinación de microorganismos específicos del deterioro se realizaron los siguientes ensayos:

- Recuento de aerobios mesófilos totales en PCA
- Aislamiento e identificación de aerobios mesófilos

En este caso, para realizar estos ensayos se utilizó un único ejemplar.

Para determinar la calidad microbiológica de las aguas en las zonas de captura se definió utilizar:

- Coliformes termotolerantes a 44,5°C (fecales) por membrana filtrante en medio mFC
- Recuento de heterotróficos en agua en PCA

Análisis químico

Valoración de las bases nitrogenadas volátiles totales por el método de Conway modificado

La determinación de las BNVT se basó en el método de Conway y Byrne modificado según Bertullo (1970). Los análisis se realizaron a todos los ejemplares, en el Laboratorio de IIP y en LATU Fray Bentos.

Pasos de la medición:

- a) Se identifica matraz de vidrio con referencia de la muestra a ser ensayada.
- b) Se procede a pesar 25g de músculo de pescado en el matraz mediante balanza electrónica marca Sartorius calibrada anualmente verificada diariamente.
- c) Se miden 75cc de ácido tricloroacético al 5% y se colocan en *stomacher* o similar junto con la muestra de músculo.
- d) Se homogeniza la muestra en *stomacher* 400 sesenta segundos o el tiempo necesario para disminuir la partículas, obteniendo lo que se denomina un defecado.
- e) Con un filtro de papel *Whatman* nº1 colocado en el embudo de vidrio, se filtra el defecado obteniéndose un líquido límpido.
- f) Para cada muestra se preparan dos cámaras de microdifusión, se realiza por duplicado (repetibilidad del ensayo) y se disminuye el error de la técnica.
- g) En las cámaras de Conway se le agrega vaselina sólida en los bordes externos con varilla de vidrio permitiendo el sellado de la cámara. Se identifica la muestra en la tapa de vidrio.
- h) Se colocan con pipetas de vidrio 2cc de ácido bórico al 1% en la cámara interna, en la cámara externa se colocan 2cc de defecado limpio.

- i) La tapa de vidrio se coloca con la parte esmerilada hacia abajo dejando una pequeña ventana colocar 2cc de carbonato de potasio y cerrar la tapa.
- j) Incubar las cámaras cerradas 36°C por 2hs en estufa de incubación
- k) Retirar de la estufa y titular con H₂SO₄ N/100. Usando como indicador el reactivo de Tashiro.
- l) Se registra en la planilla de texto el volumen del gasto del ácido para cada muestra.

$$\text{Fórmula para calculo BNVT} = \frac{\text{Gasto de ácido sulfúrico} \times 14 \times 95 \times 100}{2 \times 25 \times 100}$$

Numerador:

14 - peso molecular del Nitrógeno

95 - volumen de agua en el que están disueltas las BNVT, se obtiene tomando en cuenta un 80% de los 25g de muestra de músculo, los cuales son 20g de agua, en adición a los 75ml de ácido tricloroacético al 5%;

100 - factor para que se exprese en 100g las BNVT.

Denominador:

2 = mL del defecado colocado en la cámara

25 = masa de músculo en gramos de la muestra a dosar

100 = factor para que se exprese en 100g las BNVT.

Los resultados de las BNVT se expresaron en mg/100g de músculo.

Ensayos microbiológicos utilizados para la evaluación de la calidad higiénica sanitaria del pescado

Coliformes fecales y *E.coli* por la técnica del NMP

El objetivo de esta técnica es establecer un procedimiento para la estimación del número de Coliformes totales y fecales presentes en la muestra de pescado por la técnica NMP.

La técnica de dilución por número más probable utiliza resultados que son informados como positivos o negativos en una o más diluciones decimales de la muestra para estimar el número de microorganismos presentes.

Dicho procedimiento se basa en la estimación del recuento de Coliformes totales y fecales utilizando Caldo Lauril Triptosa, Caldo Bilis Verde Brillante y Caldo EC, y confirmación en agua triptonada (Indol a partir de triptofano).

Esta técnica se basó en:

- American Public Health Association (APHA), *“Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods”*, Cuarta edición, 2001, capítulos 6 y 8.
- ISO 7218- Microbiology of Food and animal feeding stuff - General rules for Microbiological examinations.

Recuento de aerobios mesófilos totales a $35,5 \pm 1^\circ\text{C}$

El Recuento total de microorganismos viables (RMV) o recuento de aerobios mesófilos en placa (*Aerobic Plate Count* - APC) se define como el número de microorganismos obtenido en óptimas condiciones de cultivo en un producto alimenticio (Huss H., 1997). El resultado obtenido se expresa en unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (ufc/g).

Dicho procedimiento se basa en el recuento de microorganismos en placa utilizando Plate Count Agar (PCA). Se inoculan dos placas de Petri estériles con 1mL de las diluciones decimales preparadas a partir de la suspensión inicial de la muestra y se agrega el medio específico de cultivo atemperado a unos 50°C , homogenizando agar e inóculo aplicando movimientos circulares. Este procedimiento se realiza por duplicado. Las placas son incubadas a $35,5 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 hs.

Esta técnica se basó en:

- APHA, "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods", Cuarta edición, 2001, capítulos 6 y 7.

Búsqueda de microorganismos patógenos en pescado por el método de PCR

La búsqueda de *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes* presuntiva en pescado fresco se realizó por el método de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) en pool de 125g y su confirmación se basó en la ISO 6579:2002 e ISO 11290-1,1996 y 11290-2,1998 respectivamente.

El análisis por PCR se focaliza en la detección de la estructura genética de la bacteria a través de la detección de un único fragmento de ácido desoxirribonucleico (DNA), encontrado solo en el microorganismo target. El PCR (*Polymerase Chain Reaction*) es una herramienta analítica para la rápida replicación y detección de un fragmento de DNA target (ácido desoxirribonucleico blanco).

En una típica aplicación, la muestra de DNA es combinada con una DNA polimerasa, nucleótidos y *primers* que son específicos para una secuencia de nucleótidos dada. Esta mezcla se expone a ciclos de calentamiento y enfriamiento. El calentamiento desnatura el DNA separándolo en cadenas simples. A medida que la mezcla se enfría, los *primers* reconocen la secuencia de DNA target. La DNA polimerasa usa los nucleótidos para extender los *primers*, creando dos copias del DNA del fragmento de DNA target (amplificación). Repitiendo los ciclos de desnaturación, *annealing* y amplificación se produce un incremento en el número de fragmentos del DNA target creando millones de copias en horas. Si la secuencia de DNA no está presente no tiene lugar la amplificación detectable.

Cada tableta de PCR contiene una tinción fluorescente, la que se intercala con los puentes de la doble cadena de DNA y emite una señal fluorescente en respuesta a la luz. Después de la amplificación, comienza una fase de detección donde la señal fluorescente es medida. Durante la detección la temperatura de la muestra es llevada al punto en que las cadenas de DNA se separan (desnaturación) liberando la tinción y decreciendo la señal. Estos cambios en la fluorescencia pueden ser graficados contra la temperatura para generar una curva de separación,

la cual es interpretada por el software del sistema del PCR. (*Oficial Method Number 2003.12 y 2003.09 (Bax System Qualicon Dupont)*).

Detección de *Listeria monocytogenes* por PCR

PCR- Método rápido para la detección de *Listeria monocytogenes* presuntiva, validado AOAC International - *Oficial Method Number 2003.12* , (*Bax System Qualicon Dupont*).

Detección presuntiva de *Salmonella spp.* por PCR

PCR- Método rápido para la detección de *Salmonella spp.* presuntiva validado AOAC International - *Oficial Method number 2003.09 (Bax System Qualicon Dupont)*.

Ensayos utilizados para la determinación de microorganismos específicos del deterioro

Recuento de aerobios mesófilos totales a 35,5°±1°C

Se utilizó el mismo método que el descrito para la evaluación de la calidad higiénica sanitaria del producto.

Se utilizo la misma muestra para determinar los MED durante los doce días de almacenamiento.

Aislamiento e identificación de aerobios mesófilos (anexo 5)

El aislamiento e identificación de las colonias se realizó a partir del PCA. Se utilizaron las placas de mayor dilución y con menor número de unidades formadoras de colonias (ufc).

En las placas seleccionadas se identificaron para su posterior aislamiento tres tipos de colonias. La clasificación de las colonias se realizó en función de sus características *fenotípicas*. A las colonias seleccionadas se les realizó *tinción Gram* y las pruebas *bioquímicas* oxidasa, catalasa y fermentación de azúcar.

Las colonias gramnegativas, oxidasa y catalasa positivas fueron sembradas por agotamiento en estría en medio agar cerebro corazón (BHI agar) y repicadas a caldo Lauryl triptosa (con 5% lactosa).

Se realizó la suspensión bacteriana de las ufc lauryl triptosa positivas (presencia de gas y turbiedad del medio), con crecimiento puro en placas de BHI agar. Posteriormente se procedió a la inoculación con dicha suspensión del sistema miniaturizado de identificación de bacilos gramnegativos no exigentes *API 20E*.

Identificación fenotípica

Para la identificación fenotípica se tomó en cuenta el tamaño, bordes, color y morfología de las colonias.

Pruebas bioquímicas convencionales

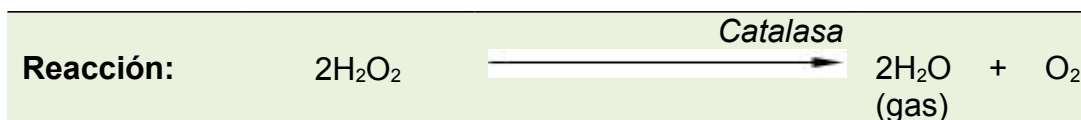
- A. *Test de la catalasa*
- B. *Test de la oxidasa*
- C. *Test de fermentación de carbohidratos*

Principio: los ensayos bioquímicos tradicionalmente utilizados (las llamadas pruebas bioquímicas convencionales), generalmente determinan la actividad de una vía metabólica de la bacteria (conjunto de reacciones químicas) a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer transforma o no. Obviamente, en la identificación bacteriana hay que partir de un cultivo puro obtenido en el aislamiento, subcultivando de una colonia bien aislada. Es aconsejable realizar una comprobación efectuando una siembra en placa en la que crezcan únicamente colonias del mismo tipo (Corbo Chordi A, 2008).

A. *Test de la catalasa*

Se utilizó este test para identificar microorganismos que producen la enzima catalasa.

Principio: el peróxido de hidrógeno es una molécula altamente reactiva que provoca daños en los componentes celulares, puede producirse en los microorganismos por diferentes vías. Los organismos que producen la enzima catalasa son capaces de romper el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gas (Corbo Chordi A, 2008)



B. *Test de la oxidasa*

Se uso para identificar bacterias que tienen la enzima citocromo oxidasa.

Principio: la presencia de citocromo C oxidasa en la cadena de transporte de electrones puede detectarse utilizando un aceptor de electrones artificial (p-fenilendiamina) (X Curso Microbiología de los Alimentos, 2008).

El test se lleva a cabo de la siguiente forma: Se utiliza como reactivo p-fenilendiamina al 1% en agua. Con este reactivo se impregna un papel de filtro, posteriormente, con un asa que no sea de hierro (daría lugar a falsos positivos), se pica una colonia de un cultivo de 24 horas y se extiende sobre el papel de filtro. La lectura se hace inmediatamente (Corbo Chordi A, 2008).

En el presente estudio, para este test se utilizaron tiras reactivas BioFix.

La reacción es positiva cuando aparece un color azul oscuro en la zona de depósito de la bacteria. Si no se produce ningún cambio la reacción es negativa (figura 13).



Figura 13: Reacción de citocromo oxidasa (Corbo Chordi A, 2008).

C. Test de fermentación de carbohidratos

El test de fermentación de carbohidratos se lleva a cabo de la siguiente forma: se inocula la bacteria en un medio líquido conteniendo una pequeña cantidad de peptona, un indicador de pH (púrpura de bromocresol) y una fuente de carbono fermentable (por ejemplo glucosa) al 1-2 % y se coloca dentro de los tubos una campana Durham.

Se incuban los tubos a 37°C, se observa el viraje de color del medio y la producción de gas a las 24° - 48h (Figura 14).

La reacción es positiva cuando los tubos se vuelven de color amarillo (lo que indica una disminución de pH por la producción de ácido) y se observa mínimo 1/3 de gas retenido en la campana Durham (Corbo Chordi A, 2008).



