

PESCADOS Y MARISCOS

La composición del músculo de pescado es muy variable y depende de la especie, tamaño y estación del año. En general, la carne de pescado contiene 20-25% de proteínas de alto valor biológico, vitaminas (tiamina, vitamina B₁₂, riboflavina, ácido pantoténico, ácido fólico, niacina y piridoxina) y minerales (yodo, sodio, potasio, fósforo, calcio, magnesio, hierro, flúor, manganeso, cloro, azufre, etc.). El contenido graso varía con la especie (4 a 8%) y está constituido por triglicéridos y fosfolípidos. Es pobre en hidratos de carbono.

El pH del pescado inmediatamente después de su captura es neutro, luego desciende a 6,2-6,5 para luego subir a 6,6-6,7. Este parámetro contribuye a la inestabilidad del pescado luego de su muerte porque estos valores de pH favorecen el desarrollo microbiano.

Las capas internas del músculo se consideran, como en los casos anteriores, estériles. Las bacterias del pescado fresco se encuentran en tres puntos principales: limo externo, agallas e intestinos. La microbiota del pescado es psicotolerante y en el caso de los pescados de mar, halofílica (1).

Los microorganismos que acompañan al pez vivo dependen del ambiente natural en el que habita y las especies aisladas del intestino son las mismas que las de las aguas donde es capturado. Salvo que se pesquen en aguas contaminadas, raramente son fuente de microorganismos patógenos.

La incidencia de microorganismos en gambas, ostras y almejas, depende en gran parte de la higiene de las aguas en las que se capturan. Estos moluscos se alimentan por filtración y tienden a extraer y acumular los virus y bacterias del agua en la que viven (2).

DETERIORO

El deterioro de los pescados es debido principalmente a la autólisis, la oxidación química de lípidos, el crecimiento bacteriano y el metabolismo resultante en la formación de compuestos de olor desagradables, siendo estos últimos los más importantes. Sin embargo, no todos los microorganismos presentes son igualmente causantes de los cambios de calidad.

Los hábitos alimenticios de los peces, la zona geográfica, la estación, la temperatura del agua, el tipo de pez, el lugar donde los pescados son capturados y las condiciones de almacenamiento, que incluyen la temperatura y la composición de la atmósfera del envase, determinan la presencia de los microorganismos específicos de la alteración (3).

El principal signo de deterioro es el mal olor que se percibe al examinar las agallas, pues la región branquial es la más susceptible a la alteración microbiana. Los mejores indicadores de la alteración del pescado son la pérdida del brillo de los ojos y los colores superficiales, cambios en el olor y presencia del limo superficial.

Si el pescado no es eviscerado de inmediato, algunos organismos atraviesan las paredes del intestino y llegan a los tejidos internos de la cavidad abdominal. La evisceración y el fileteado pueden extender la microbiota intestinal sobre toda la superficie (1).

Photobacterium sp, *Shewanella putrefaciens*, *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas* spp, *Aeromonas* spp y bacterias lácticas son miembros de microbiota de los pescados de agua templada. Sin embargo, *S. putrefaciens* es el organismo específico del deterioro de los pescados y mariscos de agua fría marina almacenados sobre hielo, produciendo trimetilamina y sulfuro de hidrógeno. Por otra parte, *Photobacterium* sp. causa la alteración bajo condiciones de atmósfera modificada (3, 4).

Pseudomonas spp y *Shewanella* spp son los agentes específicos del deterioro de pescados de agua mar templada, mantenidos en hielo. *Pseudomonas fluorescens* y *P. lundensis* son las especies predominantes mientras que *P. fragi* y *P. putida* son detectadas con menos frecuencia. La temperatura de almacenamiento y la composición de la atmósfera afecta la proporción de las especies mencionadas en la población final del pescado (3).

Listeria monocytogenes está presente en el 7 a 18% de los productos pesqueros (5). Otros géneros, en su mayoría psicrotrofos, que suelen ser aislados de los productos de mar son *Achromobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Proteus*, *Serratia*, *Sarcina* y *Vibrio* (1). También suelen encontrarse especies de *Mycobacterium* en el pescado congelado (6).

En las aguas contaminadas con estiércol se ha observado un aumento del número de *Acinetobacter* spp y otras bacterias resistentes a los antimicrobianos (7).

El pescado deshidratado con sal y ahumado (por ejemplo bacalao) posee un actividad de agua tan baja que solo es alterado por mohos y algunas bacterias halófilas, por ejemplo *Halobacterium* (1).

