

ESTUDIO PRELIMINAR SOBRE LA CALIDAD
MICROBIOLOGICA DEL PESCADO EN VENTA
EN LA CIUDAD DE GUATEMALA

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

ESTUDIO PRELIMINAR SOBRE LA CALIDAD
MICROBIOLOGICA DEL PESCADO EN VENTA
EN LA CIUDAD DE GUATEMALA

JOSE MIGUEL RIDELMAN

Trabajo de investigación presentado
para optar al grado académico de
LICENCIADO EN BIOLOGIA

Guatemala

1978

Vo. Bo. :

(f) _____
Licenciado Ricardo Luján L.
Asesor

Tribunal:

(f) _____
Licenciado Ricardo Luján L.
Departamento de Biología
Universidad Del Valle de Guatemala

(f) _____
Doctora Margaret Dix
Departamento de Biología
Universidad Del Valle de Guatemala

(f) _____
Licenciado Roberto De León
Departamento de Microbiología
Instituto Centro Americano de
Investigación y Tecnología Industrial

Fecha de aprobación:

El presente Trabajo de Graduación fue realizado en los Laboratorios del Instituto Centro Americano de Investigación y Tecnología Industrial (ICAITI), con la subvención del International Center for Marine Resource Development, Universidad de Rhode Island, Rhode Island, Estados Unidos de América.

A mis padres

Antonio N. Ridelman
Alice T. de Ridelman

A mis hermanos

Roberto y David

A mi novia

Carolina Monzón

A mis profesores

A mis amigos

RECONOCIMIENTOS

Agradezco a las autoridades del Instituto Centro Americano de Investigación y Tecnología Industrial (ICAITI) y a su personal profesional y técnico, en particular al licenciado Roberto de León y a la licenciada Sheryl de Cabrera, la gran ayuda que se me brindó al hacer el presente trabajo.

Deseo expresar mi más profunda gratitud al licenciado Ricardo Luján L. por su constante asesoría en la elaboración de este trabajo.

Agradezco a los doctores Michael y Margaret Dix sus valiosos consejos y enseñanzas; a Carolina Monzón, su constante ayuda.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	ix
1. INTRODUCCION	1
2. REVISION BIBLIOGRAFICA	4
2.1 Flora bacteriana normal de peces	4
2.2 Cambios en la flora bacteriana	5
2.2.1 Cambios en la flora producidos por variaciones de temperatura	5
2.2.2 Adquisición de bacterias patógenas	6
2.2.3 Descomposición del pescado	6
2.3 Uso del hielo como medio de preservación	10
2.4 Estándares de calidad microbiológica	11
3. MATERIALES	17
3.1 Puestos de venta de pescado procesado	17
3.2 Puestos de venta de pescado fresco	19
3.2.1 Mercado La Terminal	19
3.2.2 Mercado Colón	21
4. METODOS	23
4.1 Recolección de las muestras de pescado procesado	23
4.2 Recolección de las muestras de pescado fresco	24
4.3 Análisis microbiológico de las muestras	25
4.3.1 Recuentos aeróbicos en placa a 25°C	25
4.3.2 Recuentos de coliformes fecales	26
4.3.3 Recuentos de <u>Staphylococcus aureus</u> coagulasa positivo	26
4.4 Análisis estadístico	27

	Página
5. RESULTADOS	28
5.1 Análisis de las muestras de pescado procesado	28
5.2 Análisis de las muestras de pescado fresco	33
5.2.1 Mercado La Terminal	33
5.2.2 Mercado Colón	39
6. DISCUSION	47
6.1 Pescado procesado	48
6.2 Pescado fresco	50
6.2.1 Mercado La Terminal	50
6.2.2 Mercado Colón	52
7. CONCLUSIONES	54
8. RECOMENDACIONES	56
9. BIBLIOGRAFIA	58
APENDICES	
A. Métodos microbiológicos	64
B. Medios de cultivo utilizados	68
C. Análisis de varianza de una clasificación por rangos de Kruskal-Wallis	72

LISTA DE CUADROS

	Página
1. Tipos de pescado muestreados en los diferentes puestos de venta	18
2. Recuentos microbiológicos de las muestras de pescado procesado	29
3. Humedad relativa de los puestos de venta de pescado procesado	32
4. Mercado La Terminal. Recuentos aeróbicos en placa a 25° C por centímetro cuadrado o por mililitro	34
5. Mercado La Terminal. Recuentos de coliformes fecales por centímetro cuadrado o por mililitro	35
6. Mercado La Terminal. Recuentos de <u>Staphylococcus aureus</u> coagulasa positivo por centímetro cuadrado o por mililitro	36
7. Mercado Colón. Recuentos aeróbicos en placa a 25° C por centímetro cuadrado o por mililitro	40
8. Mercado Colón. Recuentos de coliformes fecales por centímetro cuadrado o por mililitro	41
9. Mercado Colón. Recuentos de <u>Staphylococcus aureus</u> coagulasa positivo por centímetro cuadrado o por mililitro	42

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Diagrama comparativo entre los recuentos microbiológicos de las muestras de pescado procesado de los diferentes puestos de venta y los estándares sugeridos por APHA	31
2. Mercado La Terminal. Variaciones en los recuentos aeróbicos en placa a 25° C	37
3. Mercado La Terminal. Variaciones en los recuentos de coliformes fecales	38
4. Mercado Colón. Variaciones en los recuentos aeróbicos en placa a 25° C	44
5. Mercado Colón. Variaciones en los recuentos de coliformes fecales	45

RESUMEN

Se determinaron recuentos de microorganismos aeróbicos, de coliformes fecales y de Staphylococcus aureus coagulasa positivo en muestras de pescado procesado y pescado fresco recogidas en supermercados y mercados de la ciudad de Guatemala, con el propósito de obtener un panorama de la calidad microbilógica del pescado en venta. Se evaluaron además muestras de agua, hielo y líquido residual, y superficies de pisos, mostradores y congeladores. En el pescado procesado los recuentos aeróbicos variaron entre 1.5×10^4 y 5.3×10^7 microorganismos por gramo, los recuentos de coliformes fecales entre 0 y 460 células por gramo, y los de S. aureus entre 0 y 1000 células por gramo. En el pescado fresco los recuentos aeróbicos variaron entre 3.8×10^4 y 1.9×10^7 microorganismos por centímetro cuadrado de superficie, los recuentos de coliformes fecales entre 0 y 160 células por centímetro cuadrado, y los de S. aureus entre 0 y 70 células por centímetro cuadrado. El hielo y el líquido residual, muestreados en los puestos de venta de pescado fresco, mostraron los recuentos aeróbicos más altos, alcanzando hasta 2.0×10^9 . No se encontró correlación entre los parámetros microbiológicos usados.

1. INTRODUCCION.

El pescado representa una fuente alimenticia alta en proteínas, pero en los países centroamericanos, por varias razones, se le ha dado poca importancia en la dieta y economía alimenticia. Una de estas razones es el pobre desarrollo de una industria pesquera, debido a la falta de estudios económicos y de aceptabilidad del producto por el consumidor que promuevan una industria pesquera a gran escala; además, el conocimiento de las medidas que deben tomarse para la mejor preservación del pescado en los trópicos es escaso.

La industria pesquera no ha logrado desarrollarse a gran escala en Guatemala. Con excepción del camarón, los productos pesqueros son extraídos de una manera rudimentaria, frecuentemente haciendo uso de pequeñas embarcaciones ("cayucos") o de lanchas con motor con dos y, a veces, tres pescadores. Estos pescadores no sólo no poseen los conocimientos técnicos ni los recursos económicos suficientes para el manejo adecuado del producto, sino que las pequeñas embarcaciones no cuentan con medios de preservación que mantengan el producto a bajas temperaturas para evitar su descomposición; el pescado puede estar hasta doce horas a temperatura ambiente antes de ser llevado a refrigeradores o cámaras con hielo en que es transportado a los puestos de

venta.

Como consecuencia de esta falta de técnicas de preservación adecuadas, la descomposición del pescado es relativamente rápida, y el riesgo de toxi-infección del consumidor es alto. (Disney, 1974).

El incremento de la industria pesquera en Guatemala ayudaría a solucionar algunos problemas nutricionales, proveyendo al consumidor de otras fuentes de proteína animal. También fortalecería la economía interna con la exportación del producto. Sin embargo, para asegurar buenos resultados en el desarrollo de esta industria, es necesario tener mayores conocimientos de los procesos de descomposición y de las técnicas de preservación.

Los factores ambientales en las zonas templadas, que influirían en la descomposición del pescado, difieren de los factores de las zonas tropicales. Por lo tanto, es difícil predecir si los avances obtenidos en el desarrollo de las ciencias pesqueras y en el manejo adecuado de su producto, en las zonas templadas, son aplicables en los trópicos (Disney et al., 1973; Garm y Limpus, 1976). Algunas de las técnicas de preservación usadas en países de zonas templadas, como el sobrecongelamiento, ya han demostrado ser no aplicables y a veces innecesarias en los trópicos (Disney et al., 1973).

Además de incrementar una industria pesquera en sí, es necesario introducir estándares de calidad microbiológica para determinar y controlar las fuentes de contaminación del pescado y para prevenir el riesgo de toxi-infecciones del consumidor; de esta forma se prolonga la calidad del producto y se reducen las pérdidas del vendedor.

El presente trabajo es un aporte al conocimiento existente de la calidad del pescado en los puestos de venta de la ciudad de Guatemala. Los objetivos de este estudio incluyeron los siguientes: obtener datos cuantitativos de la calidad microbiológica del pescado que se vende a los consumidores; comparar los niveles de contaminación en diferentes mercados y supermercados; determinar cuáles son las fuentes de contaminación en los puestos de venta, por medio de observaciones del manejo del pescado.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA.

2.1 Flora bacteriana normal de peces.

La flora bacteriana normal de peces recién capturados en zonas tropicales es diferente a la flora de peces recién capturados en zonas templadas.

En los peces de zonas templadas son predominantes las bacterias psicrotróficas, definidas como bacterias con temperatura óptima de crecimiento de 37° C (mesofílicas) con capacidad de reproducirse a 0° C (Krueger et al., 1973). Entre las bacterias psicrotróficas son más frecuentes las Gram negativo, como Pseudomonas, Vibrio, Achromobacter, Flavobacterium, Cytophaga, Corynebacterium, Alteromonas, Moraxella y Acinetobacter (Liston, 1960; Shewan y Hobbs, 1967; Shewan, 1976a).

En los peces de zonas tropicales, las bacterias mesofílicas Gram positivo son predominantes (Disney, 1974), siendo más frecuentes los micrococcos, Staphylococcus, Streptococcus, Arthrobacter, Lactobacillus y algunas bacterias corineformes (de León, 1976). Las bacterias Gram negativo son menos frecuentes, y de ellas Moraxella y Alcaligenes constituyen hasta 65% (de León, 1976). Pseudomonas, considerado como el género de mayor importancia en la descomposición bacteriológica del pescado en las zonas templadas (Liston, 1960; Lerke et al., 1965; Herbert et al., 1971), constituyen so-

lamente 12% de la población de bacterias Gram negativo (de León, 1976).

