



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE  
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I  
DEL MEDI NATURAL

## ***CONTROL MICROBIOLÓGICO DE PANGA (*Pangasius hypophthalmus*), TILAPIA (*Oreochromis spp.*) Y MERLUZA (*Merluccius merluccius*) ULTRACONGELADO. ANÁLISIS DE PRESENCIA DE BACTERIAS PATÓGENAS***

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE  
LA CALIDAD Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

ALUMNO/A: IGNACIO ROLDÁN ADALID  
TUTOR/A ACADÉMICO: ROSA M<sup>a</sup> MONTES ESTELLÉS

*Curso Académico: 2016-2017*  
VALÈNCIA, JULIO 2017

# **Control microbiológico de panga (*Pangasius hypophthalmus*), tilapia (*Oreochromis spp.*) y merluza (*Merluccius merluccius*) ultracongelado. Análisis de presencia de bacterias patógenas.**

Roldán Adalid, Ignacio; Montes Estellés, Rosa María<sup>1</sup>

## **RESUMEN**

En los últimos años en España se ha incrementado el consumo de pescado denominado “low cost” entre los que destacan la tilapia y la panga, siendo este último la especie más habitual en los comedores escolares, la más consumida, la que está bajo sospecha y la que más mala fama tiene.

Estos pescados “low cost” se caracterizan por estar criados en condiciones productivas extremas en distintas zonas de Asia; y a su vez en piscifactorías en ríos con altos índices de contaminación como el río Mekong. Además, en los últimos meses se han producido acontecimientos dónde se ha creado alarma entre la población llegando incluso a anunciarse su retirada de los lineales de las grandes cadenas de distribución alimentaria.

Los consumidores cada vez son más conscientes que la presencia de estos pescados “low cost”, sobre todo de la panga, podrían poner en riesgo la calidad y la seguridad alimentaria debido a la presencia de antibióticos, metales pesados e incluso de distintas bacterias patógenas que podrían causar graves problemas de salud.

En este trabajo se ha evaluado la calidad microbiológica de muestras de ambas especies para su estudio y poder determinar si existe presencia de patógenos.

**PALABRAS CLAVE:** panga, tilapia, bacterias, calidad alimentaria, seguridad alimentaria, calidad microbiológica.

## **RESUM**

En els últims anys a Espanya s'ha incrementat el consum de peix “low cost” on destaquen la tilàpia i el panga, sent aquest últim l'espècie més habitual als menjadors escolars, la més consumida, la que es trova sota sospita i la que més mala fama té.

Aquests peixos “low cost” es caracteritzen per estar criats en condicions productives extremes a distintes zones d'Àsia; i al mateix temps a piscifactories de rius amb elevats índexs de contaminació com és el riu Mekong. A més, durant els últims mesos s'han produït esdeveniments on s'ha creat alarma entre la població arribant inclús a anunciar-se la seva retirada als lineals de les grans cadenes de distribució alimentària.

---

<sup>1</sup> Montes Estellés, Rosa María. Departamento de Biotecnología. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural. Universitat Politècnica de València.

Els consumidors cada volta són més conscients que la presència d'aquests peixos "low cost", sobretot el panga, podrien posar en perill la qualitat i la seguretat alimentària a causa de la presència d'antibiòtics, metalls pesants i inclús de diverses bacteris patògens que podrien causar greus problemes de salut.

En aquest treball s'ha avaluat la qualitat microbiològica de diverses mostres d'ambdues espècies per al seu estudi i així poder determinar si existeixen presència de patògens.

PARAULES CLAU: panga, tilàpia, bacteris, qualitat alimentària, seguretat alimentària, qualitat microbiològica.

## **ABSTRACT**

Recently, Spain has increased the consumption of fish known "low-cost" including tilapia and catfish, this last species most common in school canteens, the most consumed, which is under suspicion and has more notoriety.

These "low-cost" fish are characterized to being bred in extreme production conditions in different parts of Asia; at the same time at fish farms in rivers with high levels of pollution as the Mekong river. In addition, in recent months there have been events which alarm has been created, among the population even to announce their retirement from the shelves of the large food retail chains.

Consumers are become more aware that the presence of these "low-cost fish", especially catfish, could put at risk the quality and food safety due to the presence of antibiotics, heavy metals and even pathogenic bacteria could cause serious health problems.

In this aim, we have evaluated the microbiological quality of different samples of both species for study and determine if there is presence of pathogens.

KEYWORDS: catfish, tilapia, bacteria, food quality, food safety, microbiological quality.

## 1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día el pescado es un alimento cuya producción mundial representa un 70% sobre el consumo humano, llegando a consumirse hasta 20 kg. per cápita en 2015 (FAO-OMS, 2015), mientras que el 30% restante se dedica a la alimentación animal y a otros fines. A nivel comercial este tipo de alimento se vende como fresco en un 30% mientras que el 33% se hace de manera congelada, el 17% a través de conservas y el 20% restante en productos ahumados, curados y salados.

Los productos de la pesca son muy susceptibles a las alteraciones producidas por las bacterias. Por este motivo se utilizan técnicas de conservación como la ultracongelación para preservar este tipo de alimento y así retardar las reacciones biológicas, físicas y químicas que se puedan presentar.

El pescado presenta una carga microbiológica inicial y esta depende de la zona dónde se encuentre o produzca. En este caso, la panga y la tilapia se crían en aguas de climas templados donde predominan bacterias Gram negativas como *Vibrio*, *Proteus* o *Pseudomonas* que pueden llegar a producir graves toxiinfecciones alimentarias.

Actualmente el 85% de la panga se importa principalmente a la Unión Europea desde Vietnam, primer exportador del mundo. La mayor parte de la panga proviene de la acuicultura, donde en el año 2013 (Fish Forward: Pangasius Project-WWF) se cultivaron 977.000 toneladas de *Pangasius hypophthalmus* en unas 6.000 hectáreas de extensión de cultivos de acuicultura.