MICROORGANISMOS PATÓGENOS

Los peces capturados en mar abierto están exentos de patógenos entéricos, mientras que los de agua dulce están expuestos a la contaminación procedentes del hombre y otros animales (2).

Las bacterias productoras de aminas vasopresoras (escombrotóxina), como histidina y otras, son en su mayor parte enterobacterias mesófilas, entre ellas *Proteus morgani*, *Hafnia alvei* y *Klebsiella pneumoniae*. La conservación del pescado a 0°C impide la formación de estos compuestos (2).

Clostridium botulinum tipo E puede crecer y sintetizar toxinas a 3°C y la prevalencia en pescado crudo varía de 10 a 40% según las especies y en los productos envasados al vacío es 5%, por lo que constituye un riesgo en la industria pesquera (8).

Vibrio parahaemolyticus, *V. cholerae* y *V. vulnificus* son las principales especies de vibrios causantes de las infecciones relacionadas a los pescados y mariscos (9). También se suelen aislar *Salmonella* y *Shigella* aunque no sean contaminantes normales del pez (2).

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista que puede iniciar algunas infecciones en personas con las defensas bajas y las cepas patógenas tienen una alta resistencia a los antibióticos debido a un plásmido (2). Las especies de *Aeromonas* son patógenos para peces pero *A. hydrophila* y *A. sobria* son enterotoxigénicas para el hombre (10).

Los patógenos humanos son retenidos por las ostras sin o con mínima inactivación. Como la velocidad de depuración es muy baja pueden representar un peligro para la salud pública si son criadas en aguas contaminadas. Las ostras suelen transmitir oquistes de *Cryptosporidium parvum*, quistes de *Giardia lamblia*, esporos de microsporidios *Encephalitozoon* spp (11).

El pescado alberga numerosos parásitos que, en su mayoría, no suelen afectar al hombre. Sin embargo, *Anisakis* es un nemátodo que se encuentra en la musculatura de los peces y sobrevive a la congelación. Se ingiere con el pescado crudo, adobado o ahumado en frío, o poco cocinado. Otros parásitos son las tenias *Diphyllobothrium latum*, en el hemisferio norte, y *D. pacificum*, en América del Sur, que son transmitidas al hombre por el pescado crudo (2).

La intoxicación paralizante es causada por mejillones, ostras, berberechos y almejas que han incorporado a su organismo algas tóxicas. Aparece a la media hora después de la ingestión, causando síntomas neurológicos que en el 20% de los casos conducen a la muerte. Las saxitoxinas son producidas por especies de *Gonyaulax*, *Gymnodinium* y *Pyrodinium* (2).

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Los metabolitos producidos por los microorganismos (trimetilamina y ácidos grasos) se pueden usar como indicadores de una alteración inminente de los productos de pesca.

RECuento DE ORGANISMOS PSICROTROFOS

Mantener las muestras a 5°C hasta el momento de procesarlas.

Tomar 10 g de la muestra molida, o el material obtenido por extracción de una capa superficial o por hisopado, y colocarlo en una bolsa plástica con 100 mL de peptona al 0,1% u otro diluyente. Agitar y masajear la superficie durante 2 minutos.

Si se trata de una muestra congelada colocarla en una bolsa plástica estéril y una vez descongelada extraer con una jeringa estéril 10 mL de líquido. Medir el volumen del líquido remanente.

Hacer diluciones decimales (10^{-1} a 10^{-6}) en el mismo diluyente. Depositar 0,1 mL de las diluciones en sendas placas de agar para recuento en placa o agar-glucosa-triptona-levadura y distribuir el inóculo con una varilla de vidrio en L. Incubar a 17°C durante 16 hs y luego 3 días a 7°C.

Contar las colonias de las placas que presentan 30 a 300 de bacterias o de las que muestran 15 a 150 colonias fúngicas. Multiplicar el número obtenido por el factor de dilución correspondiente para obtener las ufc/g o cm^2 (12).

PRESENCIA-AUSENCIA DE *Vibrio cholerae* y relacionados

Preparar la dilución 1/10 de la muestra en diluyente e incubar durante 4 - 6 horas a 30°C. Agregar igual volumen de agua peptona alcalina de concentración doble. Incubar a 37°C durante 6 horas.

Sembrar por agotamiento en estría sobre agar TCBS. Incubar a 37°C durante 24 horas. Observar las colonias de 2 a 3 mm de diámetro, color amarillo, lisas, con centro opaco, periferia traslúcida, sin halo negro.

AGUA PEPTONA ALCALINA (doble concentración). Triptona 30 g, extracto de levadura 10 g, cloruro de sodio 20 g, agua 1 litro, pH 8,6.