Las bacterias psicrófilicas, definidas como bacterias con temperatura óptima de crecimiento de 15° C o menos y máxima de 20° C (Morita, 1975) son poco frecuentes en los trópicos. (Disney, 1974; Morita, 1975; Shewan, 1976a).

2.2 Cambios en la flora bacteriana.

Los cambios en la flora bacteriana son provocados por la contaminación del agua, por contaminación durante el manejo del pescado o por variaciones de temperatura, por lo que se pueden iniciar antes de la pesca, durante la pesca o durante el manejo posterior (Shewan, 1971; Disney et al., 1973).

Los cambios microbiológicos comprenden variaciones en la frecuencia de especies y aumento de la población inicial debidos a variaciones de temperatura, y adquisición de bacterias extrañas a la flora inicial, entre las cuales las de mayor importancia sanitaria son las patógenas y las descomponedoras.

2.2.1 Cambios en la flora producidos por variaciones de temperatura.

La población de organismos aumenta durante el tiempo que transcurre antes de introducir en hielo el pescado recién capturado (Disney et al., 1973). El almacenamiento del pescado a bajas temperaturas hace menos notorias

las diferencias en flora de peces de distintas zonas climáticas, provocando un cambio de una flora predominantemente mesofílica gram positivo a una flora psicrotrofica gram negativo (Shewan y Hobbs, 1967; Disney, 1974).

2.2.2 Adquisición de bacterias patógenas. Cuando el pescado ha sido extraído de aguas no contaminadas, la presencia de bacterias patógenas es considerada un reflejo de malas técnicas pesqueras y de preservación (Shewan, 1970).

Entre los microorganismos patógenos adquiridos por el pescado se han reportado Pseudomonas (Lerke et al., 1965; Shewan y Hobbs, 1967; Chai et al., 1968; Levin, 1968), Aeromonas, Vibrio, Mycobacterium, Myxobacterium, Corynebacterium, Streptomyces (Shewan y Hobbs, 1967), Achromobacter (Lerke et al., 1965; Herbert et al., 1971), Salmonella (Raj y Liston, 1961; Shewan, 1961), Clostridium (Nickerson y Goldblith, 1962; Gordon y Murrell, 1967 en Shewan, 1970), Staphylococcus (Raj y Liston, 1961; Shewan, 1970; Baer et al., 1976; Miskimin et al., 1976).

2.2.3 Descomposición del pescado. La descomposición del pescado depende de la flora bacteriana inicial, de la composición química inicial, de la flora bacteriana adquirida durante el manejo y procesamiento, y de las condiciones de almacenamiento (Shewan y Hobbs, 1967).

Las causas principales de descomposición del pescado son (1) la actividad enzimática en los tejidos y (2) la acción de grupos de bacterias Gram negativo (Shewan, 1961), particularmente Pseudomonas y Achromobacter (Lerke et al., 1965; Herbert et al., 1971).

La composición química inicial de peces recién capturados es básicamente agua (81%), proteínas (15%) y extractivos (1.5%); estos últimos comprenden una mezcla heterogénea de bases nitrogenadas, aminoácidos libres, péptidos simples, carbohidratos, y purinas y sus derivados (Shewan y Jones, 1957).

Las proteínas, que constituyen un alto porcentaje de la composición química del músculo del pescado, forman un coloide que interfiere en la cristalización del agua; este proceso minimiza la pérdida de agua de microorganismos como coliformes, enterococos, estreptococos y estafilococos, pudiéndose considerar una protección para ellos (Raj y Liston, 1961).

Los extractivos, aunque pocos en cantidad, juegan un papel importante en el metabolismo del músculo y en el sabor del pescado. Durante la descomposición, algunos de los extractivos, como anserina y taurina, desaparecen principalmente por la acción enzimática, y otros, como creatina y óxido de trimetilamina, por la acción de bacterias descomponedoras,

provocando cambios en las propiedades químicas y físicas del pescado (Shewan y Jones, 1957).

Los cambios debidos solamente a la actividad enzimática durante la descomposición son considerables desde el punto de vista bioquímico (Shewan y Jones, 1957), pero relativamente insignificantes respecto a los cambios organolépticos (Partman, 1966 en Herbert et al., 1971). Generalmente, la descomposición por bacterias ocurre mucho antes que sea notorio cualquier cambio físico o químico (IFT, 1974).

La descomposición bacteriana se inicia con la penetración de organismos descomponedores por las agallas, el intestino y, en menor cantidad, por la piel (Shewan, 1961; Herbert et al., 1971); cuando se realiza el proceso de evisceración, la penetración de bacterias se produce directamente a través del músculo, contaminándolo con flora intestinal (Shewan y Hobbs, 1967; Disney, 1974).

A temperaturas de 0° C, ciertos grupos específicos de Pseudomonas son los más activos en la descomposición (Lerke et al., 1965; Shewan y Hobbs, 1967). Aeromonas y Vibrio, aunque se encuentran en menor número, también son fuertes descomponedores (Lerke et al., 1965).

Las bacterias son responsables de la mayor parte de los olores y sabores producidos durante la descomposición (Shewan y Hobbs, 1967; Herbert et al., 1971). Los olores varían

según la descomposición química causada por diferentes especies de bacterias. Ciertas especies de Pseudomonas han sido relacionadas con los olores despedidos por el pescado durante su descomposición. Los olores frutosos son producidos por Pseudomonas fragis (Herbert et al., 1971), mientras que los olores sulfurosos por Pseudomonas putrefaciens (Chai et al., 1968; Herbert et al., 1971). Estas bacterias, aunque crecen considerablemente a bajas temperaturas, nunca sobrepasan de 10% a 20% de la flora total (Herbert et al., 1971).

Los cambios organolépticos, causados principalmente por la descomposición bacteriana, son (1) el hundimiento de los ojos, (2) el oscurecimiento de las agallas a un color púrpura o café, (3) el desprendimiento de un olor pútrido o amoniacal, (4) el ablandamiento del músculo y (5) el cambio de la cantidad de mucus en la superficie de la piel; particularmente este último es uno de los más útiles indicadores de descomposición (Amu y Disney, 1973).

Herbert et al. (1971), encontraron que cultivos puros de Pseudomonas no producen ablandamiento del músculo de pescado, por lo que atribuyen este cambio a otros grupos de bacterias.

Otros cambios en las propiedades físicas del pescado son producidos por la humedad relativa. Una diferencia de 10% a 15% en la humedad relativa entre el medio y el pescado provoca deshidratación del pescado (Sawant y Magar, 1961).

2.3 Uso del hielo como medio de preservación.

Las pérdidas de la calidad estética y del valor nutritivo provocadas por la descomposición se pueden disminuir refrigerando el pescado, frenando así la actividad enzimática e inhibiendo el crecimiento de microorganismos (IFT, 1974).

En los trópicos, la descomposición del pescado es más rápida que en las zonas templadas a menos que se aplique alguna forma de preservación (Disney et al., 1973); la aplicación temprana de hielo extiende considerablemente la calidad del pescado (Amu y Disney, 1973). Se han reportado niveles mucho más bajos de bacterias en pescados tropicales que en pescados de zonas templadas cuando se almacenan en hielo (Disney, 1974); esta diferencia se debe a la intolerancia a las bajas temperaturas de las bacterias tropicales (Amu y Disney, 1973). De hecho, el almacenamiento en hielo es la técnica de preservación más usada en los trópicos. Pero aún cuando la descomposición es retardada por el hielo, su uso no es suficiente si las condiciones de captura y manejo posterior no han sido adecuadas (Raj y Liston, 1960).

Es ampliamente conocido el hecho de que las poblaciones de microorganismos aumentan durante las horas que transcurren antes de introducir el pescado en hielo; sin embargo, no existe un acuerdo respecto al tiempo máximo de exposición de pescados tropicales a temperatura ambiente. Antunnes

(1971 en Disney et al., 1973) recomienda que el tiempo de exposición de pescados tropicales a temperatura ambiente no exceda una hora. Por otro lado, Balakrishnan Nair et al. (1974) encontraron que la población bacteriana no cambia significativamente durante las primeras siete horas.

2.4 Estándares de calidad microbiológica.

Un estándar microbiológico es un criterio legal para el control de calidad de alimentos, el cual es aplicado por una institución reguladora al producto inicial, al producto procesado o al producto almacenado (Shewan, 1976**b**).

El propósito de cualquier estándar de calidad es asegurar que los productos que llegan al consumidor sean de buena calidad alimenticia y estén libres de toxinas y organismos patógenos (Shewan, 1970; Ingram, 1971; Corlett, 1974; Shewan, 1976**b**).

En el sentido estrictamente legal, existen pocos estándares microbiológicos, y las especificaciones, o criterios microbiológicos sin respaldo legal, son más comúnmente usados (Shewan, 1976**b**); en la actualidad existe una tendencia a transferir a las industrias de alimentos mayor responsabilidad de desarrollar sus propios programas que aseguren la calidad de los productos (Kempa, 1973).

El contenido de bacterias de los alimentos varía dependen-

do de su constitución química y de factores extrínsecos, por lo que no se puede aplicar un mismo criterio microbiológico a los diferentes productos alimenticios (Kempa, 1973; Read y Baer, 1974; Yeterian et al., 1974; Garm y Limpus, 1976). Se han propuesto muchos estándares microbiológicos de calidad para una gran diversidad de alimentos (Surkiewicz et al., 1973; Duitschaver et al., 1973; Kempa, 1973; Surkiewicz et al., 1975; Emswiler et al., 1976; Ercolani, 1976).

Existen muchos estándares microbiológicos sugeridos para productos pesqueros de diferentes países, algunos de los cuales se adaptan a las exigencias impuestas por instituciones que tienen en sus manos el control de calidad (Kempa, 1973; Garm y Limpus, 1976).

El análisis microbiológico como índice de calidad generalmente comprende una estimación de la cantidad de organismos aeróbicos, el cual es un índice de la probabilidad de encontrar organismos patógenos (Corlett, 1974; Baer et al., 1976; Miskimin et al., 1976; Shewan, 1976b). Con este análisis se obtiene un reflejo del grado de contaminación del alimento, de la contaminación de las superficies que están en contacto con el producto y de las condiciones que prevalecen durante el manejo y almacenamiento del producto (Insalata y Raab, 1970; Read y Baer, 1974).

