

Microorganismos Patógenos en productos de origen marino elaborados en Comodoro Rivadavia

Estevao Belchior, Silvia ¹; Pucci, Oscar H. ²

Centro de Estudios e Investigaciones en Microbiología aplicada (C.E.I.M.A.). Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.

Km. 4, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.

(9000) Comodoro Rivadavia. Chubut - Argentina

Tel/Fax: 0297 - 4550339 int.31.

Autor al que se dirigirá la correspondencia:

Bioq. Silvia Estevao Belchior

Km. 4, C.E.I.M.A., Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.

(9000) Comodoro Rivadavia. Chubut - Argentina

Tel/Fax: 0297 - 4550339 int.31 - E-mail: sbelchior@unpata.edu.ar

RESUMEN: El objetivo de este trabajo es detectar la presencia de microorganismos contaminantes en productos de origen marino, capaces de producir enfermedades transmitidas por alimentos.

Se procesaron 18 merluzas, 70 filetes de merluza, 20 milanesas de filete de merluza crudas, 17 bloques congelados de filete de merluza, 14 muestras congeladas de pulpa de centolla, 5 muestras congeladas de salmón en salsa, 5 bloques congelados de minced y 20 muestras de harina de pescado.

Los microorganismos que se buscaron fueron: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* enteropatógena, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.* y *Clostridium perfringens*.

En muestras de pescado entero, filete de merluza, milanesas de merluza y harina de pescado desarrollaron microorganismos potencialmente patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* y *Pseudomonas aeruginosa*. La presencia de estos microorganismos implicaría un peligro potencial para la salud del consumidor si las condiciones de almacenamiento de los productos alimenticios fueran inadecuadas. No se detectaron microorganismos patógenos en los productos congelados.

Palabras claves: Alimentos marinos - Patógenos - Enfermedades transmitidas por alimentos.

SUMMARY: Pathogens microorganisms in seafood manufactured in Comodoro Rivadavia. Estevao Belchior, Silvia ¹; Pucci, Oscar Héctor ² The occurrence of bacteria associated with foodborne diseases in seafood were investigated in this study. Samples of fresh hakes (18), refrigerated hake filets (70), raw scallops of hake fillet (20), frozen packed of hake fillet (17), frozen packed of large crab (14), frozen salmon in sauce samples (5), minced samples (5) and fish meal (20), were analyzed for the occurrence of *Staphylococcus aureus*, enteropathogenic *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.* and *Clostridium perfringens*. Bacteria potentially pathogen such as *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Clostridium perfringens*, were isolated from fresh hakes, refrigerated hake filets, raw scallops of hake fillet and fish meal samples. The occurrence in these samples of these bacteria, represents a potential risk for consumer health if the storage conditions would be incorrect.

Key words: Seafood - Pathogens - foodborne diseases.

¹ Profesora Adjunta de la Cátedra Microbiología Clínica. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina.

² Profesor Titular de la Cátedra Microbiología General. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina.

Introducción

Las enfermedades transmitidas por alimentos (E.T.A.) se han incrementado en las últimas tres décadas, en número y frecuencia, tanto en países industrializados como en aquellos en vías de desarrollo (1,2). Estas enfermedades han sido reconocidas como uno de los problemas de salud pública más extendido y una de las causas de caída de productividad de países, empresas e individuos. El impacto socio económico es realmente importante, siendo necesaria la implementación de controles sanitarios más estrictos en la producción de alimentos (3,4).

Es sabido que los alimentos de origen marino son de gran valor nutritivo para la alimentación humana, debido al alto contenido de proteínas, minerales y vitaminas que poseen. Por este motivo, en los últimos años, ha aumentado el interés comercial en la industrialización de los mismos y con mayor frecuencia vehiculizan microorganismos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos. (2,5,6,7,8,9,10,11).

Entre los microorganismos involucrados en estos casos se han reportado *Salmonella sp.*, *Vibrio*, *Escherichia coli*, *Shigella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria* y otros patógenos considerados emergentes, siendo generalmente el origen de los mismos el hombre y su entorno (1,2,5,7,11,12).