La panga vietnamita siempre ha tenido mala reputación entre los consumidores y la sociedad por las condiciones de explotación medioambientales no sostenibles que rodean su producción intensiva en las aguas dulces más contaminadas del planeta. Uno de los principales problemas es la mala calidad del agua debido a la contaminación ambiental donde se lleva a cabo dicha actividad, además la piscicultura intensiva produce grandes cantidades de excrementos que afecta tanto a la producción de panga y tilapia en esta región del planeta.

En los últimos años en España se ha incrementado el consumo de pescado de bajo coste denominado “low cost” entre los que destacan la tilapia y la panga, siendo este último la especie más habitual en los comedores escolares, la más consumida y la que está bajo sospecha.

A día de hoy en España, debido a los métodos de producción extrema en una de las regiones más contaminadas del mundo, se ha creado alarma en la sociedad donde su consumo, sobre todo de panga, podría suponer graves problemas de salud provocadas por un consumo habitual de estas especies.

Por estos motivos, los consumidores cada vez son más conscientes que la presencia de estos pescados “low cost” podrían poner en riesgo la calidad y la seguridad alimentaria debido a la presencia de antibióticos, metales pesados e incluso distintas bacterias patógenas que podrían causar graves toxiinfecciones alimentarias y problemas de salud, aunque el riesgo existente sea mínimo dado que el pescado consumido en España es cocinado a altas temperaturas antes de su consumo.

Así pues, durante los últimos meses se han producido acontecimientos dónde se ha llegado incluso a anunciar su retirada de los lineales de las grandes cadenas de distribución alimentaria, pese a que los distribuidores de estos productos han garantizado que estos productos cumplen con todos los criterios y parámetros de calidad que así exigen las autoridades sanitarias europeas en los Puestos de Inspección Fronterizos (PIF); y por lo tanto no habría ningún tipo de riesgo sanitario que afectara a la seguridad alimentaria de los consumidores.

En este trabajo se ha evaluado la calidad microbiológica de muestras de ambas especies para su estudio y poder determinar si existe presencia de patógenos que puedan provocar toxiinfecciones alimentarias.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

En el presente estudio se han evaluado un total de 16 muestras (8 de panga (*Pangasius hypophthalmus*), 3 de tilapia (*Oreochromis spp.*) y 5 de merluza (*Merluccius merluccius*); donde la merluza se ha considerado como muestra control debido a que el consumidor tiene más confianza en este producto. Todas las muestras se presentan para su consumo en bolsas selladas térmicamente tras el envasado del producto ultracongelado y han sido obtenidas en distintos supermercados e hipermercados de la ciudad de València y su área metropolitana.

Para la obtención de muestras representativas en cada caso se han tomado 25 gramos de distintas partes del alimento de cada una de las muestras. Posteriormente se mezclaron con 225 mL de agua de peptona tamponada (excepto las muestras que posteriormente se han analizado para determinar la presencia de *Vibrio spp.* que fueron mezcladas en 225 mL de agua de peptona salina alcalina) homogeneizándose a posteriori en el Stomacher (homogeneizador de paletas).

### **2.1. Recuento de coliformes (Enterobacterias lactosa positivo) y psicrófilos**

Para el recuento de *E. coli* y otros coliformes se ha seguido la norma ISO 16649-2:2001, mientras que para bacterias psicrófilas se ha seguido el método utilizado en el laboratorio de microbiología (UPV).

Para ello se realizan diluciones decimales de la muestra recién homogeneizada en Stomacher en tubos de 9 mL de agua destilada estéril, de las diluciones seleccionadas se siembran dos placas en superficie, con el medio de cultivo, con 0,1 mL de la dilución y se extiende por la superficie del agar con asa de Digrafsky. Una vez sembradas se llevaron a incubar a estufa termostataada.

Para el recuento de *E. coli* se usa Agar Cromogénico de Coliformes (ACC) (Sharlau ®) y se incuban a 37°C durante 24h; mientras que para el recuento de psicrófilos se utiliza Agar Plate Count (Sharlau ®) y se incuban a 13°C durante 15 días.

## **2.2. Identificación de *E. coli***

La identificación de *E. coli* se realiza a partir de del recuento de coliformes ya que las colonias azules en este recuento son *E. coli*, sin embargo, realizamos una identificación bioquímica mediante Tiras API-20E® para confirmar el resultado.

## **2.3. Identificación de *Staphylococcus aureus***

Para la detección de *Staphylococcus aureus*, se ha seguido una modificación de la norma UNE-EN ISO 6888-3:2003. Análisis para la detección de *Staphylococcus aureus*.

Tras la homogeneización con agua de peptona se han inoculado 1 mL en 2 tubos con 19 mL de caldo de Giolitti-Cantoni (Sharlau ®) que se incuban a 37°C durante 48h. Tras la incubación, aquellos tubos que presentan ennegrecimiento se resiembran en placas de medio selectivo Agar Baird-Parker (Agar BP) (Sharlau ®) con 0,1 mL se extiende por la superficie con asa de Digrafsky.

Los estafilococos producen colonias de color gris oscuro a negro debido a la reducción del telurito que lleva el medio de cultivo, además de yema de huevo para poder apreciar halos de precipitación alrededor de las colonias debido a la actividad de la lipasa.

Las placas de Agar BP se incuban 48h a 37°C, tras lo cual se identifican colonias con las características de *Staphylococcus aureus*, colonias negras con halo de precipitación, se seleccionan colonias de cada muestra positiva y se realizan las siguientes pruebas bioquímicas:

Prueba de la coagulasa, para lo que se siembran las colonias en caldo Brain-Heart y se incuban a 37°C durante 24h, tras el crecimiento se añaden 0,5 mL de caldo crecido a 0,5 mL plasma citratado de conejo incubándose a 37°C durante 4-6h, después de la incubación de comprueba si el plasma ha coagulado para dar la reacción como positiva.

Prueba de la DNAsa, en esta prueba se siembran las colonias en Agar DNA en una estría y se incuban 24h a 37°C, después de lo cual se comprueba la hidrólisis del DNA inundando la placa con HCl para visualizar halos de aclaramiento.

Para su identificación final se resembraron en Agar Sangre (Sharlau ®) colonias aisladas incubando 24h a 37°C y se confirmaron mediante tiras API-Staph® incubadas también 24h a 37°C.