Figura 14: Reacción positiva, test de fermentación de carbohidratos (Corbo Chordi A, 2008)

Tinción Gram

La tinción de Gram, diseñada en 1884 por el bacteriólogo danés Christian Gram es un procedimiento que se encarga de clasificar a las bacterias en dos grandes grupos: grampositivas y gramnegativas. Esta tinción diferencial depende de la estructura de la pared celular de las bacterias (X Corbo Chordi A, 2008).

En el primer paso de la tinción Gram, el preparado es teñido con el colorante ácido cristal violeta, en una tinción primaria. Se continúa el tratamiento con una solución de yodo que actúa como mordiente (el yoduro aumenta la interacción entre la célula y el colorante de tal forma que la célula se tiñe más fuertemente). Luego se realiza una decoloración con etanol. Este paso genera el aspecto diferencial de la tinción Gram: las bacterias grampositivas retienen el cristal violeta, mientras que las bacterias gramnegativas lo pierden y se vuelven incoloras. Finalmente, se realiza una tinción con un colorante básico (Safranina) que da a las bacterias gramnegativas una coloración de rosado a rojo y deja las bacterias grampositivas de color azul a violeta (Corbo Chordi A, 2008).

Identificación por el sistema rápido API 20E

La batería de pruebas API20E es un sistema de identificación rápida para bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y otras bacterias gramnegativas. Básicamente consta de 21 tests bioquímicos estandarizados y miniaturizados y una base de datos (Cuadro 14 y figura 15). Este sistema presenta las ventajas de ser rápido, eficaz y de permitir realizar numerosas pruebas a la vez. Cada tira de API 20E contiene 20 microtubos o pocillos con distintos sustratos deshidratados. Cada tubo es una prueba bioquímica distinta.

Los microtubos se inoculan con una suspensión de microorganismos, en agua o solución salina (suero) estéril, que rehidrata los medios. Las tiras o galerías se incuban en estufa a $36\pm 2^{\circ}$ C y por efecto del metabolismo bacteriano se producen cambios de color espontáneos o bien por la adición de reactivos. La lectura de las reacciones se hace mediante comparación con una tabla de lectura donde se indica si los microorganismos deben considerarse positivos o negativos para cada reacción según el color aparecido (API20E, 2010).

Cuadro 14: Batería de pruebas incluidas en API 20E y tablas de lectura con coloraciones positivas y negativas

Prueba	Reacción / Enzimas	Negativo	Positivo
ONPG	beta-galactosidasa	sin color	amarillo
ADH	arginina deshidrolasa	amarillo	rojo o naranja
LDC	lisina descarboxilasa	amarillo	rojo o naranja
ODC	ornitina descarboxilasa	amarillo	rojo o naranja
CIT	utilización del citrato	verde	azul oscuro o turquesa
H ₂ S	producción de H ₂ S	sin precipitado negro	precipitado negro
URE	ureasa	amarillo	rojo o naranja
TDA	triptófano desaminasa	amarillo	marrón-rojo
IND	producción de indol	amarillo	anillo rojo
VP	producción de acetoína (Voges-Proskauer)	sin color	rojo
GEL	gelatinasa	sin difusión	difusión de pigmento
GLU	fermentación/oxidación de glucosa	azul o verde	amarillo
MAN	fermentación/oxidación de manitol	azul o verde	amarillo
INO	fermentación/oxidación de inositol	azul o verde	amarillo
SOR	fermentación/oxidación de sorbitol	azul o verde	amarillo
RHA	fermentación/oxidación de ramnosa	azul o verde	amarillo
SAC	fermentación/oxidación de sacarosa	azul o verde	amarillo
MEL	fermentación/oxidación de melobiosa	azul o verde	amarillo
AMY	fermentación/oxidación de amigdalina	azul o verde	amarillo
ARA	fermentación/oxidación de arabinosa	azul o verde	amarillo
OX	citocromo oxidasa		

	ONPG	ADH	LDC	ODC	ICIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
Negativo																					
Positivo																					

Figura 15. Galería API 20E para la lectura de reacciones bioquímicas positivas y negativas (figura ilustrativa).

Recuento de psicrotrofos a 7°C

El recuento de aerobios psicrotrofos en placa (“Aerobic Plate Count” APC) se define como el número de bacterias obtenido en óptimas condiciones de cultivo en un producto alimenticio (Huss H., 1997). El resultado obtenido se expresa en unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (ufc/g).

Dicho procedimiento se basa en el recuento de microorganismos en placa utilizando PCA. Se inoculan dos placas de Petri estériles con 1mL de las diluciones decimales preparadas a partir de la suspensión inicial de la muestra y se agrega el medio específico de cultivo atemperado a unos 50°C, homogeneizando agar e inóculo aplicando movimientos circulares. Este procedimiento se realiza por duplicado. Las placas son incubadas a $7,0 \pm 1^\circ\text{C}$ por 10 días.

Esta técnica se basó en:

- APHA “*Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*”, Cuarta edición, capítulos 6, 7 y 13.

Ensayos utilizados para determinar la calidad microbiológica de las aguas en las zonas de captura

Coliformes termotolerantes a 44,5°C (fecales) y *E.coli* por el método de membrana filtrante en agua

Se realizó el recuento de Coliformes termotolerantes (fecales) por el método de membrana filtrante en medio mFC, basado en:

- APHA “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*”; 9020; 21 edición; capítulo 9222D.

El objetivo de esta técnica fue establecer un procedimiento para la detección de Coliformes termotolerantes (fecales) y *E.coli* por el método de membrana filtrante. Dicho procedimiento se basó en la filtración de agua a través de una membrana filtrante de 0.45µm (micras) y su posterior colocación en placa con medio mFC (difco). La incubación se realizó a 44,5°C por 24h.

La lectura y recuento de colonias típicas se realizó después de las 24hs de incubación.

Recuento de heterótrofos en agua

Este procedimiento está basado en la estimación del número de bacterias vivas heterótrofas presentes en el agua por el método de recuento en placa en *Plate Count Agar*. Las colonias pueden presentarse en pares, cadenas, racimos o células simples, las cuales se encuentran todas reunidas dentro del término “Unidades Formadoras de Colonias” (ufc).

Esta técnica es aplicable para el análisis de aguas de bebida, para medir los cambios durante el tratamiento de aguas y su distribución.

Las placas son incubadas a $35,5 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 hs.

Esta técnica se basó en:

- APHA “*Standad Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 22 edición, capítulo 9215 A y B.
- ISO 6222-1999 “Calidad de aguas. Enumeración de microorganismos cultivables. Recuento de colonias por siembra en medio de cultivo de agar nutritivo”.

MATERIALES

En el siguiente cuadro se detalla la cantidad de ejemplares muestreados por especie, así como las zonas y fechas de su captura.

Cuadro 15: Pescados a ensayar.

Especies (nombre común)	Cantidad de ejemplares (n)	Origen (zona de capturas)	Peso promedio eviscerado	Fecha de captura
Sábalo (S)	10	Río Uruguay Nuevo Berlín Las cañas	1,6 kg	02/2013
Boga (B)	4	Río Uruguay Nuevo Berlín Las cañas	1,8 kg	02/2013

En el cuadro 16 se especifica la cantidad de muestra a utilizar para cada ensayo.

Cuadro 16: Cantidad de muestra a utilizar según el ensayo.

Ensayos	Gramos por muestra para ensayos químicos y microbiológicos (g)			
	Día 1	Día 2	Día 6	Día 12
Recuento de aerobios mesófilos en PCA	11	11	11	11
Recuento de aerobios Psicrotrofos en PCA	11	11	11	11
Coliformes fecales y <i>E.coli</i> (NMP)	11			
Búsqueda de <i>Salmonella</i> spp (n=5)	pool 125			
Búsqueda de <i>Listeria monocytogenes</i> (n=5)	pool 125			
BNVT	25	25	25	25

Materiales de laboratorio

Para los ensayos microbiológicos el uso del material de vidrio y los equipos utilizados en este trabajo se prepararon de acuerdo a lo establecido en la Norma ISO 7218 punto 6 "Preparation of the equipment".

Para los ensayos químicos los materiales se prepararon de acuerdo a lo establecido en cada procedimiento de análisis.

Reactivos

- Reactivo de Kovac`s para reacción de indol
- Buffer de lisis (DuPont)
- Proteasa (DuPont)
- Tabletas de PCR (DuPont)
- Acido tricloroacetico al 5% (MACRON, Chemicals)
- Acido Bórico al 1%
- Acido Sulfúrico N/100
- Carbonato de potasio
- Defecado de pescado
- Reactivo de Tashiro
- Tiras de citocromo oxidasa (BioFix)
- Peróxido al 3%.
- Agua de dilución buffer fosfato.

Equipos

- Placas de petri de vidrio o descartables estériles
- Autoclave de esterilización (Astell; Hogner)
- Estufa de esterilización (Selecta)
- Cámara de frío o refrigerador (Consul)
- Medidor de pH en estado de calibración (Hatch)
- Termómetro de penetración (Hatch)
- Pipetas de vidrio estériles y/o micropipetas y sus tips.
- Estufa de incubación a 35,5 °C +/- 1,0°C (Mettler)
- Refrigerador de incubación a 7 °C +/- 1,0°C (James)
- Cuenta colonias
- Baño para fundir a 100° C (Selecta)
- Baño para termostatar a 44° – 47° C (Selecta)
- Baño de incubación a 44,25 +/- 0,5°C (Selecta)
- Tubos de ensayos y campanas durham (Corning)
- Balanza en estado de calibración (Selecta)
- Campana de flujo laminar de calidad ISO 14644 -1:5 (Thermo Cientific)
- Tips y micropipetas para dispensar 150 microlitros, 10 microlitros, 5 microlitros y 50 microlitros (Socorex)
- Bolsas de stomacher (Nasco W.) o frascos estériles (Corning) con capacidad para 225 mL o para 1125 ml.
- Estufa de incubación de (37±1)°C (Mettler)
- Estufa de incubación de (41,5±1)°C (Mettler)
- Tapas ópticas (DuPont)
- Bax system termociclador/detector y placas de verificación.
- Computador con Windows
- Bloques de calentamiento (DuPont)
- Herramientas para tapar y destapar tubos y tabletas
- Tubos para lisis y BHI
- Bloques de enfriamiento
- Soportes para tubos (DuPont)
- Kit tinción gram

- Guantes de nitrilo sin talco
- Pinzas estériles.
- Alcohol 70%.
- Sonda Multiparametro
- Cámara de microdifusión de Conway
- Bureta graduada
- Soporte para bureta
- Cartillas confeccionadas para las especies en estudio
- Planillas de evaluación sensorial de las especies en estudio

Medios de cultivo

- Medio Plate count Agar (Oxoid).
- Caldo Lauryl Triptosa (Oxoid CM0451 o Difco Lauryl Tryptose Broth)
- Caldo Lactosa Bilis Verde Brillante (Oxoid CM0329 o Difco Brilliant Green Bile Broth, 2%).
- Caldo EC (Oxoid o Difco EC Medium)
- Agua triptonada (Oxoid)
- Buffer de agua peptona (Oxoid)
- BHI agar (Oxoid)
- Placas de Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) y Placas de verde brillante modificado (VBM)
- Medios de cultivo Rappaport-Vassiliadis (RV) y Muller-Kauffmann (MK)(Oxoid)
- Caldo Half Fraser
- Suplemento
- Caldo MOPS- BLEB (Oxoid)
- Placas de agar ALOA y placas de Palcam
- Agar cerebro corazón (Brain Heart Infusion), (Oxoid)
- API 20E (bacilos Gram negativos) (Biomérieux)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS DEL TRABAJO EN CAMPO

Evaluación sensorial del pescado

Tomando como referencia las cartillas y planillas (Anexos1 a 4) confeccionadas en el trabajo de investigación realizado por Pinnachio, G. 2011; los ejemplares evaluados pasaron de una escala de 1 (fresco) en el día uno de almacenamiento a 3 (podrido) en el día doce de almacenamiento con hielo en cámara de frío.

En el día seis de almacenamiento los pescados ya presentaban una clasificación 2 en la escala de frescura.