Principalmente, debido a malas prácticas durante la conservación de alimentos de origen marino, se alcanzan condiciones de tiempo y temperatura óptimas que favorecen el desarrollo en forma desmedida y la supervivencia de los microorganismos causantes de E.T.A., siendo el pescado un medio adecuado para que ello ocurra (3,5).

El objetivo de este trabajo es detectar la presencia de microorganismos contaminantes en pescado capaces de producir enfermedades transmitidas por alimentos (E.T.A.)

Materiales y Métodos

Descripción de los alimentos analizados

Se procesaron:

18 merluzas enteras capturadas en aguas del Golfo San Jorge (Provincia del Chubut) que fueron recogidas a bordo de un barco de pesca costera.

70 muestras de filete de merluza que se comercializa refrigerado; 55 unidades fueron obtenidas en distintas bocas de expendio al consumidor y las restantes en las plantas elaboradoras.

20 milanesas crudas de pescado, preparadas con filete de merluza cubierto con huevo batido con ajo y perejil y empanado. Las muestras se obtuvieron en un comercio local.

17 bloques congelados a menos 20°C de filete de merluza sin piel, obtenidos en la planta elaboradora, cada uno envasado en cajas de cartón parafinado de 5 kg de peso.

5 bloques congelados a menos 20°C de minced obtenidos en la planta elaboradora.

14 muestras congeladas a menos 20°C de pulpa de centolla precocida, envasadas al vacío y pasteurizadas. Las mismas se obtuvieron en la planta elaboradora.

5 muestras de salmón de mar cocido en salsa de tomate. Éstas se obtuvieron en distintos comercios de la zona y envasadas en bandejas plásticas cubiertas con polietileno impermeable y congeladas a menos 20°C.

20 muestras de harina de pescado que es utilizada como alimento de aves de corral y otros animales. Es elaborada a partir de residuos de la industrialización de pescados, mariscos y pescados enteros no destinados al consumo humano que son triturados y prensados para extraer agua y aceite. Luego del secado a 110°C, el producto mantiene una humedad entre 7 a 17% y se almacena a granel. Para su comercialización se envasa en bolsas plásticas. Las muestras se obtuvieron de la planta elaboradora.

Recolección y procesamiento de las muestras

Los filetes y pescados enteros fueron recogidos en bolsas de polietileno asépticas y los productos restantes en los envases originales.

De los pescados enteros se obtuvieron muestras de superficie mediante hisopados de 200 cm². Los hisopos fueron incluidos en 10 ml de la solución diluyente y homogeneizados por rotación.

Para el resto de los productos analizados, se pesaron unidades de muestra de 25 g y se homogeneizaron en 225 ml de agua peptonada al 0,1%, como diluyente. Las mismas se obtuvieron según se detalla a continuación

En los productos congelados, la unidad de muestra se extrajo con un sacabocados estéril. So-

lamente el cilindro de muestra fue procesado, descartándose las virutas que se formaron (13).

Para cada unidad de muestra de filetes y milanasas de merluza se obtuvieron porciones de distintas partes de cada filete (14).

Análisis bacteriológicos

Se determinó la presencia de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP), *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp. y *Clostridium perfringens*. Para los análisis bacteriológicos se siguieron las recomendaciones de International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) (15), con modificaciones.

Para *Staphylococcus aureus*, se utilizó agar Baird Parker, sembrándose por diseminación en superficie. Se incubó 48 hs. a 37°C y se seleccionaron colonias negras brillantes, rodeadas de áreas claras. A cada una se le realizó una coloración de Gram y se identificó mediante los test de de catalasa, oxidasa, coagulasa, y producción de ácido a partir de manitol.

Para el aislamiento de *Escherichia coli* enteropatógena en productos congelados se realizó un enriquecimiento no selectivo previo mediante la incubación durante 6 hs y a temperatura ambiente de los homogeneizados de las muestras. 10 ml de cada caldo se sembró en igual volumen de caldo verde brillante doble concentración, incubando durante 24 hs. a 37°C. Aquellas muestras con desarrollo y producción de gas se repicaron en caldo Mc Conkey y en caldo indol. Se incubó a 44,5 °C durante 24 hs. A partir de los caldos Mc. Conkey con ácido y gas e indol positivo, se aisló en agar eosina azul de metileno (E.M.B.) La identificación de *E. coli* se realizó utilizando las pruebas de producción de enzima ureasa, fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa, producción de sulfhídrico, indol, movilidad, utilización de citrato y producción de acetoina. Para la identificación serológica se utilizaron sueros polivalentes aglutinantes obtenidos en el Instituto Nacional de Microbiología Dr. C.G.Malbrán (Buenos Aires, Argentina).