Otras pruebas microbiológicas de calidad sanitaria se rea-

lizan con organismos indicadores como Escherichia coli y Staphylococcus aureus. E. coli generalmente está ausente del ambiente marino y su crecimiento es inhibido por bajas temperaturas, por lo que los recuentos altos son índice de malas prácticas manufactureras (Shewan, 1976b). Estimaciones del número de E. coli son indicadores de contaminación fecal y, por consiguiente, de la posible presencia de Salmonella (Miskimin et al., 1976) y de otras bacterias enteropatógenas (Corlett, 1974; Yeterian et al., 1974). De acuerdo con Corlett (1974), la presencia de S. aureus en los alimentos es un reflejo de contaminación durante el manejo, aunque según Janssen y Meyers (1968 en Shewan, 1970) es posible encontrar esta especie en peces recién capturados provenientes de aguas no contaminadas.

Otros organismos han sido propuestos como indicadores. Thatcher y Clark (1968) sugieren recuentos de estreptococos de origen fecal. Chai et al. (1968) proponen Pseudomonas putrefaciens, el cual, en pescados de buena calidad, constituye menos del 4% de la flora total y aumenta hasta 50-90% al aumentar los recuentos totales de bacterias hasta 10^6 ó más microorganismos por gramo.

La efectividad de los parámetros microbiológicos mencionados ha sido muy discutida. Corlett (1974) considera que los recuentos aeróbicos son una medida poco confiable de la probabilidad de que el alimento posea o no organismos pató-

genos. Yeterian et al. (1974) opinan que las poblaciones de bacterias cambian con el tiempo y pueden no reflejar las condiciones bajo las cuales los alimentos han sido manejados. Además, los recuentos totales sólo miden las poblaciones de microorganismos que crecen bajo las condiciones impuestas en el laboratorio (Shewan, 1976b).

También es discutible la importancia de los exámenes microbiológicos cuando los recuentos se obtienen de la superficie del pescado. Shewan (1976a) opina que la razón de descomposición es diferente dependiendo de la composición química de la mucosa que cubre la piel del pescado. Además, de acuerdo con Disney et al. (1973), la habilidad de penetrar la piel está limitada a muy pocas especies de bacterias, por lo que el grado de descomposición bacteriana del músculo puede no estar relacionado con el estado de la piel del pescado.

Según Corlett (1974), los recuentos de organismos aeróbicos no son siempre representativos de la descomposición del pescado, ya que si se encuentran presentes grupos de microorganismos más aptos para causar la descomposición, y el medio es favorable, la descomposición se puede producir aun con recuentos bajos. Disney et al. (1973) encontraron que la exposición de pescado del género Tilapia por 15 a 20 horas a temperatura no regulada daba como resultado descomposición del pescado con recuentos relativamente bajos.

De cualquier manera, los estándares de calidad microbiológica siguen utilizándose pero, habiéndose elaborado en su mayoría para países de zonas templadas, su aplicación en los trópicos requiere investigación. Watanabe y Ulstrup (1973) sugieren el límite de 10^7 microorganismos aeróbicos por centímetro cuadrado en la superficie de pescados de los mercados de Zambia. El Codex Alimentarius (en Shewan, 1970) sugiere recuentos aeróbicos no mayores de 10^5 , recuentos de coliformes no mayores de 300, y recuentos de E. coli y S. aureus no mayores de 100 bacterias por gramo. Frchette y Michael (1961 en Silverman et al., 1961) propusieron estándares para el pescado del estado de Massachusetts, los cuales son más estrictos que los mencionados hasta ahora, exigiendo recuentos aeróbicos menores de 5×10^4 , recuentos de coliformes menores de 10, y S. aureus ausente. El Canadian Fish Inspectorate (en Shewan, 1970) sugiere recuentos aeróbicos de 2.5×10^5 como límite de aceptación en el pescado. Baer et al. (1976) recomiendan recuentos aeróbicos de 10^6 y califican de inaceptable cualquier recuento mayor de 10^7 ; también consideran que el límite propuesto por el Codex Alimentarius es demasiado bajo. La American Public Health Association (APHA, 1976) sugiere que recuentos de 10^6 microorganismos aeróbicos por gramo son indicativos de descomposición, y que si los recuentos de coliformes fecales exceden 10 bacterias por gramo en pescado congelado y de 40 en pescado seco-salado, el producto ha sufrido mal manejo;

S. aureus no debería exceder 100 bacterias por gramo de tejido.

En la actualidad los exámenes microbiológicos son generalmente acompañados de pruebas organolépticas, como color y olor de agallas y olor y consistencia del músculo (Watanabe y Ulstrup, 1973; Amu y Disney, 1973). También se han usado pruebas químicas como índice de calidad: contenido de sustancias volátiles reductoras (SVR), contenido de trimetilamina (TMA), contenido de bases volátiles totales (BVT), contenido de ácido tiobarbitúrico (ATB), estimaciones enzimáticas de hipoxantina y valores de pH (Farber y Lerke, 1961; Amu y Disney, 1973). A excepción de las estimaciones enzimáticas de hipoxantina, las pruebas químicas mencionadas no son recomendables ya que los valores no son constantes en las diferentes especies de peces (Amu y Disney, 1973).

No existen estándares de calidad microbiológica para el pescado de venta en Guatemala; solamente índices de calidad organoléptica han sido sugeridos por la Municipalidad de Guatemala a los vendedores de pescado en los mercados. Estos índices están basados principalmente en la consistencia del músculo y en el color de las agallas.

3. MATERIALES.

Se muestrearon puestos de venta de pescado procesado y fresco en cuatro supermercados y tres mercados de la ciudad de Guatemala, durante los meses de marzo a mayo de 1977. Los tipos de pescado muestreados en los diferentes puestos de venta se describen en el Cuadro 1.

3.1 Puestos de venta de pescado procesado.

En este estudio se considera pescado procesado al pescado que haya sufrido uno o más de estos tipos de procesamiento: (a) congelamiento, (b) secado, (c) salación, (d) ahumación, (e) precocimiento, (f) cocimiento, (g) fermentación, (h) envasado, o cualquier otra técnica de elaboración. En este estudio únicamente se analizó pescado congelado y pescado seco-salado.

Un total de 18 muestras de pescado procesado fue recogido, 15 de las cuales eran pescado congelado proveniente de los supermercados, y 3 de pescado seco-salado de venta en uno de los mercados, La Placita.

En general, los cuatro supermercados tienen condiciones sanitarias parecidas; todos usan congelador para preservar el producto, aunque uno de ellos, el supermercado Paiz Montúfar, coloca el pescado en bandejas con hielo con objeto de

Cuadro 1. Tipos de pescado muestreados en los diferentes puestos de venta.

<u>Tipo de pescado</u>	<u>Lugares muestreados</u>	<u>Número de muestras analizadas</u>
Pescado procesado Pescado congelado	Supermercado Paiz Montúfar	4
	Supermercado La Torre	5
	Supermercado Norte	3
	Supermercado Residencial	3
	Mercado La Placita	3
Pescado seco-salado	Mercado La Terminal	3*
	Mercado Colón	3**
Pescado fresco		

* muestreados en piel y cavidad eviscerada durante 4 días consecutivos

** muestreados durante 3 días consecutivos; sólo un pescado en cavidad eviscerada

darle presencia estética para su venta. En este caso, la relación pescado-hielo parecía ser de uno a uno. En dos de los otros supermercados, Norte y La Torre, el pescado no se encontraba distribuido ordenadamente en el congelador; algunas de las bolsas de empaque estaban abiertas y mal identificadas, con una misma leyenda impresa en bolsas que contenían pescado de diferentes especies; además, no había una persona encargada capaz de informar al consumidor sobre el tipo de producto en venta.

En todos los puestos de venta de pescado congelado se pudo observar otros productos en el mismo congelador sin estar debidamente distribuidos.

3.2 Puestos de venta de pescado fresco.

El análisis de pescado fresco se realizó con muestras de dos mercados de la ciudad, mercado La Terminal y mercado Colón.

3.2.1 Mercado La Terminal. El mercado La Terminal es, al presente, el más grande del país, y funciona también como centro de distribución de productos que llegan de otros lugares del país y de la República de El Salvador. Existe una sección específica para la venta de productos pesqueros, y los locales están contruidos con este propósito. Cada puesto de venta tiene fuente de agua potable y mostra-

dores de cemento forrados de azulejos. Aunque las instalaciones son adecuadas para la venta de pescado, las personas encargadas no las usan correctamente. Con frecuencia los mostradores son cubiertos con pliegos de plástico, evitando que el líquido residual (formado por el hielo derretido, la sangre y la suciedad de la superficie del pescado) pueda fluir libremente por el drenaje. Las moscas son abundantes y la iluminación no es adecuada, ya que el mercado tiene techo bajo y sus ventanas están cubiertas con tablas de madera.

Aun cuando el puesto de venta seleccionado para el muestreo tiene agua potable, el vendedor no hace uso adecuado de ésta, sino que sumerge sus instrumentos y el pescado en una palangana grande con agua para lavarlos de vez en cuando. El agua de la palangana se observó siempre bastante turbia.

El pescado es desescamado y fileteado con un cepillo hecho de madera y clavos, y con un cuchillo, los cuales son raramente lavados o desinfectados. El hielo es colocado en grandes trozos entre los pescados, pero durante el muestreo no se encontró; sin embargo, la temperatura del pescado era de 9° C, aproximadamente.

En la noche el pescado permanece almacenado entre capas de hielo en canastos de fibra de caña de azúcar cubiertos con plástico y hojas de pacaya.

En la entrada al mercado se pudo observar el manejo de los grandes bloques de hielo que son vendidos a los encargados de la pesquería. El hielo es cortado con serrucho en una plataforma de madera colocada en una de las calles fuera del mercado, expuesta al polvo y contaminación del lugar.

3.2.2 Mercado Colón. El mercado Colón, localizado en una de las zonas más viejas de la ciudad, es una construcción grande y alta, dividida en dos secciones principales: una en la que se encuentra gran número de comedores y carnicerías, y otra en que se venden verduras y otros productos. Como en muchos otros mercados, en éste también son abundantes los puestos de venta colocados en los corredores. Para la venta de pescado no existe una zona específica, y durante el tiempo de muestreo sólo se pudieron observar tres puestos de venta de pescado, dos de ellos en los corredores de la sección de comedores y carnicerías, uno de los cuales fue el muestreado. Ninguno cuenta con una construcción apropiada, y no ocupan un área mayor de tres metros cuadrados.

El puesto de venta seleccionado obstruye el paso en el corredor, de manera que es sumamente dificultoso permanecer allí durante la compra. Aunque el mercado posee ventanales, la luz en el local es escasa, debido a la estrechez del corredor y a la ceniza proveniente del humo de las cocinas

que se ha depositado en las paredes y ventanas. El lugar no tiene luz artificial ni fuente de agua, la cual debe ser acarreada en botes de lata. El local está infestado de moscas que continuamente se posan en los alimentos, la mesa y la balanza.

Para desescamar y filetear el pescado, el vendedor usa un cepillo hecho de madera y clavos, y un cuchillo, los cuales son raramente lavados o desinfectados. La mesa de cortar es de madera y su superficie está llena de rendijas producidas por el cuchillo al efectuar los cortes.