Como resultado final podemos expresar que al día seis de almacenamiento los ejemplares estaban en el límite de aceptación (escala 2) y al día doce de almacenamiento estaban podridos llegando a una escala de 3, en la clasificación de frescura para estas dos especies

Hay que aclarar que las especies en estudio fueron evisceradas y procesadas artesanalmente, sin sufrir el proceso de acondicionamiento que se les realiza a todas las partidas de pescado que llegan a planta. Las especies procesadas en planta tienen un período de vida útil de 18 días en promedio lo cual es superior al obtenido para este trabajo y similar a los promedios de 15 a 27 días establecidos para Sábalo (*Prochilodus lineatus*) y Bagre (*Pimelodus maculatus*) por Lima dos Santos; Poulter y Gram, (Huss H., 1998).

Pinnachio, G. 2011, estableció que los valores de las BNVT para Sábalo estaban relacionados con el estado de frescura que presentaron en la evaluación sensorial. Los pescados estudiados presentaron al día 10 de almacenamiento valores de BNVT de 41mg/100g de músculo, superando el máximo permitido y coincidiendo con el resultado de escala 3 de frescura (podrido) obtenido en la evaluación sensorial. Estableció una correlación positiva entre la evaluación sensorial y los valores medidos de las BNVT, definiendo criterios de rechazo del producto según ambos métodos.

Sin embargo, para Boga hasta el día 10 de almacenamiento los ejemplares se encontraron por debajo del límite máximo aceptado para los valores de las BNVT, pero desde el análisis de evaluación sensorial se registró como escala 3 de frescura (podrido).

Evaluación físico química del pescado

Determinación de pH muscular

En la figura 16 se representan los valores de pH promedio medidos en el músculo de todos los ejemplares en función del tiempo de almacenamiento en cámara de frío.

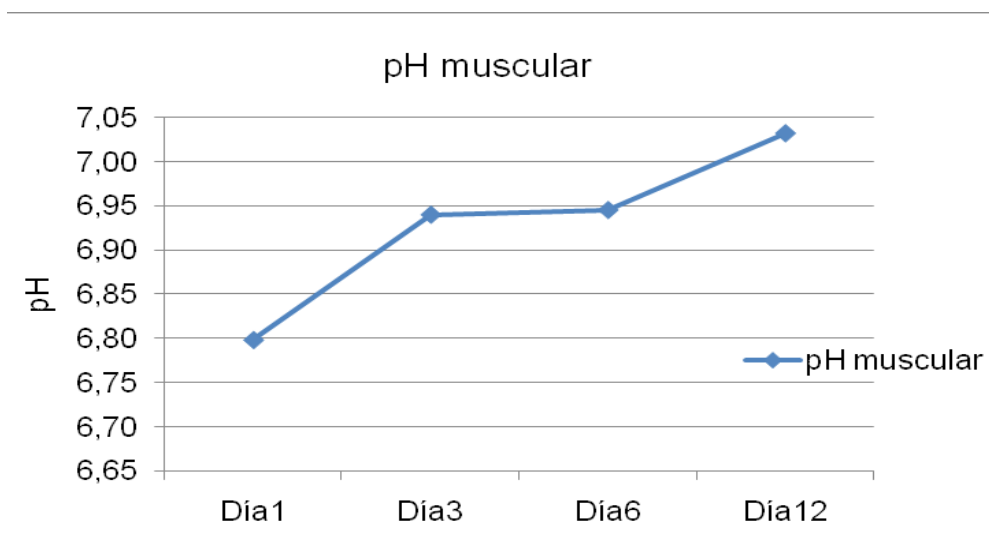


Figura 16: Registro promedio de valores de pH muscular de todos los ejemplares en función del tiempo de almacenamiento en cámara de refrigeración

Los valores medios de pH muscular entre las especies no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$)

Los valores medios de pH muscular entre días de almacenamiento presentan diferencias significativas ($P < 0.05$)

Como se puede observar en la figura 16, existe un aumento moderado en los valores de pH muscular hacia el día doce de almacenamiento.

Determinación de la temperatura muscular

En la figura 17, se observa la temperatura muscular promedio registrada para todos los ejemplares, durante los doce días de almacenamiento en cámara de frío. La temperatura muscular fluctuó entre un mínimo 6,09 °C y un máximo de 6,54°C.

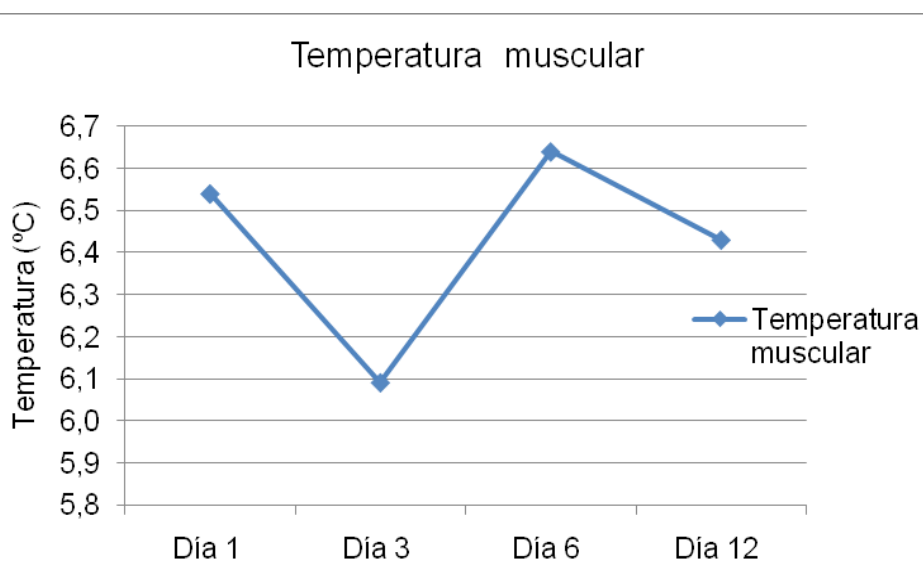


Figura 17: Registro de los valores promedio de temperatura muscular de todos los ejemplares en función del tiempo de almacenamiento en cámara de refrigeración.

Considerando los resultados de pH y temperatura muscular registrados, podemos expresar que se presentaron las condiciones ideales para el crecimiento en frío del género *Aeromonas spp.* Este género tiene un crecimiento óptimo a pH de 7,2 y a una temperatura que puede variar de 28° C a 35° C. La franja de crecimiento puede variar de -2°C a 42°C, pero con frecuencia es menor a 40°C dependiendo de la cepa aislada; y el rango de pH puede variar de 4,5 a $\geq 8,7$.

RESULTADOS DEL TRABAJO EN LABORATORIO

Determinación de las bases nitrogenadas volátiles totales

En la siguiente tabla se presentan los resultados de BNVT obtenidos para los 14 ejemplares estudiados, durante el almacenamiento en cámara de refrigeración.

Tabla1: Registro de los valores de BNVT en músculo de todos los ejemplares, los días 1, 3, 6 y 12 de almacenamiento en cámara de refrigeración.

IDENTIFICACIÓN	BNVT (mg/100g)			
	día 1	día 3	día 6	día 12
S1	17,02	17,05	17,00	44,16
S2	15,80	14,35	15,00	59,19
S3	18,20	18,00	17,00	72,49
S4	20,40	18,50	19,00	65,17
S5	16,23	21,00	22,00	63,18
S6	18,35	19,00	23,00	56,40
S7	15,30	19,35	25,00	53,00
S8	23,00	19,00	16,00	59,90
S9	20,88	25,00	18,00	66,50
S10	21,81	23,00	23,00	64,00
B11	23,40	18,00	24,00	55,00
B12	21,20	19,50	18,00	59,85
B13	18,90	19,90	19,00	49,21
B14	23,60	22,50	21,00	55,86

Nota: S (Sábalo); B (Boga)

Se tomó como referencia el máximo permitido de BNVT de 30mg/100g de músculo para pescado fresco. Este valor límite se establece como parámetro de frescura en el Reglamento Bromatológico Nacional, decreto 315/94 (Uruguay, 2012) y en el reglamento del Mercosur (Normas Mercosur, 2003).

Los valores de las BNVT no presentaron diferencias significativas entre especies a igual tiempo de almacenamiento, por lo que fueron tratados como una única muestra ($P > 0.05$).

En los primeros seis días de almacenamiento los valores obtenidos no superaron los 30mg/100g de músculo (figura18). Estadísticamente no presentaron diferencias significativas para un intervalo de confianza del 95% ($P > 0.05$).

A partir del día seis se observó un incremento de los valores de las BNVT, superando el valor límite establecido para pescado fresco.

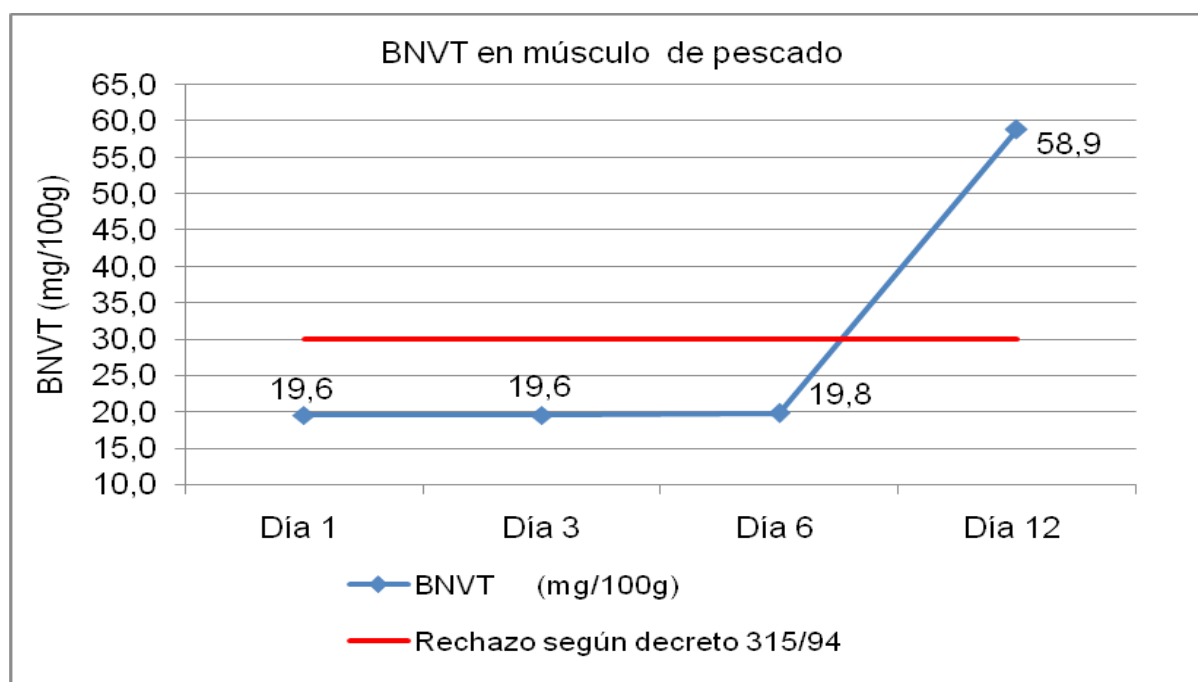


Figura 18: Valores promedios de las BNVT en músculo de todos los ejemplares, en función del tiempo de almacenamiento en cámara de frío.

En la figura 19 se observan los valores de las BNVT en músculo, por especie de pescado, en función del tiempo de almacenamiento. Como se mencionó anteriormente, se determinó que no hay diferencias significativas entre las dos especies en estudio para un intervalo de confianza del 95% ($P > 0.05$).