Para la detección de *Vibrio cholerae* y *parahaemolyticus*, las unidades de muestra se homogeneizaron en agua de peptona alcalina con una incubación a 35°C durante 6 hs. y se aislaron en

agar tiosulfato citrato sales biliares y sacarosa (T.C.B.S.). La incubación se realizó durante 48 hs a 35°C. A cepas fermentadoras y no fermentadoras de sacarosa se las identificó mediante coloración de Gram, prueba de oxidasa, oxidación-fermentación de glucosa, arabinosa, manosa, manitol, inositol, pruebas de halofilismo, hidrólisis de gelatina, producción de hemólisis, producción de acetoina, producción de enzimas lisinadecarboxilasa y ornitnadecarboxilasa, sensibilidad a O/129 y a polimixina. Para el estudio serológico de *V. cholerae* se utilizó antisuero polivalente O1 obtenidos en el Instituto Nacional de Microbiología Dr. C.G.Malbrán (Buenos Aires, Argentina).

Pseudomonas aeruginosa se aisló en agar Cetrimide a partir del homogeneizado de cada muestra por siembra en diseminación en superficie, con incubación durante 48 hs. a 42 °C. Las cepas se identificaron mediante oxidasa, oxidación-fermentación de glucosa, producción de pigmentos, producción de hemólisis, utilización de citrato y utilización de distintos hidratos de carbono en un medio base mineral.

Para *Salmonella* y *Shigella* se realizó un enriquecimiento no selectivo mediante la incubación de la muestra homogeneizada con 225 ml de solución diluyente buffereada durante 24 hs. a 35°C. 10 ml de los cultivos se sembraron en igual volumen de caldo selenito doble concentración y se incubaron a 37 °C durante 18 hs. Para el aislamiento se utilizó agar *Salmonella-Shigella* (S.S.), con incubación de 24-48 hs. a 37°C. Las colonias seleccionadas se identificaron utilizando las pruebas de oxidasa, fermentación de glucosa, sacarosa y lactosa, producción de las enzimas lisinadecarboxilasa, ureasa, crecimiento en agar citrato, producción de indol, movilidad y producción de sulfhídrico. La tipificación serológica se realizó mediante la utilización de sueros polivalentes aglutinantes obtenidos en el Instituto Nacional de Microbiología Dr. C.G.Malbrán (Buenos Aires, Argentina).

Para *Clostridium perfringens* se realizaron recuentos presuntivos en medio diferencial para clostridios (D.R.C.M.) con agregado de un 0,3% de agar, distribuido en tubos con 9 ml y esterilizados. Una vez sembrados los medios con 1 ml del homogeneizado de la muestra y de diluciones sucesivas, se colocaron durante 30 minutos a 70°C y posteriormente se incubaron durante 7 días a 35°C. Las colonias negras que desarrollaron fueron conta-

das y subcultivadas en agar sangre y agar yema de huevo con incubación en jarra de anaerobiosis con sistema generador de atmósfera anaerobia (Anaerocult A®, Merck). Las colonias de bacilos Gram +, productoras de lecitinasa y b hemolíticas se identificaron con pruebas de fermentación de la lactosa, movilidad, hidrólisis de gelatina, reducción de nitrato, coagulación con producción de ácido y gas en leche tornasolada y producción de indol.

Para *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Clostridium perfringens* se realizaron recuentos y los resultados se sometieron a análisis de estadística descriptiva y de varianza (16)

Resultados y Discusión

Clasificación de los productos estudiados

Existe una gran diversidad de alimentos de origen marino, que se ha categorizado de acuerdo con el riesgo epidemiológico de transmitir E.T.A. (14). Las muestras analizadas en este trabajo se pueden clasificar dentro de dos grupos en base al riesgo epidemiológico (14,17,18) : *Alimentos de riesgo sustancial, que son aquellos listos para comer, precocidos o productos de microondas, como la centolla y el salmón en salsa. Estos productos pueden contener patógenos microbianos, biotoxinas o compuestos físico-químicos y por tal motivo representan un riesgo para el consumidor. * Alimentos de bajo riesgo epidemiológico como el pescado crudo, filete de merluza fresco o congelado, milanesas de pescado y minced, que deben ser sometidos a cocción antes de ser consumidos y por lo tanto representan un peligro potencial para la salud humana.