## **2.4. Identificación de *Salmonella spp.***

Para la identificación, confirmación de *Salmonella spp.* se ha seguido la norma UNE-EN ISO 6579:2003. Método horizontal para la detección de *Salmonella spp.*

Tras la homogeneización de 25 g del alimento con 225 mL de agua de peptona tamponada y el posterior preenriquecimiento a 37°C durante al menos 18-24h, se inoculan 0,1 mL del preenriquecimiento en caldo de Rappaport-Vassiliadis Soja (RVS) (Difco™) y 1 mL en Tetracionato de Müller-Kauffmann

(MKTTn) (Scharlau ®), los enriquecimientos se incuban a 42°C y 37°C respectivamente durante 24h. Tras el enriquecimiento selectivo se sembraron de cada tubo una placa de medio selectivo Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD) (Scharlau ®) y una placa de Agar Cromogénico para *Salmonella* (Oxoid ®) por triple estría, incubándose a 37°C durante 24h.

Después de 24 h se seleccionan aquellas colonias con características propias de salmonela en cada uno de los medios sólidos selectivos y diferenciales. Colonias rojas con o sin centro negro en el Agar XLD y colonias magenta en Agar Cromogénico para *Salmonella*.

Finalmente, se identificaron las colonias presuntivas de salmonela mediante pruebas bioquímicas con la tira API-20E®.

## **2.5. Identificación de *Listeria monocytogenes***

Para la detección de *Listeria monocytogenes* se ha seguido la norma UNE-EN ISO 11290-1:1997.

Tras la homogeneización con agua de peptona y el posterior preenriquecimiento, se han inoculado 0,1 mL en caldo de enriquecimiento selectivo Fraser (Scharlau ®) incubándose a 37°C durante 24h, paralelamente también se siembra en superficie 0,1 mL en medios selectivos Agar ALOA (Scharlau ®) y Agar Palcam (Scharlau ®).

Una vez incubado el enriquecimiento en medio Fraser se siembran las distintas muestras en medios selectivos Agar ALOA y Agar Palcam incubándose a 37°C durante al menos 24h.

De las cuatro placas de agar selectivo se resiembran en Agar sangre las colonias características de *Listeria monocytogenes* en los medios de cultivo y algunas que no posean las propiedades de *Listeria monocytogenes*.

En Agar Palcam las colonias de *Listeria* spp. son pequeñas y grises con halo negro alrededor, debido a la hidrólisis de la esculina. Las colonias de *Listeria* spp. en Agar ALOA son azul-verde, mientras que las colonias de *Listeria monocytogenes* son azul-verde con un halo de precipitado alrededor.

Las colonias que presentan  $\beta$ -hemólisis en agar sangre son presuntivamente *Listeria monocytogenes*. Para confirmar la identificación se realizaron pruebas bioquímicas con API Listeria®.

## **2.6. Identificación de *Vibrio* spp.**

Para la identificación y confirmación *Vibrio* spp. se ha seguido la norma ISO/TS 21872-1:2007. Análisis para la detección de *Vibrio* spp.

Tras la homogeneización con agua de peptona salina alcalina (ASPW) y el posterior preenriquecimiento, se han inoculado 0,1 mL en caldo ASPW incubándose a 37°C durante al menos 24h. Después del enriquecimiento se sembraron en medio selectivo Agar Tiosulfato-Citrato-Sales biliares-Sacarosa (TCBS) (Merck kGaA) así como en Agar Cromógeno de *Vibrio* (CHROMagar™ *Vibrio*) incubándose posteriormente también a 37°C durante 24h.

Tras esto se identificaron posibles colonias de *Vibrio* spp por sus características, colonias amarillas en medio TCBS y colonias de color azul,

malva o blanca en medio CHROMagar™ Vibrio. Para una posible identificación de las colonias se utilizaron tiras API-20E® y API-20NE®.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fueron analizadas un total de 16 muestras para establecer la calidad microbiológica de las distintas especies descritas anteriormente independientemente de los tratamientos de ultracongelación para los filetes de pescado. Los alimentos, en especial los pescados, se caracterizan por ser sensibles a las alteraciones fisiológicas y microbiológicas que afectan a la calidad y a la seguridad alimentaria, dando lugar a numerosas toxiinfecciones alimentarias, ya que suelen ser vehículos de diferentes microorganismos patógenos y toxinas.

#### 3.1. Recuento de psicrófilos

Los organismos psicrófilos se caracterizan por ser, en su mayoría, bacterias Gram negativas causantes de la mayor parte de alteraciones de los productos alimentarios que ocurren durante su almacenamiento en los frigoríficos.

En la Tabla 1 se muestra el recuento total de psicrófilos aerobios en UFC/g. Hay que destacar que entre las muestras analizadas existió una elevada variabilidad entre las distintas muestras analizadas, se pudo observar como el crecimiento bacteriano fue aleatorio entre ellas pese a ser lotes, en algunos casos, que procedían de la misma zona de captura y/o producción.

**TABLA 1.** Recuento total bacterias psicrófilas en unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g).

<i>Muestra</i> <sup>2</sup>	<i>Recuento (UFC/g)</i>
<b>P1</b>	Ausencia
<b>P2</b>	1,4·10 <sup>4</sup>
<b>P3</b>	1,8·10 <sup>4</sup>
<b>P4</b>	6,0·10 <sup>5</sup>
<b>P5</b>	2,6·10 <sup>4</sup>
<b>P6</b>	2,5·10 <sup>4</sup>
<b>P7</b>	4,8·10 <sup>4</sup>
<b>P8</b>	2,2·10 <sup>4</sup>
<b>T1</b>	1,0·10 <sup>3</sup>
<b>T2</b>	Ausencia
<b>T3</b>	7,6·10 <sup>4</sup>
<b>M1</b>	Ausencia
<b>M2</b>	1,4·10 <sup>4</sup>
<b>M3</b>	1,6·10 <sup>4</sup>
<b>M4</b>	1,4·10 <sup>4</sup>
<b>M5</b>	1,1·10 <sup>4</sup>

<sup>2</sup> Leyenda de las muestras de los filetes ultracongelados de pescado: (M) para filetes de merluza, (P) para filetes de panga y (T) para filetes de tilapia.