El hielo es comprado en grandes trozos que quiebra el encargado, quien lo coloca entre el pescado, pero sin proveer suficiente contacto. Durante la noche el pescado permanece almacenado entre hielo y cubierto con hojas de plátano o con plástico en una caja de madera forrada de lámina galvanizada en el interior.

El pescado es expuesto al consumidor junto con otros productos, como camarones, cangrejos y huevos de tortuga, en bandejas de lámina galvanizada cubierta con plástico, donde el líquido residual se acumula.

4. METODOS.

4.1 Recolección de las muestras de pescado procesado.

La mayoría de las muestras de pescado congelado se encontraban empaquetadas en bolsas plásticas. Para el transporte al laboratorio, las muestras de pescado congelado que estaban sin empaquetar y las de pescado seco-salado se colocaron en bolsas plásticas estériles (Whirl-pak).

Además de las muestras de pescado, se recogieron muestras de la superficie de las paredes laterales de los congeladores y de la superficie de la mesa del puesto de venta de pescado seco-salado. Estas muestras se recogieron haciendo frotos con un hisopo estéril (Falcon Plastics) humedecido en una solución estéril de peptona al 0.1% (Laboratorios Difco) en un área determinada por un marco de lámina galvanizada estéril, según las técnicas sugeridas por Tretsvén (1963b) y recomendadas por Thatcher y Clark (1968). El área del marco de dos centímetros cuadrados, sugerida por Tretsvén (1963b) como el área óptima para el muestreo con esta técnica, fue modificada a diez centímetros cuadrados de exposición para mayor facilidad en el muestreo.

Todas las muestras fueron llevadas al laboratorio en una hielera y empezadas a analizar de inmediato.

4.2 Recolección de las muestras de pescado fresco.

Se marcaron y muestrearon tres pescados en cada mercado hasta que se observó indicios de descomposición organoléptica (tres a cuatro días), con el propósito de conocer los cambios microbiológicos sufridos por el pescado durante su estadía en el puesto de venta. Durante este período el pescado marcado fue manipulado por el vendedor junto con los otros pescados en venta.

Se tomaron muestras de la superficie de la piel y de la cavidad del pescado, si éste se encontraba eviscerado. Además se tomaron muestras de las superficies de los mostradores y del piso del puesto de venta, haciendo frotos con un hisopo estéril humedecido en solución estéril de peptona al 0.1% (Difco) en un área determinada por un marco de lámina galvanizada estéril. Los hisopos se colocaron en tubos estériles (Falcon Plastics) con aproximadamente cinco mililitros de solución estéril de peptona al 0.1% (Difco). También se recogieron muestras de agua, hielo y líquido residual en bolsas plásticas estériles (Whirl-pak). Todas las muestras, con excepción de las de pescado, se tomaron a diario durante seis días. El hielo se muestreo derretido.

Las muestras fueron llevadas al laboratorio en una hielera y empezadas a analizar de inmediato.



4.3 Análisis microbiológico de las muestras.

Para las muestras de pescado procesado se prepararon homogenizados según las técnicas recomendadas por Thatcher y Clark (1968). Una dilución inicial se obtuvo según el método de raspado de superficie sugerido por Tretsven (1963a), colocando once gramos de muestra cortados de la superficie del pescado en 99 mililitros de solución estéril de peptona al 0.1% (Difco) hasta obtener la dilución deseada para cada análisis particular, según se describe posteriormente.

En cada una de las muestras se determinaron recuentos aeróbicos a 25° C, recuentos de coliformes fecales según la técnica de número más probable (NMP) y recuentos de Staphylococcus aureus coagulasa positivo según los métodos recomendados por el International Committee of Microbiological Standards for Foods (ICMSF en Thatcher y Clark, 1968), con pocas modificaciones. Los métodos recomendados por ICMSF se describen en el Apéndice A.

4.3.1 Recuentos aeróbicos en placa a 25° C. Los recuentos aeróbicos en placa se realizaron de acuerdo al método N° 1 (Pour Plate Method) de Thatcher y Clark (1968), con una modificación en la temperatura de incubación de las cajas de Petri, usándose 25° C en lugar de 30° y 35° C. Para aislar bacterias mesofílicas y psicrotróficas se escogió una temperatura de incubación de 25° C, ya que los recuentos a

esa temperatura dan conteos más altos que a temperaturas usualmente sugeridas de 30° y 35° C (Shewan y Hobbs, 1967; Silverrio y Levin, 1967).

Los resultados obtenidos fueron computados como número de microorganismos aeróbicos por gramo, por centímetro cuadrado o por mililitro. Se usaron diferentes series de diluciones que variaron de muestra a muestra, de acuerdo a la apariencia original, a la experiencia con muestras anteriores y a los datos registrados por otros autores.

4.3.2 Recuentos de coliformes fecales. La presencia de coliformes fecales se determinó siguiendo el método N° 1 de la sección de Enumeración de Coliformes, y el método N° 1 de la sección de Determinación de Organismos Coliformes de Origen Fecal, de Thatcher y Clark (1968), sin modificaciones. Estas mismas técnicas han sido usadas por Melhman et al. (1974) con bastante éxito en la identificación de cepas patógenas de E. coli.

Se usaron diluciones hasta de 1:10 000. Los resultados fueron computados como número más probable (NMP) de coliformes fecales por gramo, por centímetro cuadrado o por mililitro.

4.3.3 Recuentos de Staphylococcus aureus coagulasa positivo. Para la determinación de S. aureus se usó el método

Nº 2 de la sección de Enumeración de S. aureus y el Examen para Producción de Coagulasa recomendados por Thatcher y Clark (1968). Ambos procedimientos se pueden encontrar en el Apéndice A. Se tomaron como positivos los tubos con producción de coágulos densos y grandes que no se desprendían al invertir los tubos. Se usaron diluciones hasta de 1:10 000.

La lista de medios de cultivo usados y su preparación se puede encontrar en el Apéndice B.

4.4 Análisis estadístico.

Para el análisis de recuentos aeróbicos y de coliformes fecales de las muestras de los mercados La Terminal y Colón se realizó la Prueba de Kruskal-Wallis para el análisis de una clasificación por rangos (Siegel, 1975), la cual se describe en el Apéndice C, con una explicación sobre su uso e interpretación.

La hipótesis nula es: "Las poblaciones de bacterias no varían significativamente en el transcurso de los seis días de muestreo". Los resultados del análisis se evaluaron para un nivel de significancia de 0.05.

Ningún tipo de análisis estadístico se pudo aplicar a los resultados de las muestras de pescado procesado ya que el número de muestras es muy limitado.

5. RESULTADOS.

5.1 Análisis de las muestras de pescado procesado.

Los resultados del análisis microbiológico de las muestras de pescado procesado se encuentran tabulados en el Cuadro 2. Los recuentos aeróbicos en placa a 25° C variaron entre 1.5×10^4 y 5.3×10^7 células por gramo de tejido; los más bajos corresponden a las muestras del supermercado Paiz Montúfar y los más altos a las de los supermercados La Torre y Norte. Los recuentos de coliformes fecales variaron entre 0 y 460 bacterias por gramo de tejido, siendo particularmente bajos en las muestras de pescado seco-salado del mercado La Placita y bastante elevados en las de los supermercados Residencial y Norte. Los recuentos de S. aureus variaron entre 0 y 1000 bacterias por gramo de tejido, correspondiendo los más bajos a las muestras del mercado La Placita y los más altos a las de los supermercados Paiz Montúfar y Residencial.

En la Figura 1 se muestran gráficamente los recuentos de los diferentes parámetros microbiológicos de los distintos puestos de venta, comparando cada parámetro con el respectivo estándar sugerido por APHA (1976).

La humedad relativa de los puestos de venta (Cuadro 3) no excedió 60% en ninguno de los casos.

Cuadro 2. Recuentos microbiológicos de las muestras de pescado procesado.

<u>Muestra</u>	<u>Recuentos aeróbicos en placa a 25° C (células/gramo)</u>	<u>Coliformes fecales (NMP_g/gramo)</u>	<u>Staphylococcus aureus coagulasa positivo (bacterias/gramo)</u>
<u>Supermercado Paiz Montúfar</u>			
Filete pescado	9.8 x 10 ⁵	23	0
Pescado entero	2.7 x 10 ⁵	23	0
Pescado entero	1.5 x 10 ⁴	0	0
Pescado entero	3.7 x 10 ⁶	7.3	1000
Hielo ^b	1.6 x 10 ⁵	0	10
<u>Supermercado La Torre</u>			
Filete pescado	5.3 x 10 ⁷	0	10
Filete pescado	1.4 x 10 ⁷	150	100
Filete pescado	1.4 x 10 ⁷	150	0
Filete pescado	6.6 x 10 ⁵	23	100
Filete pescado	3.5 x 10 ⁶	23	0
<u>Supermercado Norte</u>			
Filete pescado	3.4 x 10 ⁵	7.3	100
Filete pescado	5.3 x 10 ⁷	460	100
Pescado entero	1.3 x 10 ⁷	0	0
Congelador ^{cd}	0	0	0
Congelador ^{ce}	0	0	0

Cuadro 2. Continuación.

<u>Muestra</u>	Recuentos aeróbicos en placa a 25° C (<u>células/gramo</u>)	Coliformes fecales (<u>NMPa/gramo</u>)	<u>Staphylococcus aureus</u> coagulasa positivo (<u>bacterias/gramo</u>)
Supermercado Residencial			
Filete pescado	6.3 x 10 ⁶	7.3	100
Pescado entero	2.6 x 10 ⁴	0	100
Pescado entero	6.9 x 10 ⁶	460	1000
Congelador ^{cd}	8.0 x 10 ⁶	0	0
Congelador ^{ce}	1.3 x 10 ¹	0	0
Mercado La Placita			
Pescado seco-salado	2.3 x 10 ⁶	3.6	0
Pescado seco-salado	2.4 x 10 ⁶	0	0
Pescado seco-salado	1.2 x 10 ⁷	0	10
Mostrador ^c	5.0 x 10 ⁴	0	6.6
Balanza ^c	1.6 x 10 ²	0	0

a NMP = número más probable (ver métodos)