Patógenos potenciales en productos de la industria pesquera

En los productos analizados que se comercializan congelados (bloques de filete de merluza, minced, centolla, salmón en salsa), no se aislaron los microorganismos investigados. Sin embargo, se detectaron *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* y *Pseudomonas aeruginosa* en muestras de merluza y otras procedentes de su elaboración. Los valores promedios de los recuentos obtenidos se muestran en la tabla 1.

Para *Staphylococcus aureus*, los recuentos oscilaron entre 10^2 y 10^3 u.f.c./g. En la tabla 2 se presenta la distribución porcentual de las muestras de pescado analizadas, de acuerdo a los niveles obtenidos para este microorganismo.

El mayor porcentaje de muestras contaminadas con *S. aureus* pertenecieron a las procedentes de merluzas enteras. La presencia de este microorganismo en tegumento de pescado es una consecuencia de la contaminación cruzada que se produce durante las operaciones de captura, manipulación y almacenamiento, dado que no se encuentra en la microflora normal del mismo (6,11,19). La incidencia en filete de merluza refrigerado fue baja (10%), con un recuento promedio menor de 100 u.f.c./g, resultando este valor significativamente menor con respecto a los obtenidos en pescado entero ($p < 0,05$). Generalmente, la calidad microbiológica de la materia prima puede ser marcadamente modificada por diferentes procesos durante la elaboración de la misma (18). Por otra parte, a bajas temperaturas existe competencia entre este microorganismo y bacterias psicrótrofas que son propias del pescado, que no permiten su desarrollo siempre y cuando se mantengan las condiciones de refrigeración (14). Además, se aisló en el 40% de las muestras de milanesa de filete de merluza, asociándose su presencia a malas prácticas higiénico sanitarias durante la elaboración, ya que el origen de esta bacteria son las secreciones nasofaríngeas y de piel.

Los niveles obtenidos se encuadran dentro de los criterios establecidos por el I.C.M.S.F. (14). Esta comisión recomienda para *Staphylococcus aureus*, como microorganismo indicador para pescado fresco, congelado y productos derivados, que en 5 muestras, 3 pueden tener recuentos entre 10^3 y $2 \cdot 10^3$, pero ninguna mayor de este valor (programa clase 3).

En el 22% de los ejemplares de merluza entera, se detectó la presencia de *Clostridium perfringens*, con recuentos entre 10^2 y 10^3 (tabla 3). Otros investigadores reportaron una incidencia en tegumento de pescado crudo entre 0 y 83%, dependiendo de la contaminación del pescado por aguas residuales y por contaminación cruzada durante la manipulación (9,10,20).

Este microorganismo desarrolló a partir de muestras de filete y milanesa de merluza, con recuentos menores de 10^2 u.f.c./g.

La gastroenteritis por *Clostridium perfringens* es una de las causas principales de enfermedades

transmitidas por alimentos en varios países industrializados, como EEUU, Canadá y Reino Unido (21,22). En Argentina no se disponen de datos y raramente se notifican los casos. Este microorganismo no figura en las reglamentaciones que establecen calidad microbiológica de productos de pesca. En general para producir enfermedad se requiere la ingesta de un inóculo equivalente a 10^8 u.f.c./g (21,22). Su presencia representa un riesgo potencial para el consumidor, debido a que el tiempo de generación de esta bacteria es corto y si el almacenamiento del alimento es prolongado e inadecuado en poco tiempo pueden desarrollar altos niveles de formas vegetativas, alcanzándose la dosis infectante. (20,22). La cocción normal de los alimentos es suficiente para destruir las células vegetativas pero no las esporas, que pueden ser activadas por el shock térmico y germinar. (20,21,22,23, 24).