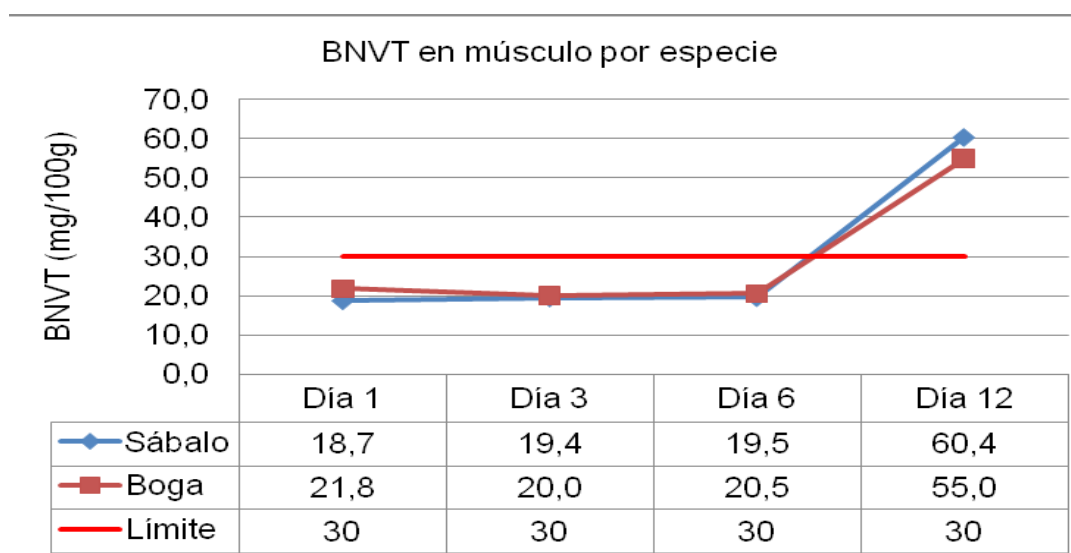


Figura 19: Promedios de los valores de las BNVT por especie para los días de almacenamiento refrigerado 1, 3, 6 y 12.

Los valores registrados de BNVT se pueden atribuir a las desaminaciones de aminoácidos y no a la acción principal de microorganismos específicos del deterioro durante los primeros seis días (H. Huss, 1998).

El incremento de los valores observados a partir del día seis puede estar relacionado directamente con el incremento del recuento de microorganismos aerobios mesófilos y principalmente por la acción dominante de los bacilos gramnegativos como *Aeromonas hydrophila* y *Plesiomona shigelloides*.

Aeromonas hydrophila y *Plesiomona shigelloides* son microorganismos específicos del deterioro (MED) que captan y reducen el OTMA a TMA, unos de los principales componentes de las BNVT. Este incremento registrado de las BNVT va de la mano con el estudio presentado por Anthoni y citado por H.Huss (1998), donde se establece que los pescados de agua dulce contienen altos niveles de OTMA.

El bajo nivel de las BNVT durante los primeros días de almacenamiento en frío puede estar dado por un proceso de deterioro dominado principalmente por microorganismos Psicrotrofos y en especial por el género *Pseudomonas*. Este género no produce niveles altos de TMA ya que se consideran no reductores de OTMA (H. Huss, 1998).

Evaluación de la calidad higiénica sanitaria del pescado

Estudio de los indicadores de contaminación fecal

En la siguiente tabla se presentan los resultados de Coliformes fecales y *E.coli*, obtenidos por el método del NMP para el día 1 de almacenamiento en frío.

Tabla 2. Resultados de Coliformes fecales y *E. coli*, por gramo de pescado para todos los ejemplares evaluados.

<i>Identificación Muestras</i>	<i>Coliformes termotolerantes a 44,5° (fecales) / g</i>	<i>E.coli /g</i>	<i>Inferior 95% de confianza</i>	<i>Superior 95% de confianza</i>
S1 NB	23	23	9	130
S2 NB	460	460	100	2400
S3 NB	460	460	100	2400
S4 NB	1100	460	300	4800
S5 NB	43	43	10	210
B13 NB	23	23	9	130
B14 NB	4	4	<1	21
S6 LC	23	23	9	130
S7 LC	1100	1100	300	4800
S8 LC	93	93	30	380
S9 LC	93	93	30	380
S10 LC	1100	1100	300	4800
B11 LC	15	15	5	50
B12 LC	460	460	100	2400

(APHA, 2012)

Nota: Identificación de las muestras

- S1 a S5 NB: muestras de Sábalo capturadas en Nuevo Berlín
- S6 a S10 LC: muestras de Sábalo capturadas en Las Cañas

- B13 a B14 NB: muestras de Boga capturadas en Nuevo Berlín
- B11 a B12 LC: muestras de Boga capturadas en Las Cañas

Los valores obtenidos de coliformes fecales y *E.coli* para las diferentes zonas de captura, no presentaron diferencias significativas para un intervalo de confianza del 95% ($P > 0.05$).

Para la evaluación de los resultados de *E.coli* se seleccionaron al azar cinco muestras.

De la comparación de los resultados obtenidos con los criterios establecidos en la normativa de la UE, surge que dos resultados quedaron comprendidos entre m y M y tres excedieron a M (figura 20).

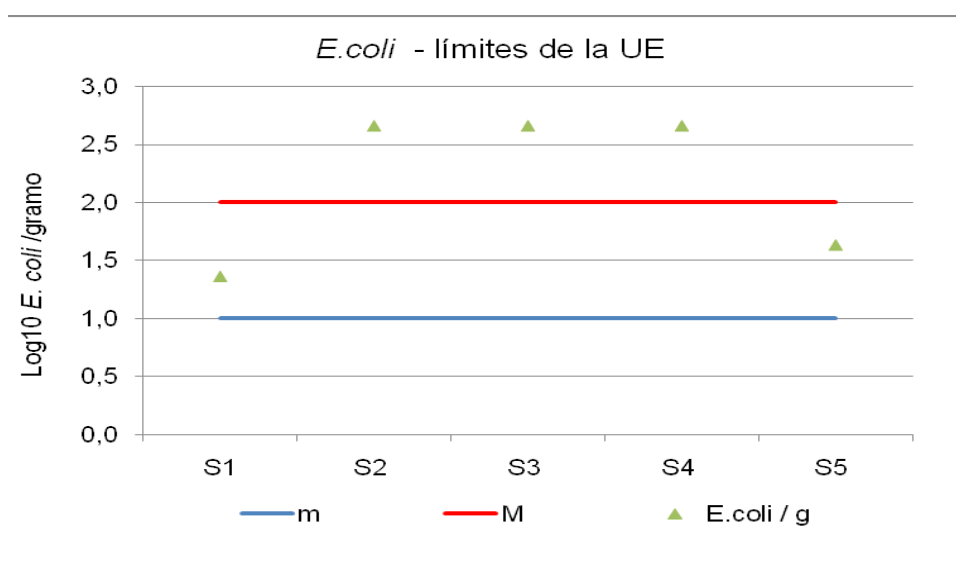


Figura 20: Resultados de *E.coli* para cinco muestras, en función de los límites establecidos por la UE.

Nota: Los valores se graficaron en base logarítmica decimal.

De acuerdo a los valores de referencia establecido en CFIA, como se puede observar en la figura 21 de las cinco muestras ensayadas, ningún resultado quedó comprendido entre m y M; todos los valores excedieron a M.

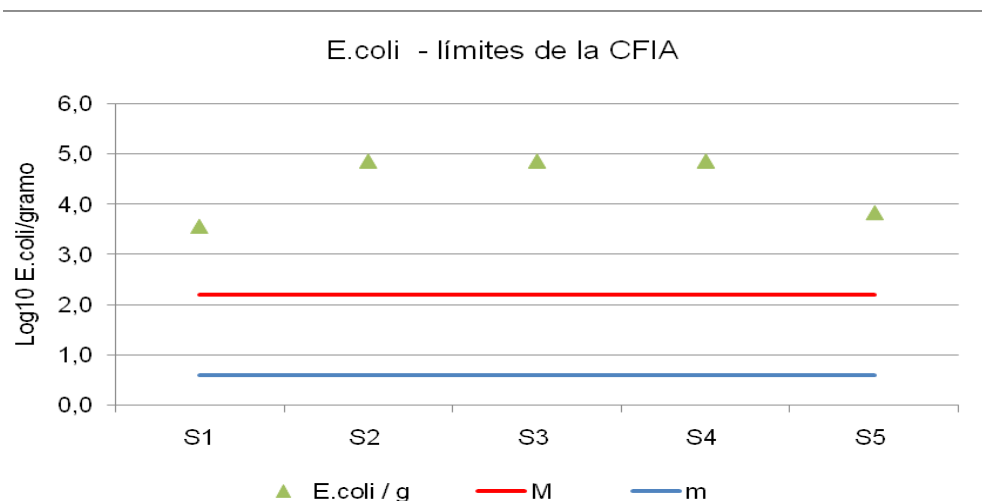


Figura 21: Resultados de *E.coli* para cinco muestras, en función de los límites establecidos por la CFIA

Nota: Los valores se graficaron en base logarítmica decimal.

Tomando en cuenta los límites de *E.coli* establecidos para criterios de aceptación en pescado fresco de la CFIA ([Canadian Food Inspection Agency](#), 2011) y de la normativa Europea (Directiva del Consejo de la Unión Europea, 2003) el pescado analizado no cumple con los requisitos microbiológicos establecidos.

Por lo que esta partida sería rechazada bajo estas condiciones debido al peligro potencial para el consumidor y por ende para la salud pública.

Recuento de aerobios mesófilos totales y Psicrotrofos en PCA

El límite para el recuento de aerobios mesófilos totales utilizado como referencia en la gráfica siguiente se basó en lo establecido en el Reglamento Bromatológico Nacional (Decreto 315/94).

Los resultados obtenidos para recuento de aerobios mesófilos totales y psicrotrofos en función del tiempo de almacenamiento en cámara de refrigeración, se observan en la figura 22.

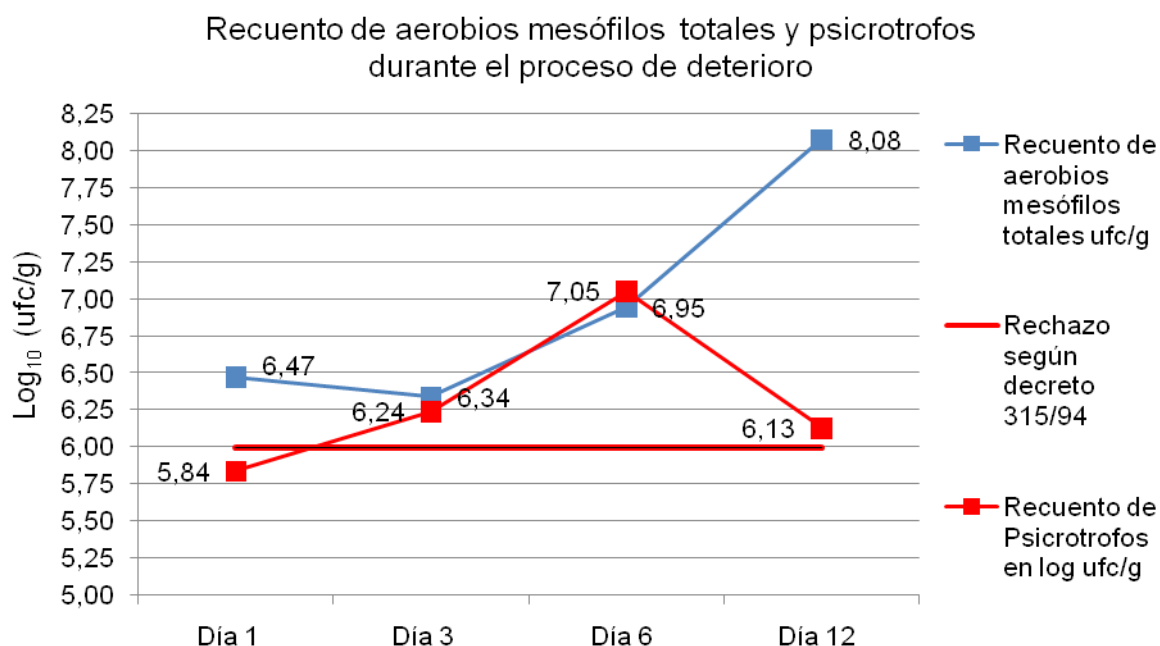


Figura 22: Promedio del recuento de aerobios mesófilos totales y psicrotrofos en función del tiempo de almacenamiento en cámara de refrigeración.

Nota: Los valores se graficaron en base logarítmica decimal.

Como se puede observar la figura 22, a partir del día 3 de almacenamiento en frío se registró un incremento en el recuento de aerobios mesófilos totales en piel de pescado. De acuerdo a los resultados presentados en la tabla 3, entre el día seis y doce de almacenamiento, final del estudio, se produjo un incremento de prácticamente dos órdenes en el recuento de estos microorganismos.