b recuentos por mililitro

c recuentos por centímetro cuadrado

d pared lateral

e pared trasera

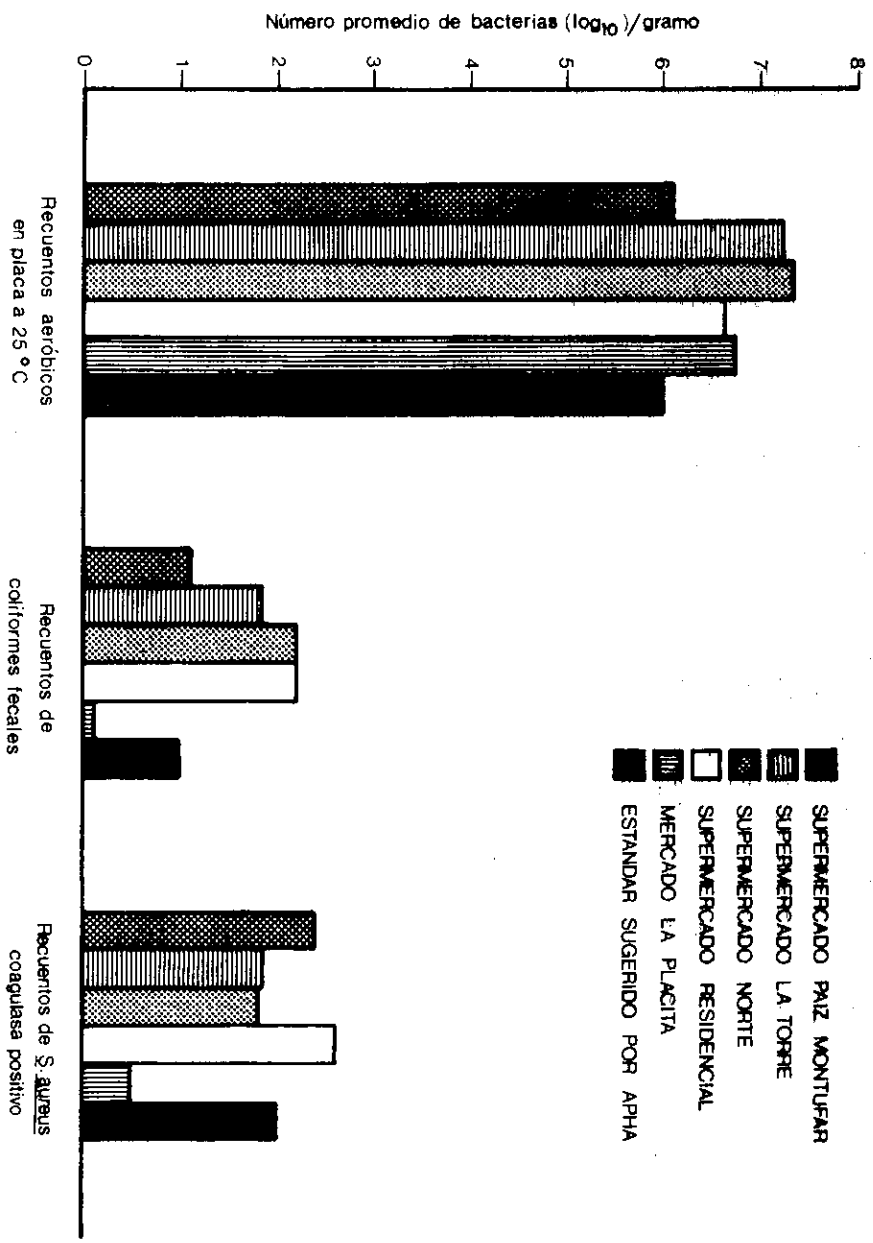


Figura 1. Diagrama comparativo entre los recuentos microbio-
lógicos de las muestras de pescado procesado de
los diferentes puestos de venta y los estándares
sugeridos por APHA.

Cuadro 3. Humedad relativa de los puestos de venta de pescado procesado.

<u>Lugar</u>	<u>Humedad relativa (%)</u>
Supermercado Paiz Montúfar	53
Supermercado La Torre	56
Supermercado Norte	54
Supermercado Residencial	53
Mercado La Placita	58

5.2 Análisis de las muestras de pescado fresco.

5.2.1 Mercado La Terminal. Los recuentos de microorganismos aeróbicos, de coliformes fecales y de S. aureus coagulasa positivo de las muestras del mercado La Terminal se observan en los Cuadros 4, 5 y 6, respectivamente.

Los recuentos aeróbicos de las muestras de pescado fueron siempre mayores de 10^6 células por centímetro cuadrado, alcanzando el último día niveles de 10^7 . Los recuentos aeróbicos de la cavidad del único pescado eviscerado siempre fueron mayores que los de la superficie de la piel.

En general, las poblaciones de microorganismos aeróbicos de todas las muestras no varían significativamente ($p < 0.05$) durante los días de muestreo. La Figura 2 representa las variaciones en los recuentos aeróbicos durante el muestreo.

Los recuentos aeróbicos más altos corresponden a las muestras de líquido residual y de hielo, siendo siempre mayores de 10^7 células por mililitro.

El Cuadro 4 muestra los recuentos aeróbicos de todas las muestras analizadas, recuentos que, con excepción del agua, son mayores de 10^6 células por centímetro cuadrado o por mililitro de muestra; en el 57.5% de las muestras los conteos fueron mayores de 10^7 .

Cuadro 4. Mercado La Terminal. Recuentos aeróbicos en placa a 25° C por centímetro cuadrado o por mililitro.

<u>Muestra</u>	<u>Día 1</u>	<u>Día 2</u>	<u>Día 3</u>	<u>Día 4</u>	<u>Día 5</u>	<u>Día 6</u>
<u>Piel*</u>						
Pescado A	2.4 x 10 ⁶	5.2 x 10 ⁶	1.1 x 10 ⁷	1.2 x 10 ⁷		
Pescado B	1.6 x 10 ⁶	5.6 x 10 ⁶	3.5 x 10 ⁶	1.9 x 10 ⁷		
Pescado C	1.2 x 10 ⁶	6.6 x 10 ⁶	1.3 x 10 ⁷	1.6 x 10 ⁷		
<u>Cavidad*</u>						
Pescado A	2.5 x 10 ⁷	8.6 x 10 ⁶	1.5 x 10 ⁷	2.0 x 10 ⁷		
Piso*	2.2 x 10 ⁷	1.1 x 10 ⁶	2.4 x 10 ⁶	5.6 x 10 ⁶	1.1 x 10 ⁶	1.4 x 10 ⁶
Mostrador*	2.4 x 10 ⁷	2.4 x 10 ⁶	5.5 x 10 ⁶	1.4 x 10 ⁷	8.0 x 10 ⁶	1.0 x 10 ⁶
Agua**	2.0 x 10 ¹	4.0 x 10 ¹	2.5 x 10 ¹	5.0 x 10 ⁰	0	0
Hielo**	4.1 x 10 ⁷	3.1 x 10 ⁷	3.3 x 10 ⁷	1.0 x 10 ⁸	1.3 x 10 ⁷	8.4 x 10 ⁷
Líquido residual**	2.0 x 10 ⁷	4.0 x 10 ⁸	4.3 x 10 ⁸	3.9 x 10 ⁸	1.6 x 10 ⁹	2.0 x 10 ⁹

* superficie

** por mililitro

Cuadro 5. Mercado La Terminal. Recuento de coliformes fecales por centímetro cuadrado o por mililitro.

<u>Muestra</u>	<u>Día 1</u>	<u>Día 2</u>	<u>Día 3</u>	<u>Día 4</u>	<u>Día 5</u>	<u>Día 6</u>
Piel*						
Pescado A	31	160	31	62		
Pescado B	73	31	14	160		
Pescado C	160	160	73	62		
Cavidad*						
Pescado A	31	31	6.2	15.3		
Piso*	160	31	31	160	6	4.6
Mostrador*	160	8	160	733	2.6	15.3
Agua**	0	0	0	0	0	0
Hielo**	2400	240	1100	930	230	2400
Líquido residual**	2400	2100	11000	1500	24000	24000

* superficie

** por mililitro

Cuadro 6. Mercado La Terminal. Recuentos de Staphylococcus aureus coagulasa positivo por centímetro cuadrado o por mililitro.

<u>Muestra</u>	<u>Día 1</u>	<u>Día 2</u>	<u>Día 3</u>	<u>Día 4</u>	<u>Día 5</u>	<u>Día 6</u>
Piel*						
Pescado A	0	0	0.6	0		
Pescado B	0	0	0	0		
Pescado C	0	0	66	0		
Cavidad*						
Pescado A	0	0	0	10		
Piso*	0	0	0	0	0	10
Mostrador*	0	0	0.6	0	0	1000
Agua**	0	0	0	0	0	0
Hielo**	0	0	10	10	10	100
Líquido residual**	0	0	100	10000	0	100

* superficie

** por mililitro

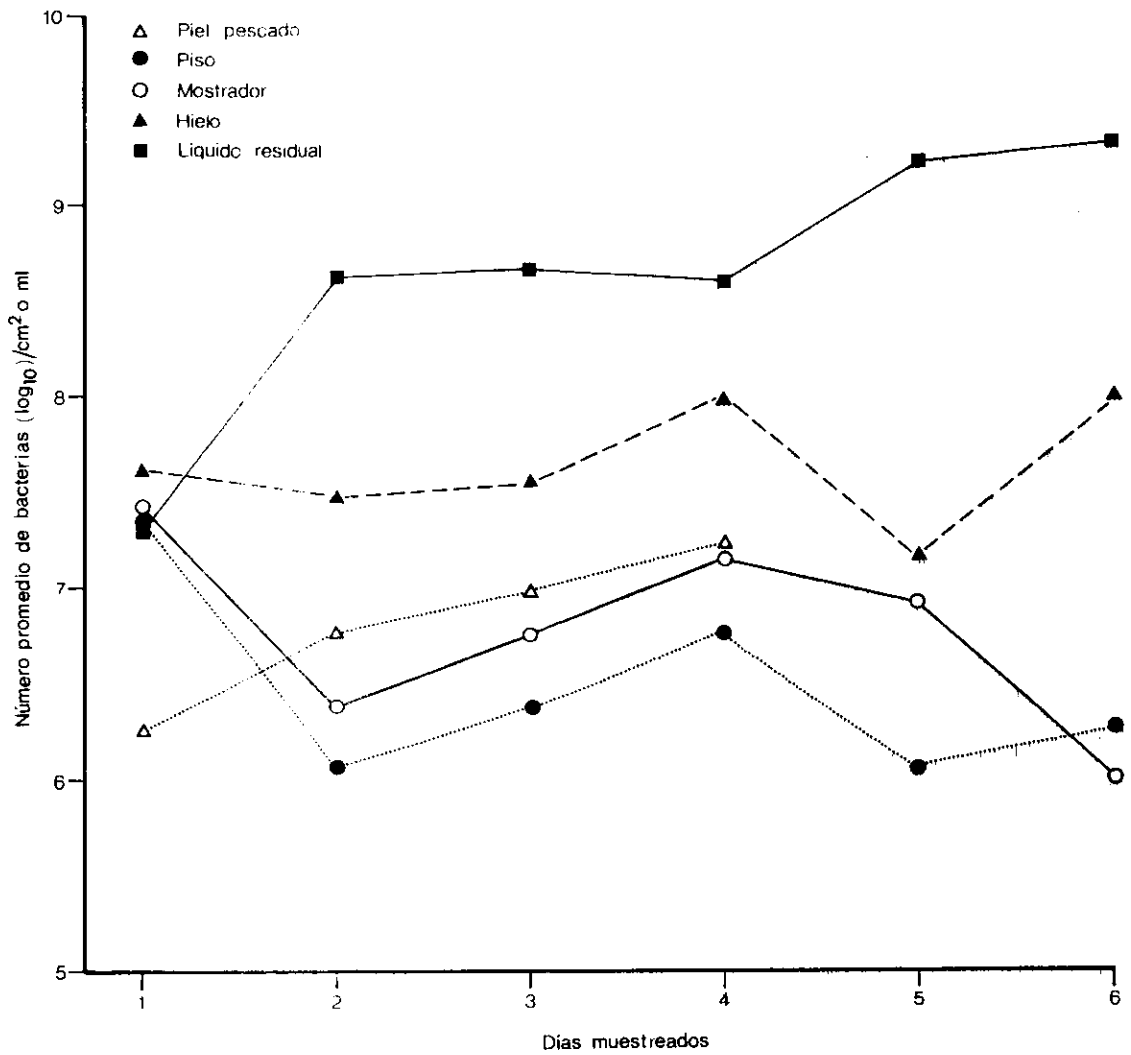


Figura 2. Mercado La Terminal. Variaciones en los recuentos aeróbicos en placa a 25° C.