### 3.2. Recuento de coliformes (Enterobacterias lactosa positivo) y presencia de *E. coli*

La presencia de coliformes supone un indicador de higiene y de limpieza del procesamiento del producto, sin embargo, la presencia de *E. coli* está considerada como un indicador de contaminación fecal del producto alimentario y además se utiliza como indicador de calidad de los alimentos (Jay, 2002). En aguas templadas este microorganismo no es ubicuo del pescado y del marisco en el momento de su captura a excepción de zonas fuertemente contaminadas y endémicas como puede ser el río Mekong en zonas próximas a su desembocadura en Vietnam, donde se produce de manera intensiva tanto la panga como la tilapia.

En la Tabla 2 se muestra el recuento de bacterias coliformes, y la presencia de *E. coli*, esta es sin duda la cepa aislada más representativa entre todas las muestras que se analizaron.

**TABLA 2.** Recuento total de bacterias coliformes en unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) y presencia de *E. coli*.

<b>Muestra<sup>2</sup></b>	<b>Recuento (ufc/g)</b>	<b>Identificación cepas con tiras API-20E®.</b>
P1	3,0·10 <sup>2</sup>	-
P2	8,0·10 <sup>2</sup>	-
P3	3,0·10 <sup>3</sup>	<i>E. coli</i>
P4	3,3·10 <sup>4</sup>	-
P5	3,0·10 <sup>2</sup>	-
P6	9,0·10 <sup>2</sup>	-
P7	Ausencia	<i>E. coli</i>
P8	Ausencia	-
T1	Ausencia	-
T2	Ausencia	-
T3	2·10 <sup>2</sup>	<i>E. coli</i>
M1	Ausencia	-
M2	Ausencia	-
M3	Ausencia	-
M4	Ausencia	-
M5	Ausencia	<i>E. coli</i>

<sup>2</sup> Leyenda de las muestras de los filetes ultracongelados de pescado: (M) para filetes de merluza, (P) para filetes de panga y (T) para filetes de tilapia.

Durante los análisis de las muestras pudimos observar que, si bien la contaminación de coliformes era tan baja que no se detectaba en el recuento de coliformes, después del enriquecimiento realizado para el análisis de salmonela, estos aumentaban en número y eran detectados.

Podemos afirmar que en todas las muestras había coliformes, aunque en números bajos. También hay que resaltar la presencia de *E. coli* en dos

muestras de panga, una de tilapia y una de merluza. En este caso, no resulta un problema grave, puesto que estos pescados se consumen después de un tratamiento térmico suficiente para eliminar las enterobacterias.

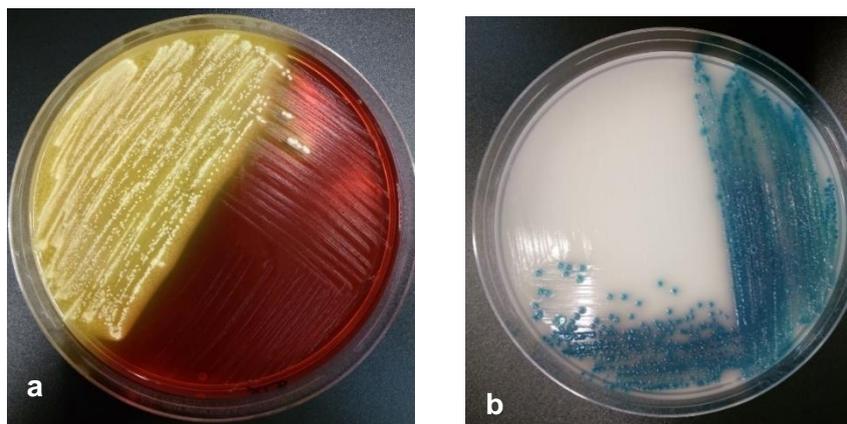
### 3.3. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp.

Se realizaron análisis de detección de *Salmonella* en las distintas muestras de pescado, ya que esta bacteria Gram negativa es un importante agente zoonótico universal que provoca importantes toxiinfecciones alimentarias.

El resultado para todas las muestras fue la ausencia de *Salmonella* spp en 25 gramos. Sin embargo, al realizar la identificación de algunas colonias presuntivas de ser *Salmonella* spp mediante tira API-20E®, nos encontramos con cepas de *Pseudomonas* spp, en las muestras P3 y T3.

Entre las cepas bacterianas aisladas con mayor frecuencia destacan los coliformes, *Pseudomonas* spp y *Serratia marcescens*. *Pseudomonas* spp. es la responsable del olor a podrido y sulfuroso que desprende el pescado cuando este está en proceso de descomposición, debido a que los péptidos presentes en el pescado son atacados por esta bacteria produciendo reacciones bioquímicas que originan amoníaco, cetonas y ésteres aumento el proceso de putrefacción. Además, se da la circunstancia que estas bacterias son psicotolerantes, es decir, son patógenos capaces de sobrevivir como flora causante de deterioro a los procesos de ultracongelación de los filetes de las distintas especies de pescado (Dalgaard et al., 2002), y que tiene la capacidad de producir histamina (Graü et al., 2003) por alteraciones bioquímicas a partir de la histidina presente en el músculo del pescado provocando toxiinfecciones alimentarias en el consumidor final. Así pues, no se consiguió aislar en ningún medio de cultivo empleado al efecto cepas de *Salmonella* spp. pero si encontramos *Pseudomonas* spp.

En la Figura 1 podemos observar cómo se aislaron distintas cepas de bacterias coliformes, tanto en medio Agar XLD y Agar Cromógeno de *Salmonella* tras el enriquecimiento previo en caldos de cultivo Rappaport y TTK.



**FIGURA 1.** Placas de medios de cultivo Agar XLD (a) y Agar Cromógeno de *Salmonella* (b). En color amarillo aparecen las colonias de bacterias coliformes en medio Agar XLD, mientras que en medio Agar Cromógeno de *Salmonella* los coliformes presentan color azul.