En cambio, el recuento de psicrotrofos aumentó desde el primer día de almacenamiento hasta el sexto, disminuyendo hacia el final del estudio (figura 22). Los resultados promedio obtenidos de recuento de psicrotrofos fueron los siguientes, $7,4 \times 10^5$ ufc/g para el día 1 de almacenamiento en cámara de frío, $2,3 \times 10^6$ ufc/g para el día 3, $1,2 \times 10^7$ ufc/g para el 6 y $4,3 \times 10^6$ ufc/g para el día doce. De acuerdo a estos resultados, el recuento de microorganismos psicrotrofos disminuyó en un orden entre los días 6 y 12 de almacenamiento.

El recuento de aerobios mesófilos totales superó el límite aceptable establecido en el decreto Nacional 315/94 para pescado fresco sin procesar a lo largo de todo el período de almacenamiento.

Tabla 3: Recuento de aerobios mesófilos totales de todos los ejemplares, en función del tiempo de almacenamiento en frío.

IDENTIFICACION	Recuento de aerobios mesófilos totales (ufc/g)			
	DIA1	DIA3	DIA6	DIA12
S1	3,00E+05	1,20E+05	1,80E+06	5,70E+07
S2	7,00E+05	6,00E+05	6,90E+06	1,80E+08
S3	8,00E+05	6,20E+05	7,50E+06	7,10E+07
S4	9,00E+05	9,10E+05	5,10E+06	1,20E+08
S5	2,70E+06	6,60E+06	1,20E+07	1,30E+07
S6	1,00E+05	6,80E+05	1,50E+06	7,20E+06
S7	1,55E+07	1,60E+07	1,70E+07	1,30E+08
S8	1,73E+07	7,20E+05	4,00E+06	2,60E+08
S9	9,00E+05	4,00E+05	7,00E+05	1,20E+08
S10	3,00E+05	7,60E+05	1,10E+06	2,60E+08
B11	5,00E+05	7,80E+05	3,80E+07	2,40E+08
B12	1,00E+05	8,00E+05	3,70E+06	8,40E+06
B13	1,40E+06	8,20E+05	2,10E+06	3,50E+06
B14	2,00E+05	8,40E+05	2,20E+07	2,00E+08
PROMEDIO	2,98E+06	2,19E+06	8,81E+06	1,19E+08

En la figura 23 se comparan los resultados del recuento de aerobios mesófilos totales de cinco muestras tomadas en forma aleatoria, para el día uno de almacenamiento refrigerado, con los límites establecidos por la ICMSF (1986) (Huss H. 1997) para estos microorganismos.

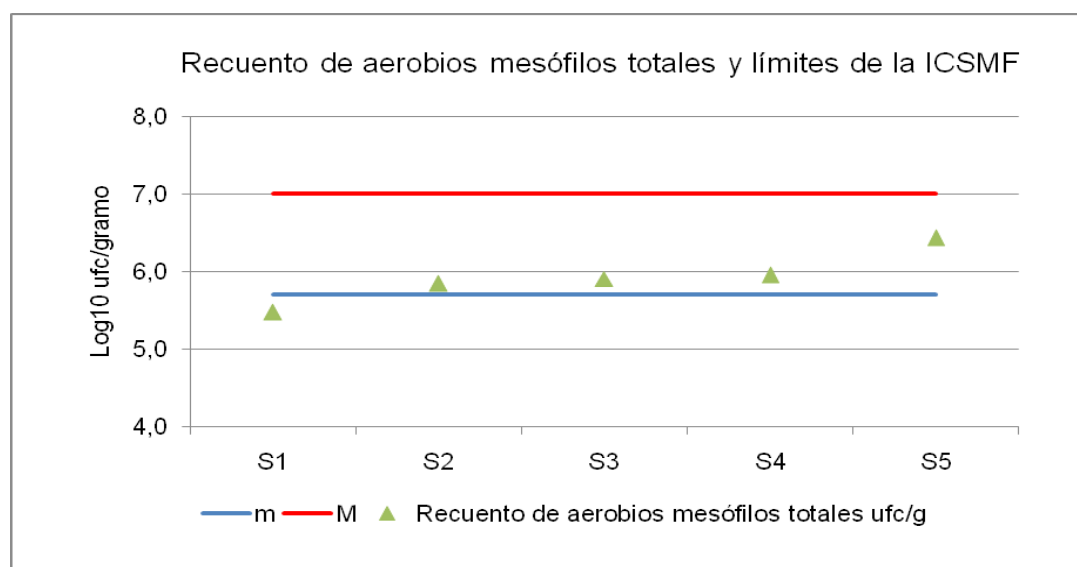


Figura 23: Recuento de aerobios mesófilos totales y límites establecidos por la ICMSF en productos pesqueros, para n=5.

Nota: Los valores se graficaron en base logarítmica decimal.

En la figura 24 se comparan los resultados del recuento de aerobios mesófilos totales de cinco muestras tomadas en forma aleatoria, para el día uno de almacenamiento refrigerado, con los límites establecidos por la normativa de la UE.

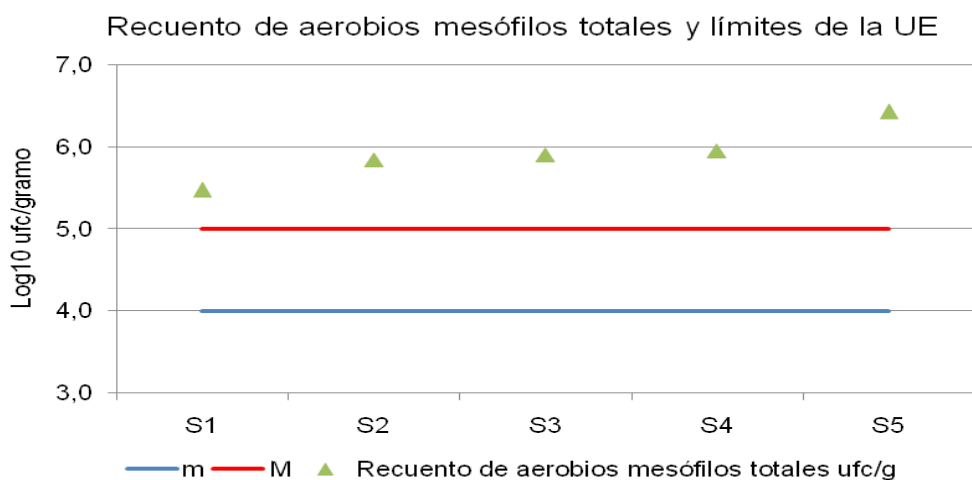


Figura 24: Recuento de aerobios mesófilos totales y límites establecidos por la UE en productos pesqueros, para $n=5$.

Nota: Los valores se graficaron en base logarítmica decimal.

Búsqueda de *Salmonella* spp y *Listeria monocytogenes*

Para todos los ejemplares ensayados se determinó la ausencia de *Salmonella* spp. y de *Listeria monocytogenes* en pool de 125g de muestra, por el método de PCR.

Determinación de microorganismos específicos del deterioro

Identificación de microorganismos aerobios mesófilos

En la tabla 4 se describen las especies de microorganismos identificadas por caracterización fenotípica, realización de pruebas bioquímicas convencionales, tinción Gram e identificación por el sistema API 20E.

Tabla 4: Identificación de las especies de microorganismos aislados durante el tiempo de almacenamiento.

Día 1

Tipo de colonia	Caldo Lauryl Triptosa	Catalasa	Oxidasa	Gram	Identificación	API 20E	%ID API
1	gas /turbiedad	positivo	positivo	negativo	bacilos	<i>Aeromonas hydrophila</i>	97,0
2	turbiedad	positivo	positivo	negativo	bacilos	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	99,2
3	turbiedad	negativo	negativo	positivo	cocos+bacilos	l. no valida	-

Día 3

Tipo de colonia	Caldo Lauryl Triptosa	Catalasa	Oxidasa	Gram	Identificación	API 20E	%ID API
1	gas /turbiedad	positivo	positivo	negativo	bacilos	<i>Aeromonas hydrophila</i>	99,7
2	turbiedad	positivo	positivo	negativo	bacilos	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	99,9

Día 6

Tipo de colonia	Caldo Lauryl Triptosa	Catalasa	Oxidasa	Gram	Identificación	API 20E	%ID API
1	gas /turbiedad	positivo	positivo	negativo	bacilos	<i>Aeromonas hydrophila</i>	99,7
2	turbiedad	positivo	positivo	negativo	bacilos	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	99,9

Día 12

Tipo de colonia	Caldo Lauryl Triptosa	Catalasa	Oxidasa	Gram	Identificación	API 20E	%ID API
1	gas /turbiedad	positivo	positivo	negativo	bacilos	<i>Aeromonas hydrophila</i>	97,7
2	turbiedad	positivo	positivo	negativo	bacilos	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	99,9
3	turbiedad	negativo	negativo	positivo	cocos+bacilos	Id. no valida	-

Como se observa en la tabla, para todos los días de almacenamiento ensayados las especies identificadas correspondieron a *Aeromonas hydrophila* y *Plesiomonas*

shigelloides, microorganismos gramnegativos, específicos del deterioro, que en la actualidad se consideran patógenos.

A su vez, para los días de almacenamiento en refrigeración 1,3,6 y 12 también se identificó por tinción la presencia de cocos y bacilos grampositivos.

En la figura 25 se observan los porcentajes de las especies aeróbicas mesófilas gramnegativas y grampositivas presentes en la piel de pescados dulceacuícolas, en función del tiempo de almacenamiento.

Estos resultados determinaron que el 89% de los microorganismos aislados e identificados por el sistema API20E de las placas de PCA de mayor dilución, correspondieron a aerobios mesófilos gramnegativos, con forma bacilar, pertenecientes a los géneros *Aeromonas* spp. y *Plesiomonas* spp.

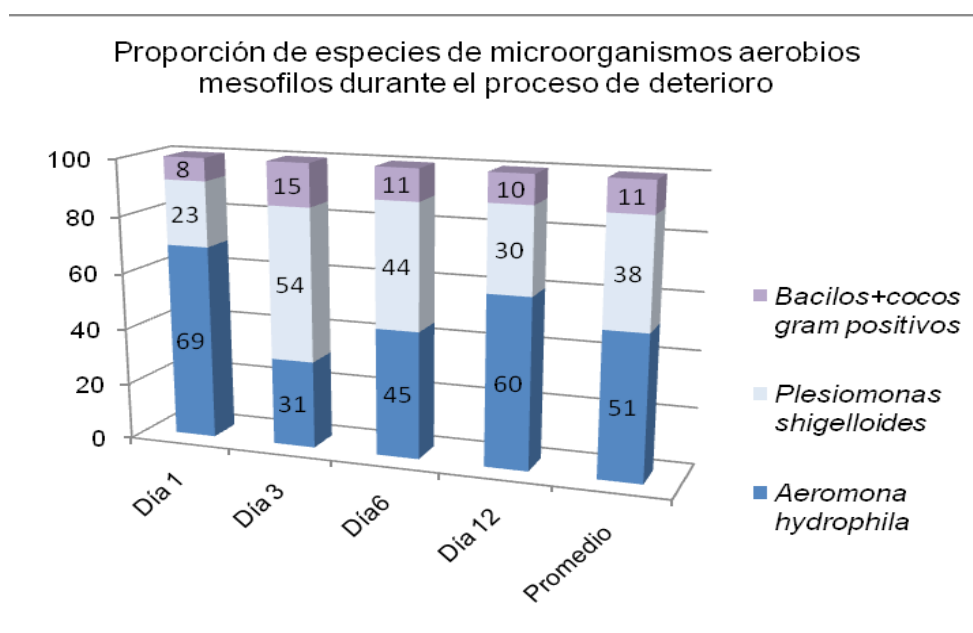


Figura 25: Porcentaje de microorganismos gramnegativos (*Plesiomonas* s.; *Aeromonas* h.) y grampositivos aislados en piel de pescados dulceacuícolas en el proceso de deterioro en función del tiempo de almacenamiento.

Como se observa en la figura 25 la proporción de bacilos gramnegativos aisladas de un ejemplar varió con el tiempo almacenamiento. La especie *Aeromona hydrophila* pasó de 69% para el día uno, 31% para el día tres, 45% para el día seis y 60% para el día doce. La especie *Plesiomona shigelloides* vario en 23 %, 54%, 44% y 30% respectivamente.

Los resultados promedios para todo el estudio en un solo ejemplar correspondieron a 51% para *Aeromona hydrophila* y 38% para *Plesiomona shigelloides*.