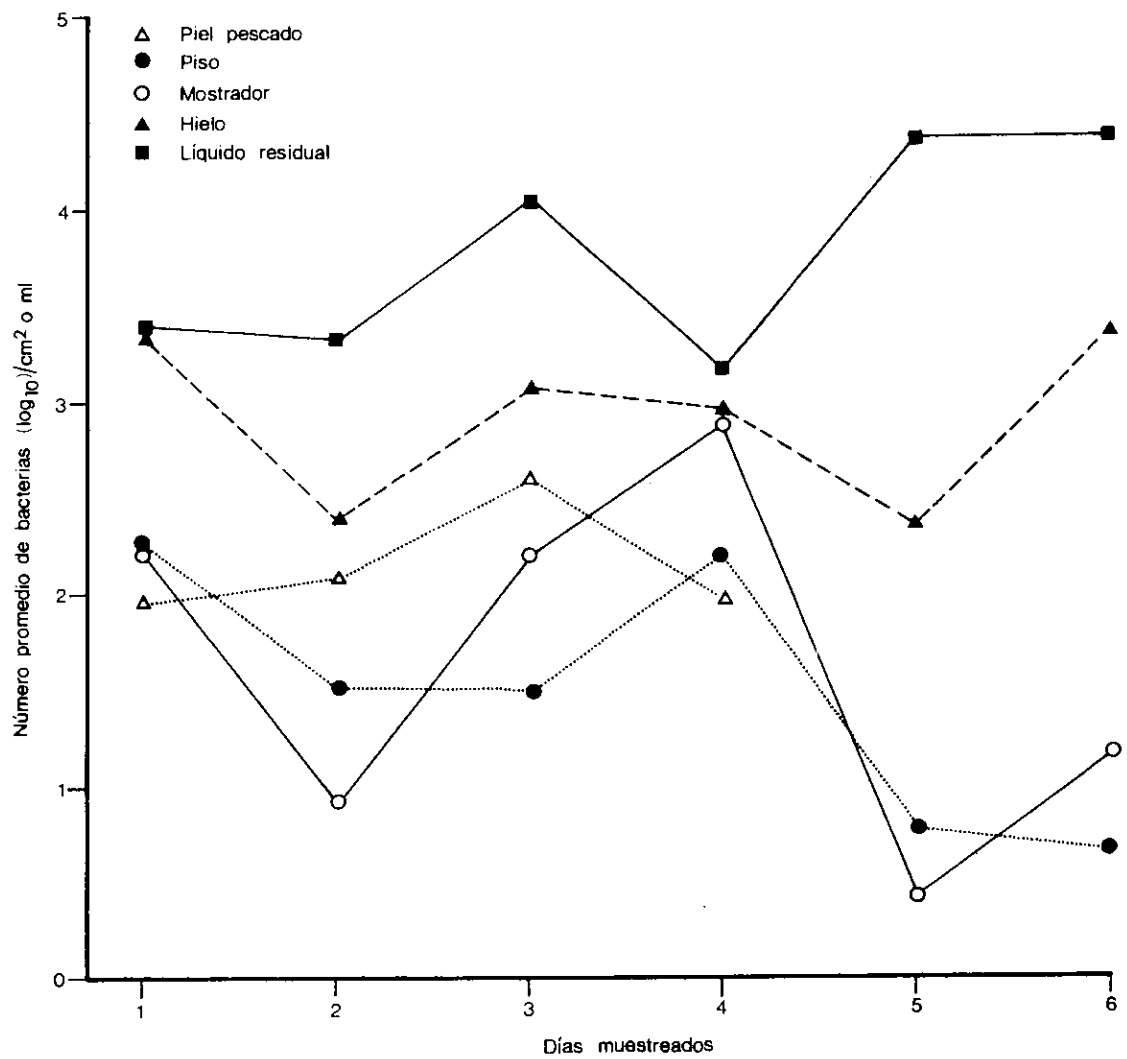


Figura 3. Mercado La Terminal. Variaciones en los recuentos de coliformes fecales.

La Figura 3 ilustra las variaciones en los recuentos de coliformes fecales durante los días de muestreo, los cuales varían significativamente ($p > 0.05$). Los recuentos más altos se obtuvieron de las muestras de líquido residual, que siempre excedieron 1500 bacterias por mililitro, y de las de hielo, que variaron entre 230 y 2400. Los recuentos de la superficie de la piel del pescado variaron entre 6 y 160 bacterias por centímetro cuadrado; los de la cavidad eviscerada no fueron tan altos como los de la superficie de la piel.

Los recuentos de S. aureus coagulasa positivo fueron negativos durante los primeros dos días de muestreo; en los días subsiguientes su aumento no fue significativo en todas las muestras. Los recuentos más altos fueron los del líquido residual y los del hielo, llegando hasta 10^4 bacterias por mililitro.

5.2.2 Mercado Colón. Los resultados obtenidos en el análisis de las muestras de pescado fresco en el mercado Colón se dan en los Cuadros 7, 8 y 9.

Los recuentos aeróbicos de todas las muestras de pescado tomadas el primer día fueron menores de 10^6 bacterias por centímetro cuadrado. Los recuentos de la superficie de la piel fueron mayores que los de la cavidad eviscerada. El segundo día se observó un incremento en los recuentos ae-

Cuadro 7. Mercado Colón. Recuentos aeróbicos en placa a 25° C por centímetro cuadrado o por mililitro.

<u>Muestra</u>	<u>Dfa 1</u>	<u>Dfa 2</u>	<u>Dfa 3</u>	<u>Dfa 4</u>	<u>Dfa 5</u>	<u>Dfa 6</u>
<u>Piel*</u>						
Pescado A	3.8 x 10 ⁴	7.3 x 10 ⁵	6.4 x 10 ⁵			
Pescado B	4.5 x 10 ⁵	2.6 x 10 ⁶	1.0 x 10 ⁶			
Pescado C	1.9 x 10 ⁵	1.3 x 10 ⁶	8.6 x 10 ⁵			
<u>Cavidad*</u>						
Pescado A	1.6 x 10 ⁴	1.0 x 10 ⁶	1.9 x 10 ⁶			
Pescado B	4.6 x 10 ⁴	8.0 x 10 ⁵	7.3 x 10 ⁵			
Pescado C	8.6 x 10 ⁴	8.0 x 10 ⁵	1.8 x 10 ⁶			
<u>Piso*</u>	1.8 x 10 ⁶	2.4 x 10 ⁶	1.5 x 10 ⁶	3.2 x 10 ⁶	3.8 x 10 ⁶	3.5 x 10 ⁶
<u>Mostrador**</u>	1.4 x 10 ⁶	1.6 x 10 ⁶	2.8 x 10 ⁶	1.9 x 10 ⁶	3.9 x 10 ⁶	6.6 x 10 ⁵
<u>Agua**</u>	1.0 x 10 ³	8.0 x 10 ⁴	3.0 x 10 ¹	7.0 x 10 ¹	7.0 x 10 ⁵	1.9 x 10 ⁴
<u>Hielo**</u>	2.7 x 10 ⁶	3.4 x 10 ⁶	1.3 x 10 ⁷	4.7 x 10 ⁶	4.3 x 10 ⁶	1.9 x 10 ⁷
<u>Ífquido residual**</u>	3.6 x 10 ⁷	1.1 x 10 ⁸	7.0 x 10 ⁷	9.3 x 10 ⁷	2.5 x 10 ⁸	5.0 x 10 ⁷

* superficie

** por mililitro

Cuadro 8. Mercado Colón. Recuentos de coliformes fecales por centímetro cuadrado o por mililitro.

<u>Muestra</u>	<u>Día 1</u>	<u>Día 2</u>	<u>Día 3</u>	<u>Día 4</u>	<u>Día 5</u>	<u>Día 6</u>
Piel*						
Pescado A	3	15	0			
Pescado B	1.5	30	0			
Pescado C	1	15	150			
Cavidad*						
Pescado A	10	160	60			
Pescado B	3	0	0			
Pescado C	0.73	4.8	150			
Piso*	73	310	60	60	2.4	24
Mostrador*	31	73	0	24	6	0
Agua**	0	930	0	0	390	0
Hielo**	1100	150	360	0	430	730
Líquido residual**	2400	2400	4300	9300	24000	4300

* superficie

** por mililitro

Cuadro 9. Mercado Colón. Recuentos de Staphylococcus aureus coagulasa positivo por centímetro cuadrado o por mililitro.

<u>Muestra</u>	<u>Día 1</u>	<u>Día 2</u>	<u>Día 3</u>	<u>Día 4</u>	<u>Día 5</u>	<u>Día 6</u>
Piel*						
Pescado A	0	70	7			
Pescado B	0	0	0			
Pescado C	0	0	0			
Cavidad*						
Pescado A	0	0	0			
Pescado B	0	1	0			
Pescado C	0	1	0			
Piso*	0	70	0	0	70	700
Mostrador*	0	1	700	7	0	70
Agua**	0	0	0	0	0	0
Hielo**	0	1000	100	100	0	100
Líquido residual**	0	100	0	1000	10000	1000

* superficie

** por mililitro

róbicos de la piel y cavidad, algunos de los cuales excedieron 10^6 bacterias por centímetro cuadrado. El tercer día se observó una pequeña disminución en los recuentos de algunas de las muestras de pescado.

La mayoría de los recuentos aeróbicos del piso, del hielo, de la superficie de la mesa de corte y del líquido residual excedieron 10^6 microorganismos por centímetro cuadrado o por mililitro. Los recuentos más altos obtenidos, los del líquido residual, a veces excedieron 10^8 microorganismos por mililitro y nunca fueron menores de 10^7 .

La Figura 4 representa gráficamente las variaciones, no significativas ($p < 0.05$), en los recuentos de microorganismos aeróbicos durante los días de muestreo.