### 3.4. Método horizontal para la detección de *Listeria monocytogenes*.

Por otra parte, *Listeria monocytogenes* es una bacteria Gram positiva que también es causante de graves infecciones alimentarias en los consumidores y que puede contaminar los alimentos en cualquier fase de la cadena alimentaria dado que está muy extendida en el medio ambiente (agua, alcantarillado o suelo). Desde principios de la década de 1980 se reconoce como un patógeno que se transmite a través de los alimentos y actualmente es considerado un patógeno emergente capaz de producir biofilms. En el año 2009 se encontró *L. monocytogenes* en 6,6% de las muestras de productos de la pesca listos para el consumo (EFSA 2010). Por este motivo en este estudio se hacía especial hincapié en *L. monocytogenes* ya que esta especie es especialmente patógena y productoras de listeriosis, una enfermedad zoonótica especialmente grave con tasas de mortalidad del 20-30%, aunque la presencia y supervivencia de esta bacteria en el pescado es poco probable siendo preocupante su presencia por las características que reúne la zona de su producción. (ELIKA)

Tras los análisis efectuados los resultados obtenidos fueron la ausencia de *Listeria monocytogenes* en 25 gramos de muestra, en todos los productos analizados. Sin embargo, en el 100 % de las muestras encontramos la presencia de otras listerias como *Listeria grayi* que identificamos mediante tira API-listeria®, lo que no supone ningún riesgo de seguridad alimentaria hacia los consumidores por ser una bacteria no patógena.

En la Figura 2 podemos observar como las cepas aisladas de *Listeria* spp. en agar ALOA presentan el característico color azul turqués típico de *Listeria* spp. pero no el halo de precipitado característico de *Listeria monocytogenes*.



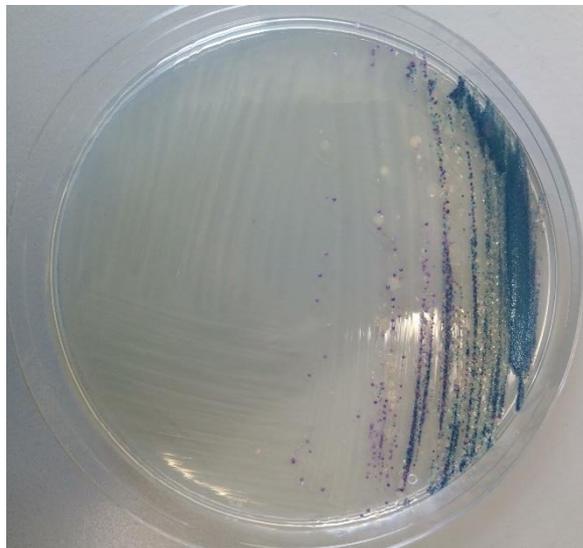
**FIGURA 2.** Placa en medio Agar ALOA en la que se observan colonias típicas de *Listeria* spp.

### 3.5. Método horizontal para la detección de *Vibrio* spp.

En el análisis de *Vibrio* spp. todas las muestras han dado ausencia para 25 gramos de muestra. El análisis se realizó conforme a la norma ISO 21872 utilizando un medio cromógeno específico para *Vibrio*.

A pesar de que hubo crecimiento en las placas, las colonias no tenían las características descritas que corresponden a las distintas especies de *Vibrios* que se pueden aislar. Aun así, intentamos identificar esas colonias con las tiras API-20E® y API-20NE® obteniendo resultados erróneos y no concluyentes con perfiles que podían corresponder a las bacterias *Klebsiella* spp., *Aeromonas hydrophila* y *Pantoea* spp y *Vibrio fluvialis* por lo que el resultado es negativo.

En la Figura 3 se pueden observar distintas colonias aisladas de *Vibrio* spp. en medio Agar Cromógeno de Vibrio (CHROMagar™ Vibrio). Atendiendo solamente a sus colores identificativos, se hubieran mostrado falsos positivos a la hora de leer los diferentes resultados obtenidos dado que *V. parahaemolyticus* debería presentar un color malva típico, *V. vulnificus* y *V. cholerae* un color azul turqués típico y *V. alginolyticus* incoloro.



**FIGURA 3.** Fotografía de placa en medio Agar Cromógeno de Vibrio en la que se observan diferentes tipos de colonias.

### **3.6. Método horizontal para la detección de *Staphylococcus aureus***

En este trabajo todas las muestras han dado positivo para *Staphylococcus* spp., puesto que encontramos en todas las muestras colonias negras en Agar Baird-Parker, sin embargo, solo algunas tienen el halo de precipitado alrededor de las colonias. Se realizaron tiras API-STAPH® para la identificación de las colonias además de pruebas complementarias como la coagulasa, DNAsa (Difco ®) y  $\beta$ -hemólisis.

En este caso se identifica en 2 muestras de panga, que presentaban el típico halo de precipitado característico y en medio Agar Sangre (Oxoid ®) presentaban  $\beta$ -hemólisis, cepas de *S. aureus* con un 97,7% de probabilidad; lo que supone un grave riesgo para el consumidor si se dan las condiciones para la producción de enterotoxinas que son termostables y no se destruyen con la cocción del pescado. En el resto de muestras se han identificado otras especies de estafilococos que no se consideran peligrosas. (Tabla 3)

*Staphylococcus aureus* es una bacteria Gram positiva, productoras de enterotoxinas termoestables que son capaces de resistir los procesos de ultracongelación y que una vez formadas en el alimento es extremadamente difícil eliminarlas; se encuentra distribuida en el medio ambiente y presente en las mucosas tanto de animales como de personas, transmitiéndose al ser humano a través de alimentos contaminados y/o incorrectas prácticas de higiene, y provocando toxiinfecciones alimentarias en los mismos. Pueden vivir largos periodos de tiempo en alimentos con alto contenido en sales.