Estos resultados se condicen con estudios realizados para especies de agua dulce (Huss H. 1998)

Los cocos y bacilos grampositivos también fueron aislados y caracterizados por tinción Gram pero en porcentajes menores y no se identificó la especie.

En general, las bacterias gramnegativas dominaron la microflora durante todo el proceso de deterioro.

En trabajos similares se aislaron 159 cepas gramnegativas de pescado de agua dulce alteradas. Estos pescados presentaron un recuento de microorganismos 7aerobios totales en el entorno de $1,0 \times 10^8$ ufc/g, donde el 46% de los microorganismos eran *Pseudomonas* y alrededor del 38% correspondió al género *Shewanella* spp. (James M. Jay, 2009).

James M. Jay (2009), también describe que en muestras de Siluro (*Ictalurus punctatus*), que fueron obtenidas de tres plantas de procesamiento diferente la prevalencia de *Aeromonas hydrophila* junto a *Aeromonas sobria* representaron el 36% de las cepas aisladas, mientras que el 11% correspondió a *Aeromonas caviae*.

Microorganismos específicos del deterioro y recuento de aerobios mesófilos totales

Los resultados de la microflora del pescado en función del tiempo de almacenamiento se presentan en la tabla 5 y se observan en la figura 26

Tabla 5: Recuento de de aerobios mesófilos totales y de MED en superficie de piel, durante el tiempo de almacenamiento.

Microorganismos	Día1	Día3	Día6	Día12
Recuento de aerobios mesófilos totales (ufc/g)	3,00E+05	1,20E+05	1,80E+06	5,70E+07
<i>Plesiomonas shigelloides</i> (ufc/g)	6,80E+04	6,50E+04	8,00E+05	1,70E+07
<i>Aeromonas hydrophila</i> (ufc/g)	2,10E+05	3,70E+04	8,00E+05	3,40E+07

Los recuentos de los MED al final del estudio alcanzaron valores de $1,7 \times 10^7$ y $3,4 \times 10^7$, resultados similares a los expuestos en el trabajo de Dalgaard (1993), en Huss H. (1998), donde establece que durante el almacenamiento aeróbico se requieren niveles de $10^8 - 10^9$ ufc/g de MED para ocasionar deterioro en el pescado.

En la figura 26 se evidencian los cambios en el recuento de aerobios mesófilos totales y de los MED, representados en este estudio principalmente por las especies *Aeromonas* y *Plesiomonas*, en función del tiempo de almacenamiento en frío.

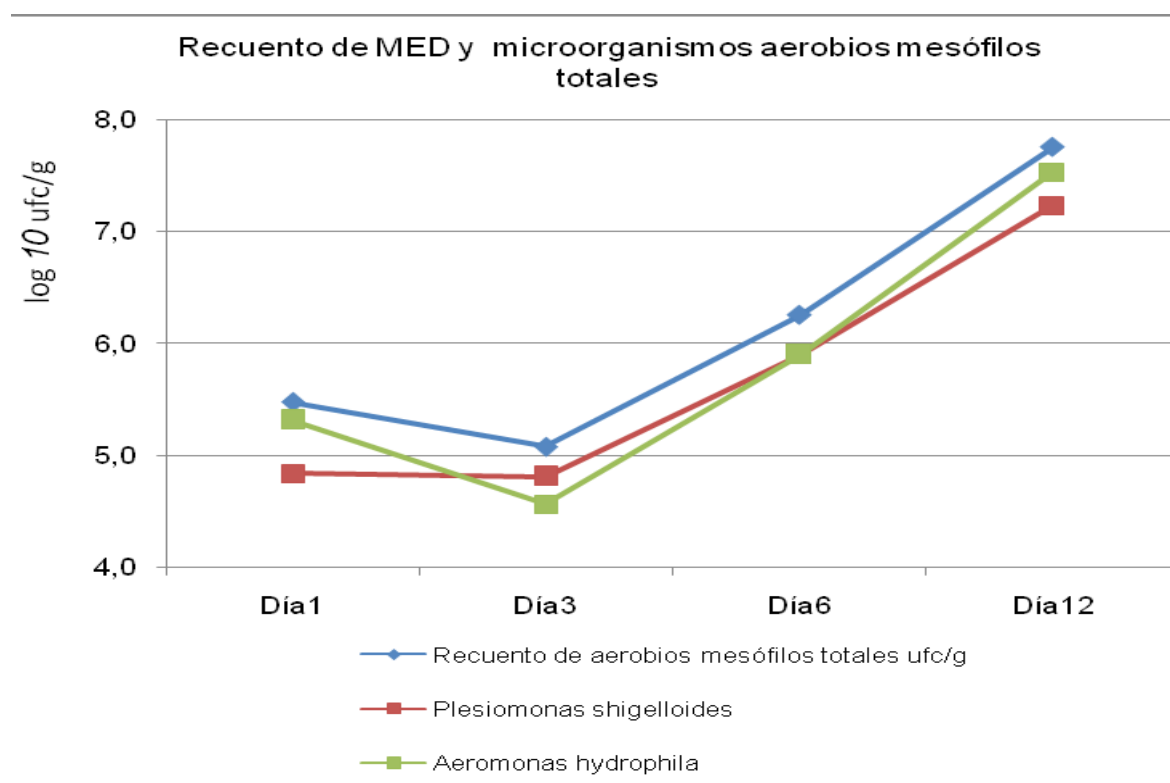


Figura 26: Cambios en el recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales y en los microorganismos específicos del deterioro durante los doce días de almacenamiento en frío.

Nota: Los valores se graficaron en base logarítmica decimal.

H. Huss (1998), describe que cada producto pesquero posee sus propios microorganismos específicos del deterioro y es el número de estos microorganismos y no el total de microorganismos los que guardan una relación directa con la duración del pescado almacenado en frío.

Evaluación de la calidad microbiológica y fisicoquímica del agua del Río Uruguay

En la siguiente tabla se presentan los resultados obtenidos para los diferentes parámetros fisicoquímicos (pH, concentración de oxígeno disuelto, conductividad y temperatura) y microbiológicos evaluados en los puntos de muestreo seleccionados en las zonas de influencia de las áreas de capturas en el río Uruguay.

Tabla 6: Resultados de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos para los cinco puntos de muestreo del río Uruguay.

Agua de Río Uruguay	Temperatura (°C)	Conductividad (µS/cm)	Oxígeno disuelto (mg/L)	pH	Recuento de mesófilos (ufc/ml)	Coliformes Fecales (ufc/100ml)
Punto 1	27,56	58,7	7,45	7,13	1500	150
Punto 2	26,21	65,8	7,60	7,07	2500	250
Punto 3	26,25	65,6	7,66	7,13	2700	310
Punto 4	27,87	64,8	7,37	7,10	1200	110
Punto 5	27,95	63,0	7,11	7,14	1400	90
<i>Promedio</i>	<i>27,20</i>	<i>63,6</i>	<i>7,40</i>	<i>7,11</i>	<i>1900</i>	<i>182</i>

Los valores de referencia utilizados para la evaluación de dichos parámetros fisicoquímicos y microbiológicos, se basaron en la clasificación establecida en el decreto nacional 253/79, para aguas recreacionales tipo 3. El agua clase 3 se define como aquellas destinadas a la preservación de los peces en general y de los demás integrantes de la microflora y fauna hídrica.

Estos valores se describen en la siguiente tabla.

Tabla 7: Valores de referencia del decreto nacional 253/79, clasificación: Aguas clase 3.

Profundidad	Temperatura (°C)	Conductividad en (µS/cm)	Oxígeno disuelto (mg/L)	pH
Superficial hasta 1m	35° máx.	No establecido en decreto	mínimo 5 mg/L	6,5-8,0

(Uruguay, 1979)

No se deberá exceder el límite de $2,0 \times 10^3$ coliformes fecales/100 mL en ninguna de al menos 5 muestras, debiendo la media geométrica de las mismas estar por debajo de $1,0 \times 10^3$ coliformes fecales/100 mL (Uruguay, 1979)

Evaluación de parámetros fisicoquímicos del agua de río

Como se observa en la tabla 6 y 7, todos los valores registrados para los diferentes parámetros evaluados, se encuentran dentro de los valores límites establecidos para la clasificación de aguas recreacionales clase 3, en el decreto nacional 253/79.

Evaluación microbiológica del agua de río

- Recuento de mesófilos en agua

El recuento promedio de mesófilos en agua fue de $1,9 \times 10^3$ ufc/ml de agua de río.

- Resultados de Coliformes termotolerantes a 44,5°C (fecales)

El resultado promedio para Coliformes fecales fue de $1,8 \times 10^2$ ufc/100ml de agua de río como se describe en la tabla 6.

La temperatura de 27,2 °C y el pH de 7,2 del agua son factores que favorecen la presencia y desarrollo de microorganismos mesófilos. A su vez, estos valores son favorables para la presencia de una microflora mesófila en pescado luego de su captura.

Los resultados microbiológicos obtenidos en agua de río nos permiten establecer una posible relación entre el medio acuático y los resultados obtenidos en la superficie de piel y de cavidad abdominal observados en la tabla 2.

CONCLUSIONES

Evaluación de los cambios sensoriales y BNVT

Evaluación sensorial y BNVT

Como referencia se tomó el valor máximo aceptable para consumo en pescado fresco 30 mg/ 100 g. de músculo, según lo establecido por el Reglamento Bromatológico Nacional 315/94.

No se observaron ni registraron diferencias en los atributos entre las dos especies estudiadas para el mismo grado de frescura, durante los doce días de almacenamiento refrigerado.

Desde el punto de vista sensorial los resultados indicaron que al día seis de almacenamiento refrigerado todos los ejemplares estaban en el límite de aceptación, coincidiendo con la escala 2 de frescura. Sin embargo al día doce de almacenamiento todos los ejemplares estaban podridos, coincidiendo con la escala 3 en la clasificación.

Las BNVT no son una medida objetiva de frescura sino que reflejan un grado de alteración del producto. Estas no aumentaron en forma importante hasta pasados los seis días en refrigeración donde superaron el límite máximo aceptado para producto fresco de 30 mg/100 g de músculo.

Se rechaza el lote de pescado pasados luego de los seis días de almacenamiento refrigerado.

La desventaja del método químico radicó en el tiempo de análisis de laboratorio.

El aumento de las BNVT a partir del día seis de almacenamiento refrigerado, puede estar relacionado con el incremento en el recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales durante el proceso de deterioro, y en su mayor medida por la acción de las especies gramnegativas *A. hydrophila* y de *P. shigelloides*.

En resumen y basado en lo expuesto podemos concluir que el uso de cartillas para las especies estudiadas es la medida objetiva más eficiente para determinar el grado de frescura *in situ* de las especies estudiadas, pero no garantizan la inocuidad del producto.

Microorganismos específicos del deterioro, el pH y la temperatura muscular

Los microorganismos deteriorantes o MED aislados e identificados en mayor proporción en superficie de la piel y músculo del ejemplar estudiado, correspondieron a bacilos gramnegativos en un 89%. Los géneros *Aeromona* y *Plesiomona* fueron los más predominantes.

Las especies aisladas e identificadas correspondieron *A. hydrophila* en un 51% y *P. shigelloides* en un 38%, mientras que el 11 % correspondió a bacilos y cocos grampositivos.

El pH y la temperatura registrada en músculo fue un factor favorable para el desarrollo de *A. hydrophila* y *P. shigelloides* durante todo el proceso de deterioro, tendiendo a la alcalinidad en la etapa de putrefacción del pescado.

Indicadores de contaminación fecal, recuento de aerobios mesófilos totales y Psicrotrofos en pescado

Durante el desarrollo del proceso de deterioro se observó un incremento de dos órdenes en el recuento de los microorganismos aerobios mesófilos totales, pasando de 10^6 ufc/g a 10^8 ufc/g hacia el final del estudio.

Sin embargo el recuento de Psicrotrofos disminuyó en un orden, y pasó de 10^7 a 10^6 ufc/g hacia el día doce de almacenamiento en frío.

Los resultados de coliformes fecales, *E.coli* y recuento de aerobios mesófilos totales en las muestras analizadas superaron los límites microbiológicos establecidos en normativas nacionales e internacionales para pescado fresco.

Por esta razón esta partida sería rechazada bajo estas condiciones debido al peligro potencial para el consumidor y por ende para la salud pública.