La Figura 5 muestra las variaciones en los recuentos de bacterias coliformes fecales durante los días de muestreo, las cuales son significativas ($p > 0.05$).

Al igual que los recuentos aeróbicos, los recuentos de E. coli más altos corresponden a las muestras de líquido residual, variando entre 2400 y 24 000 bacterias por mililitro. Los recuentos de E. coli de todas las muestras de pescado fueron menores de 10 bacterias por centímetro cuadrado durante el primer día de muestreo, pero durante los días subsiguientes se registraron hasta 160.

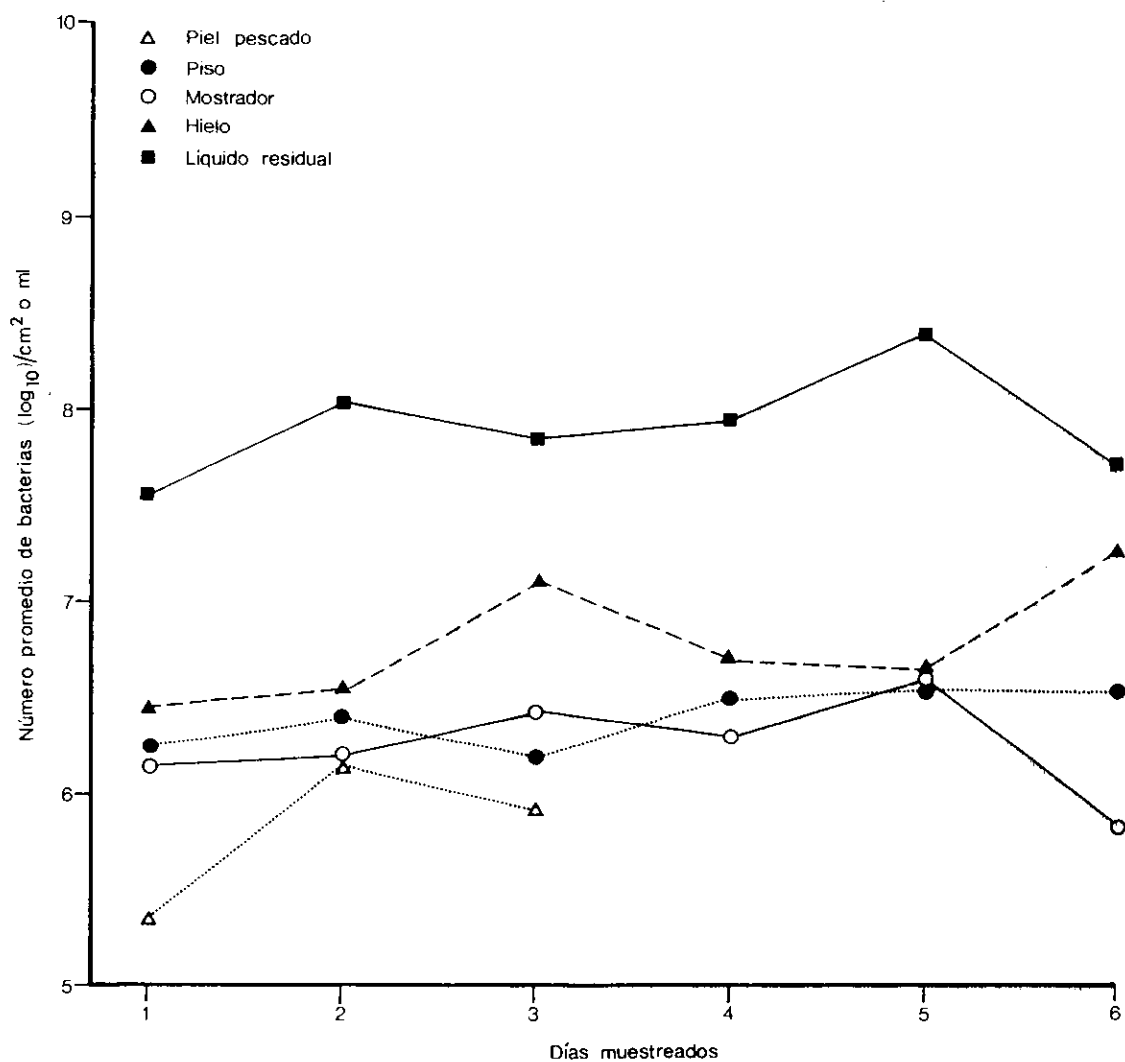


Figura 4. Mercado Colón. Variaciones en los recuentos aeróbicos en placa a 25° C.

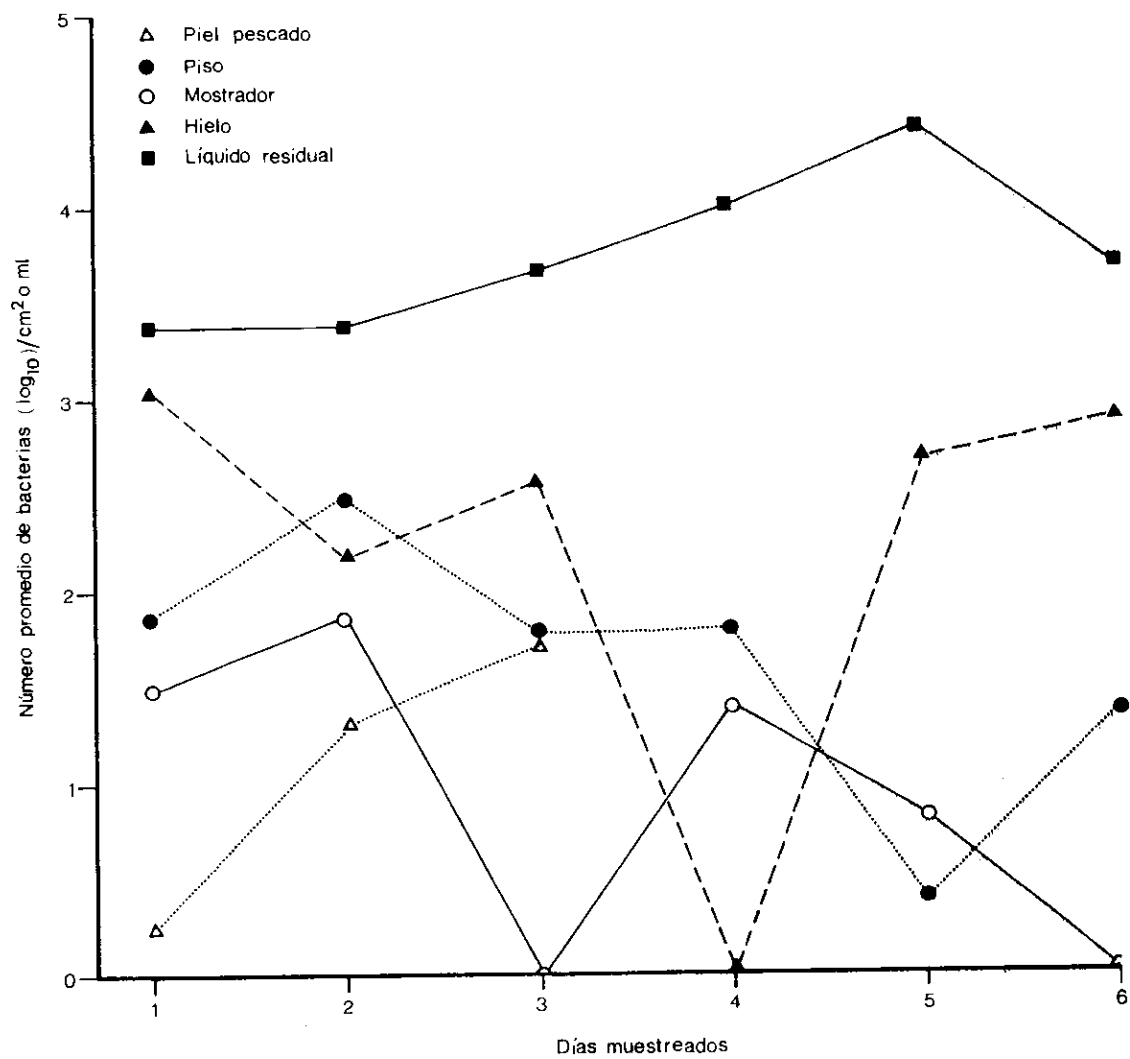


Figura 5. Mercado Colón. Variaciones en los recuentos de coliformes fecales.

Los recuentos de S. aureus del primer día de muestreo fueron nulos. Sin embargo, los de algunas muestras del segundo día fueron altos; en el pescado se contaron hasta 70 bacterias por centímetro cuadrado, y en el hielo y el líquido residual los recuentos alcanzaron 100 ó más bacterias por mililitro.

6. DISCUSION.

La comparación de los resultados con índices de calidad preestablecidos en otros países, generalmente países desarrollados de regiones templadas, es de dudosa validez debido a las diferencias climatológicas que repercuten en las poblaciones de microorganismos. Además, existen diferencias culturales y tecnológicas que, aunque sólo son circunstanciales, deben ser consideradas. Por otro lado, algunos países tropicales en vías de desarrollo han empezado a investigar la posibilidad de establecer índices microbiológicos de acuerdo a resultados que se han obtenido para sus productos. De cualquier manera, una comparación global con algunos de los límites sugeridos permite hacer algunas observaciones de interés.

Paradójicamente, el único criterio microbiológico para pescados de zonas tropicales que se encontró en la literatura revisada, de 10^7 microorganismos aeróbicos por gramo propuesto por Watanabe y Ulstrup (1973) para mercados de Zambia, fue considerado muy elevado dado que el número de bacterias en pescados tropicales almacenados en hielo es menor que el de pescados de zonas templadas bajo las mismas condiciones (Amu y Disney, 1973) y para los cuales los estándares sugeridos son menores de 10^6 .

6.1 Pescado procesado.

En el Cuadro 2 se puede observar que en 16 (88.9%) de las muestras de pescado procesado los recuentos aeróbicos exceden 2.5×10^5 microorganismos por gramo de tejido, que es el límite sugerido para recuentos aeróbicos por el Canadian Fish Inspectorate (Shewan, 1970; Watanabe y Ulstrup, 1973). El límite de 10^6 microorganismos por gramo de tejido propuesto por la American Public Health Association (APHA, 1966) es excedido por 12 (66.7%) de las muestras. 6 (33.3%) de las muestras excedieron el límite de 10^7 propuesto por Watanabe y Ulstrup (1973).

Recuentos de E. coli mayores de 10 bacterias por gramo o por centímetro cuadrado en pescado congelado y de 40 en pescado seco-salado son el resultado de mal manejo (APHA, 1976). 12 (66.7%) de las muestras tenían E. coli, 8 (44.4%) excedían 10 bacterias por gramo y 4 (22.2%) excedían 100 bacterias pro gramo. Ninguna de las muestras de pescado seco-salado tuvo recuentos de E. coli que excedieran el límite recomendado por APHA (1976), aunque los recuentos aeróbicos sí lo hicieron.