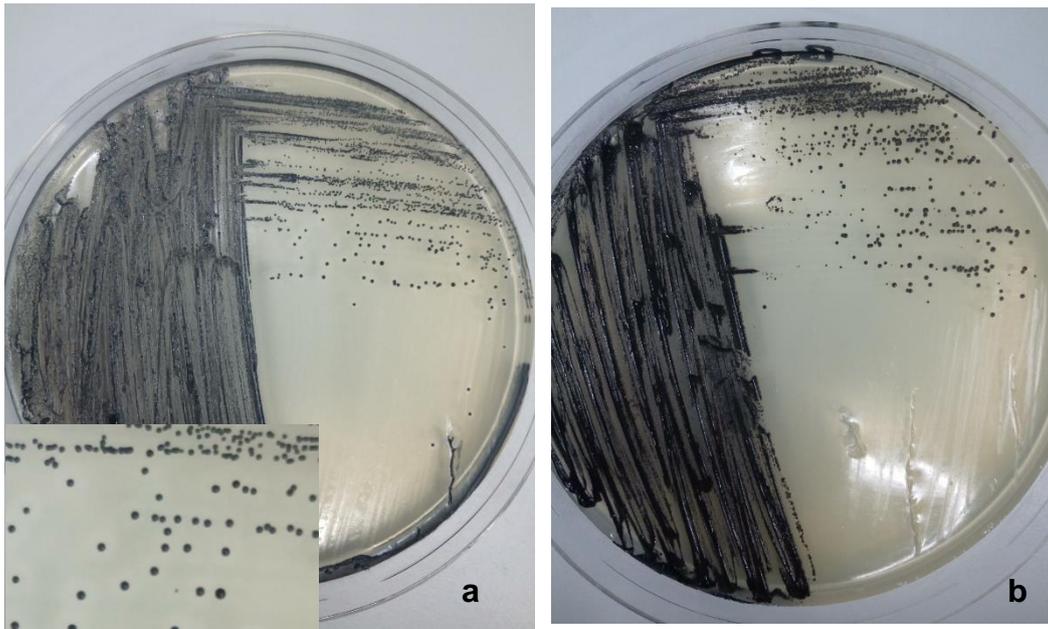
Las enterotoxinas estafilocócicas son producidas principalmente por *S. aureus* pero también pueden estar producidas por *S. intermedius*, *S. hyicus* y *S. delphini*. (ELIKA, 2013)

**TABLA 3.** Resultado del análisis de *Staphylococcus aureus* en las distintas muestras y la identificación de las colonias aisladas mediante tira API-STAPH®

<b>Muestra<sup>2</sup></b>	<b>Colonias negras</b>	<b>Halo de precipitado</b>	<b>Identificación API-STAPH®</b>
<b>P1</b>	+	-	-
<b>P2</b>	+	-	<i>S. hominis</i>
<b>P3</b>	+	+	<b><i>S. aureus</i></b>
<b>P4</b>	+	+	<b><i>S. aureus</i></b>
<b>P5</b>	+	-	<i>Staphylococcus spp.</i>
<b>P6</b>	+	-	<i>S. auricularis</i>
<b>P7</b>	+	-	-
<b>P8</b>	+	-	-
<b>T1</b>	+	-	-
<b>T2</b>	+	-	<i>S. epidermidis</i>
<b>T3</b>	+	-	<i>Staphylococcus spp.</i>
<b>M1</b>	+	-	<i>S. sciuri</i>
<b>M2</b>	+	-	-
<b>M3</b>	+	-	-
<b>M4</b>	+	-	<i>S. epidermidis</i>
<b>M5</b>	+	-	<i>S. capitis</i>

<sup>2</sup> Leyenda de las muestras de los filetes ultracongelados de pescado: (M) para filetes de merluza, (P) para filetes de panga y (T) para filetes de tilapia.

En la Figura 4 vemos crecimiento de *Staphylococcus aureus* y crecimiento de *Staphylococcus spp.* en medio Baird-Parker.



**FIGURA 4.** En la imagen **a** se observa una fotografía de placa en medio Agar Baird-Parker en la que aparece el típico halo de precipitado característico de *Staphylococcus aureus*. En la imagen **b** podemos observar colonias sin precipitado.

No existe legislación para el control microbiológico de los productos de pesca congelados, aunque si existen recomendaciones en cuanto a la calidad microbiológica de estos productos.

El Comité Científico de la AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición) considera justificada y muy adecuada la aplicación de criterios microbiológicos en los PIFs (Puntos de Inspección Fronterizos) en relación a la importación de pescado y productos pesqueros procedentes de terceros países, referente a la presencia de microorganismos patógenos del género *Vibrio*. (Moragas, 2016).

Así pues, la subdirección general de Sanidad Exterior del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e igualdad publicó en marzo de 2014 un documento titulado “Parámetros de Seguridad Alimentaria para los Productos Pesqueros Destinados a la Unión Aduanera”. En este documento encontramos los parámetros microbiológicos a controlar por la UA (Unión Aduanera) donde los inspectores de sanidad tomarán como referencia los límites establecidos por la Decisión 299 de la UA (Tabla 4).

**TABLA 4.** Parámetros microbiológicos establecidos por la Unión Aduanera (UA) acordes a las Decisión 299.

<b>Productos</b>	<b>Parámetros UA</b>	<b>Límite Decisión 299 UA</b>
<i>Pescado refrigerado y congelado.</i> <i>Filetes de pescado y pescado cortado</i>	Aerobios mesófilos y anaerobios facultativos	10 <sup>5</sup> UFC/g
	Coliformes	Ausencia en 0,001 g
	<i>S. aureus</i>	Ausencia en 0,01 g
	<i>Salmonella</i>	Ausencia en 25 g
	<i>L. monocytogenes</i>	Ausencia en 25 g
	<i>V. parahaemolyticus</i>	Pescados marinos: 100 UFC/g

Los resultados obtenidos en nuestras muestras se pueden analizar en relación a los criterios establecidos por la Unión Aduanera.

En la Tabla 5 podemos observar los resultados obtenidos para las 8 muestras de panga, en la tabla 6 los resultados de tilapia y en la Tabla 7 los de merluza y si cumple o no los requisitos establecidos en la Tabla 4.