Presencia de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*

Si bien no se detectaron microorganismos patógenos como *Salmonella* spp. ni *Listeria monocytogenes*, se asilaron especies de microorganismos como *A. hydrophila* y *P. shigelloides* en la superficie de la piel de los ejemplares, que se consideran en la actualidad como patógenas para el hombre. Tomando en cuenta los datos citados en este trabajo sobre la enterotoxigenidad, citotoxicidad y la capacidad de desencadenar en el humano patologías gastrointestinales, los géneros de *Aeromonas h.* y *Plesiomonas s.* aislados de la piel y músculo de pescados eviscerados frescos nos permite identificar un peligro para la salud pública, y establecer de esta manera una posible relación entre el consumo de la carne de pescado y la posible aparición de brotes de enfermedad (Etas).

La ausencia de *Salmonella* spp. y de *Listeria monocytogenes*, pero la presencia de coliformes fecales y *E.coli* por encima de los límites microbiológicos establecidos para este producto, indicaron que el pescado fresco y procesado en forma artesanal por pescadores de la zona, representa un peligro potencial para el consumidor.

La ausencia de microorganismos patógenos como *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*, no garantizan por sí solo la inocuidad del producto.

Estudio de la influencia del medio acuático

Se puede concluir que el agua de río en las zonas comprendidas entre Nuevo Berlín y Las Cañas para los parámetros estudiados cumple con los límites establecidos en el decreto Nacional 253/79.

Las condiciones ambientales del medio acuático demostraron ser favorables para el crecimiento de los microorganismos, y el agua de río analizada en los sitios de captura demuestra ser una posible fuente de contaminación de coliformes fecales y heterotróficos para el producto pesquero fresco eviscerado y lavado en el propio río. Estos factores si no se mitigan en etapas posteriores del proceso afectaran la calidad del producto final.

Recomendaciones

Se recomienda el procesamiento en planta como medida sanitaria y requisito esencial preventivo, el cual se debería implementar para este tipo de producción artesanal, con el objetivo y finalidad de mejorar el producto y disminuir los peligros potenciales para la salud pública.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agüeria, D. (2008), "De la laguna a la mesa: ¿Cómo evaluar la calidad de los productos pesqueros y cómo conseguirla? Espejos en la Llanura. Nuestras lagunas de la Región Pampeana, Argentina 111-118p. Disponible en: http://www.ambiente.gov.ar/archivos/web/GTRA/File/Capitulo_8.pdf;
Fecha de consulta: 01/09/2013.
2. American Public Health Association (2012), Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22^a ed., Washington D.C., American Public Health Association, 1280 p.
3. Ahmed, F.E. (1991). Seafood Safety. National Academy Press, Washington D.C., 448p. Disponible en: http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=1612&page=R3,
Fecha de consulta: 03/09/2013
4. API 20E, sistema de identificación multipruebas (2010). Sistema de identificación de *Enterobacteriaceae* y otros bacilos gram negativos no exigentes. Biomérieux. Lyon, Francia. Disponible en: <http://www.biomérieux.com>; Fecha de consulta: 02/2013.
5. Bertullo, V. H. (1970), Tecnología de los productos de la pesca. Ejercicios prácticos. Montevideo, Fac. de Vet., 121p.
6. Bove M. I., Cerruti F., (2008), Los alimentos y las bebidas en los hogares. Encuesta Nacional de Gastos e Ingresos de los Hogares 2005-2006. Instituto Nacional de Estadística, Montevideo, Disponible en: <http://www.ine.gub.uy/biblioteca>, Fecha de consulta: 03/09/2013
7. Bravo L., Fernández A., Núñez F., Rivero L., Ramírez M., Águila A. , Ledo Y., Cruz Y., Hernández J.; "Aeromonas spp associated to acute diarrheic disease in Cuba: case-control study"(2012). Rev. Chil. Infect, 29(1):44-48.
8. [Canadian Food Inspection Agency](http://www.inspection.gc.ca/food/fish-and-seafood/manuals/standards-and-methods/eng/1348608971859) (2011). Bacteriological Guidelines for Fish and Fish Products. Fish Products Standards and Methods Bacteriological Guidelines for Fish and Fish Products.
Disponible en: <http://www.inspection.gc.ca/food/fish-and-seafood/manuals/standards-and-methods/eng/1348608971859> /1348609209602?chap=7#s17c7, Fecha de consulta: 01/09/2013.
9. CARU, Comisión Administradora del Río Uruguay (2006). Guía ilustrada de las especies más comunes del río Uruguay inferior y el embalse de Salto Grande. Disponible en: http://www.caru.org.uy/web/pdfs_publicaciones/Peces-del-Rio-Uruguay.pdf, Fecha de consulta: 01/09/2013.
10. CARU, Comisión Administradora del Río Uruguay (2010). Programa de conservación de la fauna ictica y los recursos pesqueros del río Uruguay, Informe anual 2009. Disponible en: http://www.caru.org.uy/web/pdfs_publicaciones/Programa%20De%20Conservacion%20De%20La%20Fauna%20Ictica%20Y%20Los%20Recursos%20Pesqueros%20Del%20Rio%20Uruguay.pdf, Fecha de consulta: 16/09/2013

11. Carro, S. (2006). Aislamiento de bacterias lácticas con propiedades bacteriocinogénicas y antitumorales presentes en alimentos fermentados (quesos) de elaboración artesanal en la zona de Colonia, Uruguay. Programa Nacional INIA, Área- Bovinos de Leche. Montevideo, Fac. de Vet., 38p.
12. Corbo Chordi A., Pala Rivas T.,(2008). X Curso de Microbiología de los Alimentos. Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, España. Disponible en: <http://www.usal.es>, Fecha de consulta: 01/09/2013
13. Cousin, M. A., Jay J.M., Vasavada P.C (2001). Psychrotrophic microorganisms. En: D.S. Splittstoesser, C. Vandezant 4ª ed., Washington D.C., American Public Health Association, p159-166.
14. Ching, C., (2006). Mal sabor en el camarón de cultivo - *Litopenaeus vannamei* Disponible en: http://www.alicorp.com.pe/ohs_images/nicovita/boletines/2006/abril-junio2006.pdf, Fecha de consulta: 01/09/2013.
15. Defeo, O., Puig, P., Horta, S. and de Álava, A.(2011). Coastal fisheries of Uruguay. En: S. Salas, R. Chuenpagdee, A. Charles, J.C. Seijo (eds). Coastal fisheries of Latin America and the Caribbean, FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 544. Rome, FAO. p357–384.
16. Directiva del Consejo de la Unión Europea (2003). Normativa de la Unión Europea (UE91/493/CEE. Disponible en: http://www.aesan.mssi.gob.es/CRLMB/docs/docs/legislacion_comunitaria/directiva91_493.pdf, Fecha de consulta: 17/10/2013.
17. Dragonetti Saucero, J.P. (2008), Guía ilustrada para la evaluación de la frescura en productos de la pesca. Montevideo, Facultad de Veterinaria, 119p.
18. Dragonetti, J.P. Puentes, R.; Friss de Kereki, C. (2003), Informe de avanzada sobre el estudio de bases nitrogenadas volátiles totales en especies acuáticas emergentes en el mercado nacional. IV Jornadas Técnicas de Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay, p.7(abstract).
19. Espinach, A.; Sverlij, S.; Gil Morlis, W.; Liotta, J.; Frutos, A. (2008), *Salminus Brasiliensis*. Disponible en: <http://www.proteger.org.ar/peces-cuencaplata/especies/salminus-brasiliensis>, Fecha de consulta: 01/09/2013.
20. FAO (2012), El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Disponible en: www.fao.org/docrep/016/i2727s/i2727s01.pdf, Fecha de consulta: 01/09/2013.
21. FAOSTAT (2012), Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/610/DesktopDefault.aspx?PageID=610#ancor> Fecha de consulta: 01/09/2013.
22. FDA, Food and Drug Administration (2013), Bad Bug Book (BBB) Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook *Aeromonas hydrophila* Disponible en:

<http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/CausesOfIllnessBadBugBook/ucm070523.htm>, Fecha de consulta: 01/09/2013.

23. Foti, R., Spinetti, M., Mesones, C. (2010). Pesquerías artesanales en: Programa de conservación de la fauna ictica y los recursos pesqueros del río Uruguay. Informe anual 2008. CARU-DINARA- SAGyP , p27-45.
Disponible en: <http://www.caru.org.uy/Informe%20CARU%202008%20ultimo%20INTEGRADO%20PARA%20WEB.pdf>, Fecha de consulta: 02/09/2013.
24. Frazier W. C., (1993) Microbiología de los Alimentos, 4ª ed., Zaragoza, Acribia, 681p.
25. Garcia Macías Jose Arturo, (2003), "Microbiology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) surface tissue and of the water production ponds", Disponible en: http://investigacion.izt.uam.mx/rehb/publicaciones/13-2PDF/111-118_garcia.pdf.
Fecha de consulta: 01/09/2013.
26. Gonzáles Rodríguez M.N., Sanz J.J. (2002), Foodborne pathogenic bacteria in prepackaged fresh retail portions of farmed rainbow trout and salmon stored at 3°C, International J. Microbiol. 76:135-141.
27. Google maps, Disponible en: <http://maps.google.com.uy/maps?hl=es-419&tab=wl>
Fecha de consulta: 01/09/2013.
28. Guerin P.J., B. de Jong (2004), Outbreak of *Salmonella livignstone* infection in Norway and Sweden to contaminated processed fish products. Epidemiol. Infect., 132:889-895.
29. Heinitz, Maxine L., Ruble, Ramona D. (2000). Incidence of Salmonella in Fish and Seafood. J. Food. Prot., 63:579-592.
30. Herrera Arias F., Santos J.A., (2005), Prevalencia de *Salmonella spp.* en pescado fresco expendido en Pamplona (Norte de Santander), Bucaramanga, Rev. Fac. de Ciencias Básicas 3(2):34-42.
31. Herrera Arias F., Suarez W., (2012). Determinación de factores de virulencia en cepas de *Aeromonas spp.*, aisladas a partir de pescado. Rev.MVZ Córdoba 17(1) 2846-2851.
32. Herrera, F.C, Santos, J.A., Otero, A. and Garcia L (2006), Occurrence of foodborne pathogenic bacteria in retail prepackaged portions of marine fish in Sapin, J Appl Microbiol., 100:527-536.
33. Huss, H. (1997). Aseguramiento de la calidad de los productos pesqueros. FAO Documento Técnico de Pesca nº 334. Roma, FAO, 174p.

34. Huss, H. (1998). El pescado fresco su calidad y cambios de su calidad. Documento técnico de pesca de pesca n°348. Roma, FAO, 202p.
Disponible en:
<http://www.fao.org/docrep/V7180S/v7180s06.htm#5.3cambios bacteriológicos>, Fecha de consulta: 01/09/2013.
35. James M. Jay, Martin J. Loessner, Golden D. (2009), Microbiología moderna de los alimentos, 5ª ed, Zaragoza, Acribia, 767p
36. James N. Miller, Jane C. Miller (2002). Estadística y Quimiometría para Química Analítica, 4ª ed, Madrid, Pearson Educación, 296p.
37. Kubitzka, F. (1999) Calidad del pescado. Panorama da Aquicultura. SAGPyA.
Disponible en: www.produccion-animal.com.ar Fecha de consulta: 4/09/2013
38. Lima dos Santos C. A. (2012). Enfermedades transmitidas por pescado ¿Qué pasa en el Sur?, Infopesca Int. n°51, pp11-15.
Disponible en:
<http://www.infopesca.org/sites/default/files/complemento/revista/hipervisor/51/data/pa ges/51.pdf>, fecha de consulta: 29/10/2013
39. Majano M. A., Fariñas B. L., (2009), Caracterización fenotípica de bacilos gramnegativos anaerobios facultativos oxidasa positivos, aislados de pacientes con enfermedad diarreica aguda en Cuba. Rev.Biomed., 20:25-32.
40. Molina, M. R., Garro, O. A., Judis, M. A (2000), Composición y calidad microbiológica de la carne de surubí. Comunicaciones científicas y tecnológicas. Argentina. Universidad nacional del nordeste. Disponible en:
http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2000/8_exactas/e_pdf/e_032.pdf,
Fecha de consulta: 04/09/2013
41. Moreno M., Yelitza Medina L., Álvarez Rivera J., Obregón J.M., Medina G., (2006), "Detection of *Plesiomonas shigelloides* by PCR in feral (*Oreochromis mossambicus*) and cultured tilapias (Tetrahybrid of *O. mossambicus* × *O. urolepis hornorum* × *O. niloticus* × *O. aureus*) en Venezuela". Revista Científica, 16 (5): 459-465p, Universidad del Zulia, Venezuela. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95916502>, Fecha de consulta: 01/09/2013.
42. Normas Mercosur (2003). "Identidad y calidad de pescado fresco", Washington D.C En MERCOSUR/GMC/RES N° 40/94
Disponible en:
http://www.mercosur.int/innovaportal/v/387/1/secretaria/busqueda_en_la_base_de_datos_documental, Fecha de consulta: 01/09/2013.
43. OMS (2005), Manual de Bioseguridad en Laboratorios. Clasificación de microorganismos según Grupos de Riesgo, 3a ed., Ginebra
Disponible en:
http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS_CSR_LYO_2004_11SP.pdf , Fecha de consulta: 01/09/2013.