Las harinas de pescado se emplean como ración de alimento proteico para aves de corral y otros animales. El promedio de los recuentos de *Clostridium perfringens*, en estas de muestras, fue significativamente mayor que en los otros productos en los que se detectó su presencia ($p < 0,05$). Los niveles (entre 10^2 y 10^4) fueron similares a los obtenidos en otros estudios (25). Si bien la a_w es baja y el tratamiento térmico al que se somete durante el proceso de desecación, limitan el crecimiento de microorganismos saprófitos y/o patógenos, un aumento de humedad lo convierte en un medio óptimo para el desarrollo del microorganismo (10). La presencia del mismo en harina de pescado es importante debido a que uno de los reservorios es el tracto intestinal de las aves de corral.

Pseudomonas aeruginosa se aisló de hisopados de tegumentos de pescado entero, milanese de filete y harina de pescado. En la tabla 4 se presenta la distribución porcentual de las muestras de pescado analizadas, de acuerdo con los niveles alcanzados.

La presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en alimentos estaría relacionada principalmente con contaminación cruzada en distintos hábitat, principalmente en aquellos en que las condiciones de humedad sean apropiados para su desarrollo. En ambientes húmedos esta bacteria tiende a formar microcolonias cubiertas por glicocalix que le permite sobrevivir, diseminarse y contaminar distintas superficies donde es muy difícil eliminarla. A partir de su presencia en materias primas puede contami-

nar equipos y utensilios en plantas elaboradoras, infectar operarios, etc (10,11,23).

El rol de *Pseudomonas aeruginosa* en enfermedades transmitidas por alimentos no está claramente establecido. Existen investigaciones que la consideran como causa de intoxicación alimentaria en ancianos, niños, desnutridos, pacientes con enfermedades o bajo terapias inmunosupresoras y con administración sistémica de antibióticos, que presentan una resistencia reducida a la colonización del intestino delgado. Por ello, en los últimos años se la ha señalado como patógeno emergente, provocando desde enteritis leves hasta diarreas profusas que pueden llevar a la muerte a huéspedes pertenecientes a grupos de alto riesgo (2,10,11,23).

Los patógenos emergentes también son causantes de E.T.A., pero para ellos las medidas de control y epidemiológicas existentes hasta el momento son muy pobres (8).

En el presente estudio no se detectó la presencia de *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.* y *Escherichia coli enteropatógena* coincidiendo con otros trabajos en realizados en pescado (11,17,25,26,27, 28).

Conclusiones

De 169 muestras analizadas en 75 (45%) se aislaron microorganismos potencialmente patógenos. Si bien los niveles obtenidos no alcanzan las dosis infectantes para producir E.T.A., su presencia implicaría un peligro potencial para la salud, si las condiciones de almacenamiento de los alimentos no fueran las correctas. Además, se pone en evidencia la importancia de la aplicación de buenas prácticas de manipulación y elaboración de productos de pescado, para disminuir la introducción de bacterias patógenas o potencialmente patógenas debido a la contaminación cruzada.

Teniendo en cuenta que la formulación de los productos congelados analizados no incluye ningún preservante o inhibidor, la ausencia de desarrollo de los microorganismos investigados indicaría que los márgenes de seguridad ofrecidos por el método de conservación son muy amplios y reducen las posibilidades de supervivencia o crecimiento de microorganismos patógenos.

Nota

Este trabajo fue presentado en el VIII Congreso Argentino de Microbiología. Organizado por la Asociación Argentina de Microbiología. Buenos Aires, Argentina del 6 al 9 de septiembre de 1998. Publicado en el Libro de Resúmenes, Sección Microbiología de Alimentos N° K-40.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración en este trabajo de la Farmacéutica Mónica Das Neves y del personal técnico del C.E.I.M.A.: Emilio Escobar, Francisca Alvarez y Mirta Leiva.