AGAR TCBS. Peptona 10 g, extracto de levadura 5 g, tiosulfato de sodio 10 g, citrato de sodio 10 g, bilis 8 g, sacarosa 20 g, cloruro de sodio 10 g, citrato de hierro 1 g, azul de bromotimol 0,04 g, azul de timol 0,04 g, agar 15 g, agua 1 litro, pH 8,6. Calentar a ebullición para disolver los ingredientes, enfriar a 50°C y volcar en cajas de Petri estériles (2).

CUADRO 1. Valores de referencia para filetes de pescado fresco y camarones congelados (2)

n=10, c=1	Filetes de pescado fresco	Camarones precocidos congelados
Recuento de psicrotrofos	m=10 ⁶ M=10 ⁷	-
Recuento de colonias a 30°C	-	m=10 ⁵ M=10 ⁶
<i>Escherichia coli</i>	m=10 M=10 ²	-
<i>Enterobacteriaceae</i>	m=10 ³ M=10 ⁴	m=10 M=10 ²
<i>L. monocytogenes</i>	-	ausente en 25 g
<i>S. aureus</i>	m=10 ² M=10 ³	m=10 ² M=10 ³
<i>Salmonella</i>	ausente en 25 g	ausente en 25 g
<i>Shigella</i>	-	ausente en 25 g
<i>Vibrio</i> spp. enteropatógenos	-	ausente en 25 g
<i>V. parahaemolyticus</i>	ausente en 25 g	-

Algunos de los análisis indicados en el cuadro 1 no son practicables en los laboratorios de rutina y otros sólo tienen importancia si los productos son consumidos crudos (2).

PRESENCIA-AUSENCIA DE *Vibrio parahaemolyticus*

Preparar la dilución 1/10 de la muestra en diluyente salado e incubar durante 4 - 6 horas a 30°C. Agregar igual volumen de caldo Horie de concentración doble. Incubar a 37°C durante 24 horas.

Sembrar por agotamiento en estría sobre agar TCBS. Incubar a 37°C durante 24 horas. Observar las colonias de 2 a 3 mm de diámetro, redondas, opacas, verdosas o azuladas, sin centro de color negro y rodeadas de un halo verde.

DILUYENTE SALADO. Peptona 1 g, cloruro de sodio 20 g, agua 1 litro. Esterilizar a 120°C durante 20 minutos.

CALDO DE HORIE. Triptona 10 g, extracto de carne 6 g, cloruro de sodio 60 g, azul de bromotimol 0,06 g, violeta de etilo 0,002 g, agua 1 litro, pH 9,0. Calentar a 100°C durante 30 minutos. Enfriar y agregar 20 mL de arabinosa al 25% esterilizada por filtración (2).

RECuento DE *Pseudomonas* spp.

Preparar la dilución 1/10 de la muestra en solución diluyente y dejar durante 4 - 6 horas a 30°C. Agregar un volumen igual de caldo NF de doble concentración e incubar a 42°C por 24 horas.

Sembrar 0,1 mL sobre agar CFC e incubar a 25°C durante 48 horas. Observar las colonias irregulares, incoloras o de tonos verde azulado o pardo.

Son bacilos Gram-negativos, con flagelos polares, oxidasa-positivos, oxidantes de glucosa y no fermentativos.

CALDO NF. Triptona 30 g, cloruro de sodio 10 g, agua 1 litro, pH 7,2. Esterilizar a 120°C durante 20 minutos. Enfriar a 50°C y agregar 100 mL de nitrofurantoína al 0,2% en polietilén-glicol.

AGAR CFC. Peptona 16 g, hidrolizado de caseína 10 g, sulfato de potasio 10 g, cloruro de magnesio 1,4 g, agar 15 g, agua 1 litro, pH 7,2. Esterilizar a 120°C durante 20 minutos. Enfriar a 50°C y agregar la mezcla de cetrimida 10 mg, fucidina 10 mg y cefaloridina 50 mg disueltos en 5 mL de etanol al 50%. Agitar y verter en cajas de Petri (2).

Se suele mantener a los moluscos bivalvos durante un tiempo en agua potable para que se depuren por sí solos. Resulta imposible hacer un análisis microbiológico de los mejillones, ostras y almejas, por la gran variedad de patógenos que potencialmente transmiten. Se exige, y es alcanzable, un valor de *E. coli* menor a 10 ufc/g en el agua del criadero. La

presencia de enterococos en número mayor que 10^2 ufc/g puede ser un índice de la presencia del virus de la hepatitis A (2).