**TABLA 5.** Resultados de los análisis de panga respecto a la Decisión 299 de la UA.

<b>Producto</b>	<b>Parámetros UA</b>	<b>Cumplimiento Decisión 299 UA</b>
<i>P1</i>	Aerobios	APTO
	Coliformes	APTO
	<i>S. aureus</i>	APTO
<i>P2</i>	Aerobios	APTO
	Coliformes	APTO
	<i>S. aureus</i>	APTO
<i>P3</i>	Aerobios	<b>NO APTO</b>
	Coliformes	<b>NO APTO (<i>E. coli</i>)</b>
	<i>S. aureus</i>	<b>NO APTO</b>
<i>P4</i>	Aerobios s	<b>NO APTO</b>
	Coliformes	<b>NO APTO</b>
	<i>S. aureus</i>	<b>NO APTO</b>
<i>P5</i>	Aerobios	APTO
	Coliformes	APTO
	<i>S. aureus</i>	APTO
<i>P6</i>	Aerobios	APTO
	Coliformes	APTO
	<i>S. aureus</i>	APTO
<i>P7</i>	Aerobios	APTO
	Coliformes	<b>APTO (<i>E. coli</i>)</b>
	<i>S. aureus</i>	APTO
<i>P8</i>	Aerobios	APTO
	Coliformes	APTO
	<i>S. aureus</i>	APTO

Las 8 muestras de panga analizadas para *Samonella spp.*, *L. monocytogenes* y *Vibrio spp.* dan como resultado AUSENCIA en 25 gramos de producto.

**TABLA 6.** Resultados de los análisis de tilapia respecto a la Decisión 299 (UA)

<b>Producto</b>	<b>Parámetros UA</b>	<b>Cumplimiento Decisión 299 UA</b>
T1	Aerobios	APTO
	Coliformes	APTO
	<i>S. aureus</i>	APTO
T2	Aerobios	APTO
	Coliformes	APTO
	<i>S. aureus</i>	APTO
T3	Aerobios	APTO
	Coliformes	APTO ( <i>E. coli</i> )
	<i>S. aureus</i>	APTO

Las 3 muestras de tilapia analizadas para *Samonella spp.*, *L. monocytogenes* y *Vibrio spp.* dan como resultado AUSENCIA en 25 gramos de producto.

**TABLA 7.** Resultados de los análisis de merluza respecto a la Decisión 299 (UA)

<b>Producto</b>	<b>Parámetros UA</b>	<b>Cumplimiento Decisión 299 UA</b>
M1	Aerobios	APTO
	Coliformes	APTO
	<i>S. aureus</i>	APTO
M2	Aerobios	APTO
	Coliformes	APTO
	<i>S. aureus</i>	APTO
M3	Aerobios	APTO
	Coliformes	APTO
	<i>S. aureus</i>	APTO
M4	Aerobios s	APTO
	Coliformes	APTO
	<i>S. aureus</i>	APTO
M5	Aerobios	APTO
	Coliformes	APTO ( <i>E. coli</i> )
	<i>S. aureus</i>	APTO

Las 5 muestras de merluza analizadas para *Samonella spp.*, *L. monocytogenes* y *Vibrio spp.* dan como resultado AUSENCIA en 25 gramos de producto.

En la Decisión 299 de la UA, no se contempla el análisis de presencia de *E. coli*, sin embargo, en los análisis realizados apareció la presencia de *E. coli* en el recuento de coliformes de la muestra de tilapia 3, aunque el número de coliformes es bajo se detecta *E. coli* en este análisis con lo que se presupone un número elevado de esta bacteria, aunque el resto de parámetros cumplen los criterios.

Como se detecta bacterias coliformes después del enriquecimiento que se realiza para el análisis de salmonela, se realizaron identificaciones y encontramos la presencia de *E. coli* en las muestras de panga 3 y 7 y en la muestra de merluza 5.

#### 4. CONCLUSIONES

Este estudio ha permitido conocer de primera mano la biota microbiana en distintas especies de pescado ultracongelado y hacer un control de presencia de distintos patógenos causantes de toxiinfecciones alimentarias. Aunque no se ha analizado un número suficiente de muestras para realizar un estudio estadístico, sí que podemos tener información puntual de las muestras que hemos obtenido en los supermercados de nuestra zona. De esta manera, podemos extraer las siguientes conclusiones:

Aunque casi todas las muestras analizadas contienen bacterias aerobias y coliformes, los recuentos están por debajo de los criterios de la Decisión 299 de la UA.

Se detecta la presencia de *E. coli* en muestras que con un análisis rutinario no se detectaría, lo cual indica algún tipo de contaminación fecal, aunque sea con un bajo número de bacterias, no hay ninguna recomendación oficial de realizar análisis de *E. coli* en muestras de pescado congelado.

Se encuentra que el 100% de las muestras están contaminadas por bacterias del género *Staphylococcus*, están bacterias aun siendo ambientales se relacionan más con malas prácticas de higiene.

Se detecta en dos muestras de panga, *Staphylococcus aureus*, lo que supone un grave riesgo para la salud, si en los procesos de descongelación y cocinado se dan las condiciones óptimas para la producción de enterotoxinas.

No se detecta ni *Salmonella*, ni *Vibrio* ni *L. monocytogenes*, por lo que no hay presencia de los principales patógenos asociados a estos alimentos. En principio, si sólo se realizaran estos análisis todas las muestras serían aptas para el consumo, sin embargo, aplicando los criterios de la Decisión 299 de la UA, dos muestras de panga no serían aptas para el consumo.

Ya que en España la tendencia de consumo de productos de la pesca es consumirlos bien cocinados alcanzando temperaturas superiores a los 63° C, las especies bacterianas halladas no supondrían ningún riesgo importante que afecte a la seguridad alimentaria si se siguen buenas prácticas de higiene y tratamiento de productos congelados.