Bibliografía

- 1- Michanie S., 1998. Enfermedades transmitidas por alimentos en Argentina. En Conferencia, V Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos. Aguas de Lindoia, Sao Paulo, Brasil.
- 2- Monge R., Arias M.L., Utzinger D. y Antillón F., 1994. Calidad sanitaria de algunos alimentos distribuidos en servicios de alimentación hospitalarios de Costa Rica. Arch Latinoamer Nutr, **44**, 3: 164-167.
- 3- Huss, H.H., 1992. Aseguramiento de la calidad microbiológica en la industria del pescado. Trabajo presentado en la consulta de expertos de FAO sobre Tecnología Pesquera en América Latina. Uruguay. Boletín CITEP Serie de Divulgación, **2**, 2.
- 4- Quevedo F. y Ayala S. 1994. "Enfermedades transmitidas por alimentos impacto socio-económico. La Alim. Latinoam. **203**: 52-60.
- 5- Bean, N.H., Goulding J.S., Daniels M.T. and Angulo F.J., 1997. Surveillance for foodborne disease outbreaks - United States 1988-1992. J. Food Prot., **60**,10:1265-1286.
- 6- Bianchini, M., Arias M.L., Herrera C. y Zúñiga Cira, 1999. Incidencia de *Listeria monocytogenes* y evaluación de la calidad sanitaria del pescado fresco fileteado del área metropolitana. Arch. Latinoamer. Nutr, **49**, 4:358-362.
- 7- Danuncio N., 1999. Patógenos de alimentos . Parte 1: Salmonella. Techno Food, **10**: 26-29.
- 8- Garret E.S., Jahncke M.L. and Tennyson J., 1997. Microbiological hazards and emerging food-safety issues associated with seafoods. J.Food Prot., **60**, 11:1409-1415.
- 9- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), 1980. "Ecología Microbiana de los Alimentos" (Vol. I), Ed. Acribia, Zaragoza, España.
- 10- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), 1980. "Ecología Microbiana de los Alimentos" (Vol. II), Ed. Acribia, Zaragoza, España. 573-612.
- 11- Mossel, D.A.A. y Moreno Garcia, B., 1985. "Microbiología de los alimentos". Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- 12- Bondoni A.G., Armada M. y Diaz R. 1997. "Promoción al consumo y producción de alimentos de calidad. Aspectos microbiológicos y sanitarios. En comunicación presentada en II Encuentro Bromatológico Latinoamericano. Córdoba. Argentina.
- 13- Instituto Argentino de Racionalización de Materiales (I.R.A.M.), 1980. "Productos de la industria pesquera - Análisis microbiológico. Extracción de la muestra de laboratorio de productos congelados", Norma 15 - 108. PARTE II. Ed. I.R.A.M., Buenos Aires, Argentina.
- 14- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), 1980. "Microorganismos de los Alimentos. Métodos de muestreo para análisis microbiológicos: Principios y aplicaciones específicas". (Vol. II), Ed. Acribia, Zaragoza, España.
- 15- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), 1980. "Microorganismos de los Alimentos. Métodos de muestreo para análisis microbiológicos: Principios y aplicaciones específicas". (Vol. I), Ed. Acribia, Zaragoza, España.
- 16- Dawson-Saunders, B., Trapp, R. 1994. Bioestadística Médica, Ed. El Manual Moderno, México.
- 17- United States Department of Commerce (U.S.D.O.C.), N.O.A.A., National Marine Fisheries Service, 1993. National Training Branch. Washington D.C.
- 18- Liston J., 1981. Microbiology in fishery science. In Connell J.J.(ed), "Advances in fish science and technology". Torry Research Station, Aberdeen, Scotland. 138-157.
- 19- Cox, L.J., 1990. "Microorganismos en el medio ambiente de la industria alimentaria : fuentes, propagación, crecimiento y colonización". Publicación del Departamento de Garantía de Calidad. NESTEC S.A. Suiza In Course International: Advances in Food Microbiology. Organizado por DAMyC, Asoc. Arg. Microbiol. Argentina.
- 20- Kimura B., Kuroda S., Murakami M. and Fujii T., 1996. Growth of *Clostridium perfringens* in fish filets packaged with a controlled carbon dioxide atmosphere at abuse temperatures. J.Food Prot., **59**: 7:704-710.
- 21- Michanie S., Padilla G., Vega A., Rea Nogales A.. 1991. Brote de gastroenteritis por *Clostridium perfringens*, en un comedor institucional. Rev. Med. Hondureña. **59**: 62-67.
- 22- Morera J., Rodríguez E, Gamboa M., 1999. Determinación de *Clostridium perfringens* en embutidos de carne de cerdo del area metropolitana de Costa Rica. Arch. Latinoamer. Nutr, **49**, 3: 279-282.