PRESENCIA-AUSENCIA DE *Aeromonas* spp.

Mantener las muestras a 5°C hasta el momento de procesarlas. Inocular 1 mL de la dilución 1/10 de la muestra en 9 mL de diluyente y dejar durante 6 horas a la temperatura ambiente. Agregar 10 mL de medio de enriquecimiento concentrado. Incubar a 30°C durante 24 horas.

Sembrar por agotamiento en estría sobre agar AD. Incubar a 30°C durante 24 horas. Después inundar la placa con solución de yodo durante 2 minutos.

Si se observan colonias con un halo claro sobre el fondo rojo púrpura se presume la presencia de especies de *Aeromonas* sp.

AGAR AD. Triptona 2,5 g, extracto de levadura 1 g, dextrina 5 g, cloruro de sodio 1,5 g, cloruro de potasio 1 g, sulfato de magnesio hidratado 0,1 g, cloruro férrico 0,05 g, desoxicolato de sodio 0,005 g, agar 7,5 g, agua 500 mL. Disolver y agregar 4,5 mL de azul de bromotimol al 1% y 4,5 mL de NaOH 5N diluido al 1% (pH 8). Esterilizar a 120°C durante 15 minutos. Enfriar a 50°C, añadir 5 mL de ampicilina al 0,1% esterilizada por filtración y volcar en cajas de Petri (2).

PRESENCIA-AUSENCIA DE *Shigella* spp.

Colocar dos porciones de 25 de muestra en sendos recipientes 225 mL de diluyente estéril, agitar bien e incubar 2 a 4 hs a 30°C. Añadir, a ambos, igual volumen de medio de enriquecimiento concentrado. Incubar uno a 37°C y otro a 42°C. durante 24 horas.

Sembrar alícuotas en placas de agar XLDN incubando una a 37°C y otra a 42°C.

Si se observan colonias sin centro negro pero con halo rojo se presume la presencia de *Shigella* sp (2).

Los crustáceos (camarones, etc) son cocidos, pelados a mano y congelados. Este proceso facilita la recontaminación con estafilococos, listerias y patógenos fecales (1).

Las especies de *Vibrio* son anaerobios facultativos, crecen en medios alcalinos con sales biliares y algunas son halófilas estrictas. *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* habitan los ambientes marinos costeros templados (12).

CUADRO 2. Características de alguna enterobacterias sobre medios selectivos (2, 12).

Bacteria	Medio	Aspecto de la colonia
<i>Shigella</i>	Mac Conkey	Incolora
	Hektoen	Verde
	XLD	Sin centro negro y con halo rojo
<i>Salmonella</i>	Mac Conkey	Incolora
	Hektoen	Verde
	XLD	Con centro negro y halo rojo
<i>E. coli</i>	Mac Conkey	Chatas, rosadas con halo más intenso
	Hektoen	Amarillo
	XLD	Amarillo

El Código Alimentario Argentino establece en el art 276 que los moluscos bivalvos y gasterópodos no deben contener más de 400 unidades ratón de toxinas /100 g de pulpa húmeda (80 µg /100 g) determinado por la técnica de Sommer y Meyer (AOAC 14° ed. Cap 18, ítem 086 a 092) (13).

REFERENCIAS

1. ICMSF. 1998. Microorganisms in foods. 6. Microbial ecology of food commodities. Blackie Academic & Professional, London, p 130.
2. Mossel DAA *et al.* 2003. Microbiología de los Alimentos. 2ª ed. Acribia, Zaragoza, p 518, 620, .
3. Tryfinopoulou P *et al.* 2002. Appl Environ Microbiol 68: 65-72
4. Norton DM *et al.* 2001. Appl Environ Microbiol 67:198-205
5. Mediel MJ *et al.* 2000. Appl Environ Microbiol 66: 3637-3638
6. Petersen A *et al.* 2002. Appl Environ Microbiol 68: 6036-6042
7. Vogel BF *et al.* 2005. Appl Environ Microbiol 71: 6689-6697
8. Hyytia E *et al.* 1999 Appl Environ Microbiol 65: 2057-2064
9. Gonzalez Excalona N *et al.* 2005. Emerg Infect Dis 11: 129-131
10. Santos Y *et al.* 1988. Infection and Immunity 56: 3285-3293
11. Graczyk TK *et al.* 2006. Appl Environ Microbiol 72: 3390-3395
12. Downes FP, Ito K, eds. 2001. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4° ed, APHA, Washington, p 159, 405.
13. Código Alimentario Argentino. Cap 6. <http://www.anmat.gov.ar/codigoa/caa1.htm>