44. Organización Internacional de Normalización (Suiza). ISO 9308-2: Water quality- Detection and enumeration of coliform organism, thermotolerant coliform organism and presumptive *Escherichia coli* - Part 2 Multiple tube (most probable number) method. Ginebra: ISO,1990.
45. Organización Internacional de Normalización (Suiza). ISO 4833: Microbiology of food and animals feeding stuffs Horizontal method for the enumeration of microorganisms Colony count technique at 30 °C. Ginebra: ISO, 2003.
46. Organización Internacional de Normalización (Suiza). ISO 7218: Microbiology of food and animals feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations. Ginebra: ISO, 2007.
47. Organización Panamericana de la Salud (2002). "Enfermedades Transmitidas por Alimentos en Uruguay". Disponible en: <http://www.bvsops.org.uy/pdf/etas.htm>
Fecha de consulta: 29/10/2013
48. Pinnacchio G., (2011), Evaluación sensorial de la frescura en peces de importancia comercial del rio Uruguay, Montevideo Tesis de grado, Fac. de Vet. 63p.
49. Ravn B. Jorgensen, D.M. Gibson, H.H. Huss (1988). Microbiological quality and shelf life prediction of chilled fish. International J. Food Microbiol, 6: 295-307.
50. Romero Cabello R., (2007). Microbiología y Parasitología Humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias, 3ª ed, México D.F., Méd Panamericana 1725p.
51. Sabha S., Atlante Brandão D., Castagna de Vargas A., Matiuzzi da Costa M., Foletto Pedrozo A.; (2000), Bacterias com potencial patogénico nos rins e lesioes externas de jundias (*Rhombdia quelen*) cultivados en sistema semi intensivo Ciencia Rural, 30 (2): 293-298. Universidad de Federal de Santa Maria, Brasil. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33113560016>, Fecha de consulta: 01/09/2013.
52. Sistema de identificación de *Enterobacteriaceae* y otros bacilos gramnegativos no exigentes (2012). API20E, BIOMÉRIUX SA. Disponible en: www.biomeriux.com
Fecha de consulta: 01/09/2013.
53. Texeira de Mello, F., Gonzáles-Bergonzoni. I., Loureiro, M., (2011) Peces de agua dulce del Uruguay. Disponible en: <http://www.dicyt.gub.uy/dcc/data/material/peces-de-Uruguay-2011-version-imprenta.pdf>, Fecha de consulta: 01/09/2013.




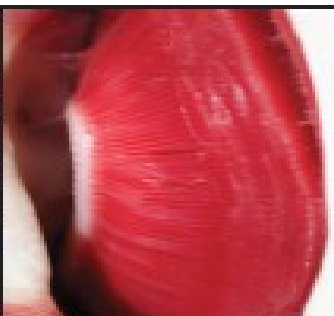







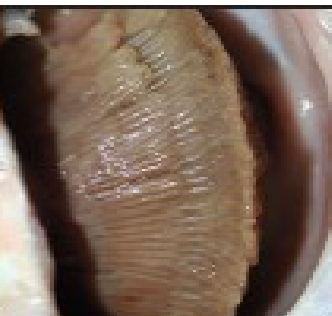
54. Uruguay (1979), Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, DINAMA, en rlau Decreto 253/79. Disponible en:
http://www.dinama.gub.uy/rlau/index.php?option=com_docman&task=doc_details&gid=56&Itemid=60, Fecha de consulta: 01/09/2013.
55. Uruguay (1982), Dirección Nacional de Recursos Acuáticos, Nelson Avdalov. Estudio sobre factores que afectan la calidad de la merluza fresca. , Inape - Informe Técnico N° 27. Disponible en:
http://www.dinara.gub.uy/web_dinara/images/stories/publicaciones/inf_tec_27.pdf.
Fecha de consulta: 01/09/2013.
56. Uruguay (2010), Dirección Nacional de Recursos Acuáticos. Boletín Estadístico Pesquero 2009 / Uruguay – Montevideo: MGAP-DINARA, 2010. 52p. Disponible en:
http://www.dinara.gub.uy/web_dinara/images/stories/file/Boletin_Estadistico_Pesquero_2009.pdf, Fecha de consulta: 01/09/2013.
57. Uruguay (2012) Reglamento Bromatológico Nacional. Decreto N°315/94, 5ª ed, Montevideo, IM.P.O. 648p.
58. Uruguay (2012), Dirección Nacional de Recursos Acuáticos, Disponible en:
<http://www.dinara.gub.uy/web>, DINARA, Fecha de consulta: 01/09/2013.
59. Youssef H., Eltimawy A.K., (1992). Role of aerobic intestinal pathogens of fresh water fish in transmission of human Diseases. J.Food.Prot 55:739-740 (abstract).

ANEXOS

ANEXO1- (adaptado de Pinnacchio G., 2011).

		Prochilodus lineatus			
		ESCALA			
		0	1	2	3
Apariencia	Piel	Superficie lisa Sin lesiones Moco acuoso	Puede presentar pequeña erosiones o zonas descamadas	Aspecto seco Escamas ligeramente cóncavas	Aspecto seco Opaca
	General	Gris / azulado en lateral epiaxial, gris claro en línea media y amarillo claro / blanco brillante en zona hipoaixial. Gran iridiscencia	Iridiscente Intensos, definidos y brillantes	Colores menos firmes y brillantes mas evidente en zona hipoaixial Menor iridiscencia	Gris uniforme en zona lateral, con tonos castaños en región hipoaixial. Poco definidos. Opacos
Olor		Muy suave	Suave olor a tierra húmeda	Ligero olor a "carnicería"	Olor fuerte, a vísceras de pollo
Ojos		Convexos Pupila negra, brillante	Convexos. Menos brillante y definidos Pupila negra	Planos Trastúcidos Pupila azulada	Enofalmia Opacos Pupila gris
Branquias	color	Rojo intenso y brillante. Fina capa de moco transparente y brillante	Rojo brillante. Moco transparente y filante	Rosado con zonas pardas. Moco ligeramente grumoso	Castaño claro con moco espeso
	Olor	Ligero a hierbas frescas	Ligeramente mohoso	Medianamente intenso a barro	Fuerte olor a cadáver Muy desagradable Nauseabundo





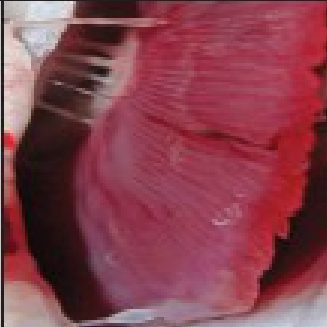




ANEXO 2-(Adaptado: Pinnacchio G., 2011)

ATRIBUTO		SÁBALO (<i>Prochilodus lineatus</i>)			
		Apariencia general	Color	Ojos	Branquias
Escala 1	Fresco				
Escala 2	Límite aceptable				
Escala 3	Podrido				

ANEXO 3- (Adaptado: Pinnacchio G., 2011)

		Leporinus obtusidens			
		ESCALA			
		0	1	2	3
 Apariencia	 Piel	Lisa Sin lesiones	Puede presentar Zonas descamadas coincidentes con el enmalle	Ligeramente opaca Zonas mas oscuras en área de lesión	Piel seca deslucida
	 Color	Zona epiaxial gris oscuro, naranja rojizo en líneas media, zona hipo- axial dorado a blanco nacarado. Brillantes Aletas naranja fuerte	Escasa iridiscencia. Brillantes, definidos e intensos	Sin iridiscencia. Mas opacos Menos definidos	Sin iridiscencia. Mas opacos muy poco definidos Aletas castaño
 Olor		Ligero a hierbas frescas	Levemente mohoso	Intenso a barro	Muy fuerte a barro mezclado con olor a carne rancia
 Ojos		Convexos Pupila negra Mancha roja intensa y brillante en esclerótica	Planos Pupila negra	Ligeramente hundidos Turbios, colores poco definidos Pupila gris oscura	Muy hundidos , blancos muy opacos Pupila azulada daro difuso
	 color	Rojo muy intenso y brillante	Rojo bien definido Moco filante y transparente	Rojo mas suave, algo brillante. Moco mas espeso distribuido en toda la superficie	Poco cambio de color. Rojo pálido sin brillo
 Branquias		Suave	Muy leve a carne	A carne rancia	Muy fuerte a achuras podridas ácido al final
	 Olor				

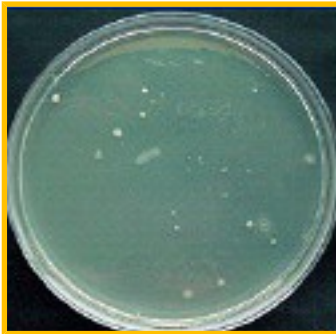
ANEXO 4- (Adaptado: Pinnacchio G., 2011)

BOGA (<i>Leporinus obtusidens</i>)		Apariencia general		Color	Ojos	Branquias
		ATRIBUTO				
Escala 1	Fresco					
Escala 2	Límite aceptable					
Escala 3	Podrido					

ANEXO 5

1° Paso

RECuento DE AEROBIOS MESÓFILOS TOTALES EN PCA (Plate Count Agar)



2° Paso

IDENTIFICACIÓN EN PLACA

tipo 1: crema ,2,0 mm a 3mm

bordes regulares, convexa

tipo 2: crema, 1,0 mm

bordes regulares,

convexa

tipo 3: amarillas,

1mm

bordes regulares, convexa

3° Paso

PRUEBAS DE OXIDASA Y CATALASA



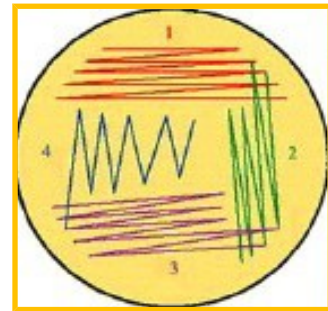
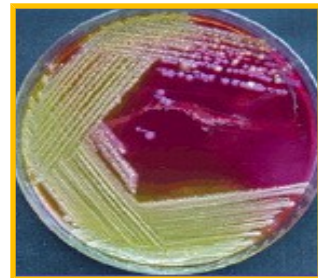
4° Paso

TINCION GRAMObservación
microscópica

5° Paso

Las colonias aisladas bacilos gramnegativas, Oxidasa y Catalasa positivo
se les realizo aislamiento en BHI agar por agotamiento en estrías

también se inocularon en caldo Lauryl triptosa

Lactosa al
5%Obtención de cultivo
Puro (fig. ilustrativa)

6° Paso

a partir de la colonia aislada de un cultivo puro se prepara la suspensión y se inocula el sistema miniaturizado API 20E



7° Paso

Lectura en software e
identificación
a partir del perfil
numérico

Fotos ilustrativas

ABREVIATURAS

ADP: Adenosin difosfato

AMP: Adenosin monofosfato

ATP: Adenosin trifosfato

Aw: Actividad agua

BNVT: Bases nitrogenadas volátiles totales

Etas: Enfermedades Transmitidas por alimentos

GEO: Geosmina

Hx: Hipoxantina

IMP: Inosin monofosfato

NNP: Nitrógeno no proteico

NMP: Numero Más Probable

MED: Microorganismos específicos del deterioro

OTMA: Óxido de trimetilamina

PBI: Producto bruto interno

PCA: recuento en placa de agar

pH: Potencial de hidrogeniones

TMA: Trimetilamina