- 23- Joklik W., Willet H., Amos D.B., Wilfert C. 1994. Zinsser, Microbiología, Ed. 20^a. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina.
- 24- Craven S.E. 1980. Growth and sporulation of *Clostridium perfringens* in foods. Food Tech., 34, 4 : 80-87,95.
- 25- Milanović A. and Beganović A. 1974. Microflora of fodder of animal origin. Veterinaria, 23 : 467-475.
- 26- Cox, L. J., Keller, N. and van Schothorst, M., 1988. The use and misuse of quantitative determinations of Enterobacteriaceae in food microbiology. J. App. Bact. Sym. Supp. : 2375-2495.
- 27- Horsley R.W., 1977. A review of bacterial flora of teleosts and elasmobranchs, including methods for its analysis. J.Fish. Biol., 10: 529 - 553.
- 28- Jermini M., Bryan F.L., Schmitt R., Mwandwe C., Mwenya J., Zyuulu M., Chilufya E.N., Matoba A., Hakalima A. and Mwanza M., 1997. Hazards and critical control points of food vending operations in a city in Zambia. J.Food Prot., 60, 3: 288-299.

Tabla 1: Valores promedios de recuentos de microorganismos aislados, expresados en u.f.c./g o cm².

Tipo de muestra	Merluza entera n=18		Filete de merluza n=70		Harina de pescado n=20		Milanesa de merluza n=20	
	\bar{x}	D.E.	\bar{x}	D.E.	\bar{x}	D.E.	\bar{x}	D.E.
<i>S.aureus</i>	205	192,42	50	169,15	s/d	---	105	193,24
<i>E. coli E.P.</i>	s/d	---	s/d	---	s/d	---	s/d	---
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	105	139,20	s/d	---	100	229,41	381,5	886,30
<i>Clostridium perfringens</i>	100	211,43	15	76,68	1000	1239,2	10	16,222
<i>Salmonella</i>	s/d	---	s/d	---	s/d	---	s/d	---
<i>Shigella</i>	s/d	---	s/d	---	s/d	---	s/d	---
<i>Vibrio cholerae</i>	s/d	---	s/d	---	s/d	---	s/d	---
<i>Vibrio parahaemolyt.</i>	s/d	---	s/d	---	s/d	---	s/d	---

Referencias: \bar{x} : valor promedio de recuentos, D.E.: desviación estándar, s/d: sin desarrollo.

Tabla 2: Distribución porcentual de las muestras de pescado analizadas de acuerdo con los niveles obtenidos *Staphylococcus aureus*

u.f.c./g o cm ²	Merluza entera n = 18		Filet n= 70		Milanesa n= 20	
	Nº de muestras	%	Nº de muestras	%	Nº de muestras	%
0- 10	5	28	63	90	12	60
10 - 10 ²	0	0	0	0	0	0
10 ² - 10 ³	13	72	7	10	8	40
10 ³ - 10 ⁴	0	0	0	0	0	0

Tabla 3: Distribución porcentual de las muestras de pescado analizadas de acuerdo con los niveles obtenidos *Clostridium perfringens*

u.f.c./g o cm ²	Merluza entera n = 18		Filet n = 70		Milanesa n = 20		Harina n = 20	
	Nº de muestras	%	Nº de muestras	%	Nº de muestras	%	Nº de muestras	%
0 - 10 ¹	14	78	67	96	13	65	6	30
10 ¹ - 10 ²	0	0	3	4	7	35	0	0
10 ² - 10 ³	4	22	0	0	0	0	5	25
10 ³ - 10 ⁴	0	0	0	0	0	0	9	45

Tabla 4: Distribución porcentual de las muestras de pescado analizadas de acuerdo con los niveles obtenidos *Pseudomonas aeruginosa*

u.f.c./g o cm ²	Merluza entera n = 18		Milanesa n = 20		Harina n = 20	
	Nº de muestras	%	Nº de muestras	%	Nº de muestras	%
0 - 10 ¹	10	66	13	65	16	80
10 ¹ - 10 ²	0	0	0	0	0	0
10 ² - 10 ³	8	44	7	35	4	20
10 ³ - 10 ⁴	0	0	0	0	0	0