## 5. REFERENCIAS

- Adams, M.; Moos, M. Microbiología de los alimentos. *Editorial Acribia*. Zaragoza. España. 464 pp.1997.
- Ang Ngoc Tong Thi; Jacxsens, L.; Nosedá, B et al. Evaluation of the microbiological safety and quality of Vietnamese *Pangasius hypophthalmus* during processing by a microbial assessment scheme in combination with a self-assessment questionnaire. *Japanese Society of Fisheries Science*, August 2014.
- Artículo 149.1.16 de la Constitución Española de 1978 sobre la Sanidad Exterior que comprende aquellas actividades que se realicen en materia de vigilancia y control de los posibles riesgos para la salud derivados de la importación, exportación o tránsito de mercancías y del tráfico internacional de viajeros.
- Austin, B. The bacterial microflora of fish. *Scien. World J.* 52(3):558-572.2002.
- Comisión Europea (2000): Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria. Dirección URL:<[http://ec.europa.eu/dgs/health\\_consumer/library/pub/pub06\\_es.pdf](http://ec.europa.eu/dgs/health_consumer/library/pub/pub06_es.pdf)> [Consulta: 23 jun. 2017]
- Dambrosio, A.; Normanno, G.; Storelli, A. Aspects of vietnamese sutchi catfish (*Pangasius hypophthalmus*) frozen fillet quality: Microbiological profile and chemical residues. *Journal of Food Safety* 36 (2016) 532-536.
- Decisión 2007/275/CE sobre controles veterinarios en los PIF autorizados de la UE según la decisión 2009/281/CE.
- DG SANCO (2005): Documento de orientación sobre la aplicación de procedimientos basados en los principios del APPCC y sobre cómo facilitar la aplicación de los principios del APPCC en determinadas empresas alimentarias. *SANCO/1955/2005*. Dirección URL:<[http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/hygienelegislation/guidance\\_doc\\_haccp\\_es.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/hygienelegislation/guidance_doc_haccp_es.pdf)> [Consulta 1 jul. 2017].
- Doménech Antich, E.; Escriche Roberto, I. Gestión de Autocontrol en la Industria Alimentaria. Ed. Universitat Politècnica de València.
- Dominguez Carmona, M., (2010): Listeriosis. Una zoonosis emergente de transmisión alimentaria. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*.
- EFSA (2010): Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in humans, foodstuffs, animals and feedingstuffs, including information on foodborne outbreaks, antimicrobial resistance in zoonotic agents and some pathogenic microbiological agents. Dirección URL: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2597.pdf>> [Consulta 1 jul. 2017]
- ELIKA, FUNDACIÓN VASCA PARA LA SEGURIDAD ALIMENTARIA. Base de datos de legislación. Dirección URL: <[http://www.elika.eus/buscador\\_legislacion/es/](http://www.elika.eus/buscador_legislacion/es/)> [Consulta 30 jun. 2017]
- FAO-WHO (2016): Statistical Aspects of Microbiological Criteria Related to Foods. A Risk Managers Guide.
- FAO (2016): Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura. Contribución a la Seguridad Alimentaria y Nutrición para todos.
- Frazier, W. Microbiología de los Alimentos, 2ª ed. *Editorial Acribia*. Zaragoza, España. 512 pp. 1985
- Gram, L.; Dalgaard, P. Fish spoilage bacteriaproblems and solutions. *Current opin. Biotechnol.* 13:262-266. 2002.
- Graü, C.; Sánchez, D.; Zerpa, A.; Vallenilla, O.; Berti, O. Estudio de la microflora asociada a la formación de histamina en sardina (*Sardinilla aurita*). *Rev. Cient, FCV-LUZ.* XIII (3):199-204.2003.
- Hathaway, S. Development of food safety risk assessment, guidelines for foods of animal origin in international trade. *J. Food Prot.* 60(11):1432-1438. 1997.
- Jay J. Microbiología Moderna de los Alimentos. *Editorial Acribia S.A*, Zaragoza (España). 2002, 4 edición, 615 pp.
- Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Parámetros de Seguridad Alimentaria para los Productos Pesqueros Destinados a la Unión Aduanera. Ed. 2014. Dirección URL: <[https://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/sanidadExterior/docs/seguridad\\_UA\\_pesca\\_2014.pdf](https://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/sanidadExterior/docs/seguridad_UA_pesca_2014.pdf)> [Consulta 4 jul. 2017]

- Moragas, M.; De Pablo, B. Recopilación de normas microbiológicas. *Osasun eta Kontsumo Saila. Bilboko Udala; Bizkaiko Lurralde Zuzendaritza Osasun Saila. Eusko Jaurlaritza.* Enero 2017.
- Norma UNE-EN ISO 6579:2003. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp.
- Norma UNE-EN ISO 6888-3:2003. Método horizontal para el recuento de estafilococos coagulasa-positivos.
- Norma UNE-EN ISO 11290-1:1997. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes*.
- Norma ISO 16649-2:2001. Método horizontal para la identificación de *E. coli*.
- Norma ISO 21872 Método horizontal para la detección e identificación de *Vibrio* spp.
- Orihuel Iranzo, E.; Bertó Navarro, R.; Canet Gascó, J.J.; Lorenzo Cartón, F.; Milvaques Cucart, A. *Listeria monocytogenes* en industrias cárnicas. Colección: Patógenos y biofilms en la industria alimentaria. *Betelgeux*. 2ª Ed, 2013.
- Pascual Anderson, Mª R.; Calderón y Pascual, V. Microbiología Alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas. *Ed. Díaz de Santos*. 2ª Ed, 2012.
- RD 2073/2005 relativo a criterios microbiológicos alimentos.
- RD 1976/2004, normas zoonosanitarias para los productos origen animal.
- RD 1977/1999. Organización de Controles Veterinarios respecto a la introducción de productos de terceros países.
- Reglamento (CE) 136/2004 que avala los controles veterinarios efectuados por los inspectores de Sanidad Exterior en los PIF.
- Reglamento (CE) 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.
- Sohana Al Sanjee; Md. Ekramud Karim. Microbiological quality assessment of Frozen fish and fish processing materials from Bangladesh. *Hindawi Publishing Corporation. International Journal of Food Science Volume 2016*, Article ID 8605689.
- Torres, G.; Izquierdo, P.; Allara, M.; García, A. Efecto de la temperatura y tiempo de almacenamiento sobre el crecimiento de bacterias productoras de histamina en dos especies de pescados: lisa (*Mugil curema*) y róbalo (*Centropomus undecimalis*) *Rev. Cient. FCVLUZ*. XIII (4): 263-268.2003.
- WWF: Fish Forward. Pangasius Project. Dirección URL:  
<<http://www.fishforward.eu/en/project/pangasius>> [Consulta 3 jul. 2017]