De los 12 pescados con recuentos aeróbicos mayores de 10^6 microorganismos por gramo, 8 (66.7%) tenían E. coli; de éstos 5 (62.5%) excedieron 10 bacterias por gramo y 4 (50%) excedieron 100 bacterias por gramo. De manera análoga, de los 16 pescados con recuentos aeróbicos mayores de

2.5×10^5 microorganismos por gramo, 12 (75%) tenían E. coli, de los cuales 8 (66.7%) tenían más de 10 bacterias por gramo y 4 (33.3%) más de 100.

Se encontró S. aureus en 10 (55.6%) de las muestras.

8 (44.4%) de los pescados muestreados tenían 100 ó más bacterias por gramo, esto es, de las muestras con S. aureus, 80% los tenían en cantidades que excedieron el límite propuesto por APHA (1976). De los 16 pescados con recuentos aeróbicos mayores de 2.5×10^5 microorganismos por gramo, 8 (50%) tenían 100 ó más bacterias S. aureus por gramo. De los 12 pescados con recuentos aeróbicos mayores de 10^6 , sólo 5 (41.7%) tenían S. aureus en cantidades de 100 ó más bacterias por gramo.

Se puede observar que no existe relación entre estos dos parámetros microbiológicos según los límites propuestos por APHA, pues 3 de las muestras que excedieron 100 bacterias S. aureus por gramo no excedieron 10^6 microorganismos aeróbicos por gramo, y 7 de las muestras con recuentos aeróbicos mayores de 10^6 no tenían recuentos altos de S. aureus. De igual manera, no existe relación entre el estándar sugerido para E. coli y el sugerido para S. aureus, puesto que de los 8 pescados con recuentos de E. coli mayores de 10 bacterias por gramo, sólo 4 (50%) tenían recuentos de S. aureus de 100 ó más bacterias por gramo. También se observan recuentos altos de S. aureus cuando los recuentos de E.

coli son bajos.

Si se adoptaran los límites propuestos por APHA, 66.7% de las muestras se clasificarían no apropiadas para consumo por poseer recuentos aeróbicos mayores de 10^6 bacterias por gramo, 44.4% de las muestras por tener recuentos de coliformes fecales mayores de 10 bacterias por gramo, y 44.4% de las muestras por tener recuentos de S. aureus de 100 ó más bacterias por gramo. Pero, como se puede observar en la Figura 1, los pescados que se pueden clasificar apropiados para consumo de acuerdo a un estándar, no lo son de acuerdo a otro, es decir, no existe ninguna correlación entre los estándares. Tomando en cuenta todos los pescados no apropiados para consumo de acuerdo a uno u otro estándar, 17 (94.4%) de las muestras son de baja calidad, presentando un alto riesgo de consumo.

La humedad relativa de los congeladores en los supermercados (Cuadro 3) es adecuada de acuerdo a los rangos propuestos por Balakrishnan Nair et al. (1974) para pescados tropicales.

6.2 Pescado fresco.

6.2.1 Mercado La Terminal. Aunque el mercado La Terminal cuenta con mejores instalaciones que el mercado Colón, los recuentos fueron más altos.

Todas las muestras de pescado tuvieron recuentos aeróbicos mayores de 10^6 desde el primer día de muestreo, es decir, ninguno de los pescados muestreados era apropiado para consumo de acuerdo al estándar propuesto por APHA.

Los recuentos aeróbicos del hielo y del líquido residual siempre excedieron el promedio de los recuentos del pescado. En la Figura 2 se representa el crecimiento casi paralelo de las poblaciones de microorganismos aeróbicos en el pescado y el líquido residual. Estos hechos hacen suponer que el líquido residual es una importante fuente de contaminación del pescado y que, probablemente, el uso de hielo de mejor calidad y el uso del drenaje daría lugar a recuentos más bajos.

Los recuentos del líquido residual superan a los del hielo debido a la diferencia de temperatura y a las sustancias nutritivas del pescado que son acarreadas por el hielo derretido, haciendo del líquido residual un caldo nutritivo que permite mayor crecimiento de bacterias.

La superficie de la mesa de corte también tiene recuentos altos, probablemente debido a que se mantiene a temperatura ambiente y a la presencia de restos de pescado que quedan en la mesa después del corte, propiciando el crecimiento de microorganismos.

En 76.1% de las muestras, los recuentos de coliformes fecal-

les excedieron 10 bacterias por centímetro cuadrado o por mililitro (Cuadro 5). Todas las muestras de pescado excedieron este límite.

Los recuentos más altos de E. coli se observaron en el hielo y en el líquido residual.

En todas las muestras los recuentos de S. aureus fueron negativos durante los primeros dos días de muestreo (Cuadro 6), confirmando que no existe correlación entre los parámetros escogidos para el análisis. En ninguna de las muestras de pescado el recuento de S. aureus excedió el límite propuesto por APHA de 100 bacterias por centímetro cuadrado.

Los recuentos de bacterias aeróbicas, de E. coli y de S. aureus fueron casi siempre negativos en las muestras de agua; sin embargo, estos resultados son poco significativos debido a que el vendedor no hace uso del agua para la limpieza de los utensilios, los mostradores y el pescado.

6.2.2 Mercado Colón. Ninguna de las muestras de pescado del mercado Colón tuvo recuentos de microorganismos aeróbicos que excedieran 10^7 ; sin embargo, de acuerdo a los estándares propuestos por APHA, ninguno de los pescados muestreados era apropiado para consumo después del segundo día de muestreo, ya que los recuentos de la superficie de la piel o de la superficie de la cavidad eviscerada excedieron 10^6 microorganismos por centímetro cuadrado.

Los recuentos de E. coli en el pescado (Cuadro 8) fueron muy variables durante los tres días de muestreo, y son difíciles de analizar; de cualquier manera, se puede observar que ninguno de los pescados permaneció apto para el consumo durante los tres días respecto al límite propuesto por APHA para E. coli, ya sea por recuentos altos en la superficie de la piel o en la cavidad eviscerada. Sin embargo, según el límite sugerido por APHA para recuentos de S. aureus, todos los pescados serían considerados aptos para consumo durante los tres días. Estos resultados demuestran no sólo la falta de relación de estos parámetros, sino la necesidad de realizar el mayor número posible de exámenes microbiológicos para cerciorarse de la calidad del producto.

Considerando globalmente los resultados obtenidos en todas las muestras de este mercado respecto a los tres parámetros, se puede clasificar como contaminantes del pescado a la mesa de corte, al hielo y principalmente al líquido residual, debido a los altos recuentos observados.

Los promedios de los recuentos aeróbicos, de E. coli y de S. aureus de las muestras de agua del mercado Colón fueron siempre más altos que los del mercado La Terminal; en este último el agua fue muestreada de la fuente y en cambio en el mercado Colón el agua fue muestreada directamente de la palangana que el vendedor usaba para lavar el pescado y los instrumentos.

7. CONCLUSIONES.

1. Es difícil evaluar los resultados ya que no existen estándares de calidad microbiológica para el pescado en Guatemala. Se necesita más información respecto a la flora bacteriana normal de peces del área, respecto a los cambios que suceden durante la descomposición del pescado y respecto a la flora patógena adquirida y su relación con los parámetros considerados para poder evaluar los resultados de este trabajo de manera más satisfactoria.
2. De acuerdo con Amu y Disney (1973), quienes consideran que los recuentos microbiológicos en peces tropicales deben ser relativamente bajos, los recuentos encontrados son demasiado elevados.
3. Si se adoptaran los límites propuestos por APHA (1976), 94.4% de las muestras de pescado procesado, 100% de las muestras de pescado fresco del mercado La Terminal y 66.7% de las muestras de pescado fresco del mercado Colón serían no aptas para consumo por exceder al menos uno de los límites de los tres parámetros analizados.
4. Los recuentos notablemente bajos de E. coli y S. aureus del pescado seco-salado comprueban la efectividad del secado y salación como proceso de preservación.

5. La humedad relativa de los supermercados no excede 58%, por lo que no afecta la calidad microbiológica del pescado.
6. El líquido residual es una importante fuente de contaminación del pescado, pues sus recuentos siempre fueron mayores y paralelos a los del pescado.
7. El uso de hielo de mejor calidad y el uso correcto de los drenajes disponibles reducirían la contaminación del pescado fresco.
8. No se encontró correlación entre los parámetros usados para determinar los contenidos de bacterias.

8. RECOMENDACIONES.

Este estudio preliminar ofrece un panorama general del cual se puede inferir la necesidad de crear un centro de control de calidad para productos pesqueros y la necesidad de investigar y divulgar la aplicación de otras técnicas de preservación, con el propósito de mejorar la calidad e incrementar el consumo.

Para llegar a una etapa de conocimientos prácticos que permitan el buen funcionamiento de un centro de control de calidad, es necesario realizar investigaciones que indiquen cuál es el mejor método de determinar la calidad de los diferentes productos pesqueros. Las medidas de control deberán adaptarse a las condiciones socioeconómicas existentes, deberán ser fáciles de aplicar y no deberán requerir mucho equipo técnico ni personal especializado. El uso de exámenes organolépticos cumple con los requerimientos mencionados, por lo que sería acertado iniciar investigaciones a este respecto.

Cualquier programa sanitario deberá dar a conocer a pescadores, transportistas, vendedores y consumidores cuáles son las prácticas sanitarias adecuadas y cómo reconocer la calidad del pescado.

La aplicación de índices de calidad y de técnicas de preservación usados en las zonas templadas deberá ser evaluada

para determinar la posibilidad de utilizarlos en Guatemala. También es necesario hacer investigaciones sobre la flora bacteriana normal de peces tropicales y sobre los cambios que ocurren durante la descomposición a diferentes temperaturas para poder determinar qué límites son adecuados.

Para la evaluación de los recuentos encontrados y la futura aplicación de criterios microbiológicos es necesario determinar la relación entre los parámetros estudiados y las bacterias patógenas, como Salmonella, Clostridium y Vibrio.

El proceso de evisceración, tradicionalmente considerado una buena práctica sanitaria, deberá ser evitado o al menos realizado de manera muy cuidadosa para impedir la contaminación del músculo por la flora intestinal.

La falta de relación entre parámetros microbiológicos en este estudio deberá ser corroborada; de cualquier manera, se sugiere realizar el mayor número posible de pruebas microbiológicas para cerciorarse de la calidad del pescado.

Otros estudios con un número mayor de muestras serían provechosos para aceptar o rechazar estadísticamente los resultados encontrados en este trabajo.

BIBLIOGRAFIA.

- Amu, L. y J.G. Disney. 1973. Quality changes in West African marine fish during iced storage. Tropical Science. 15(2):125-138.
- American Public Health Association (APHA). 1976. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. M.L. Spech.(ed.). American Public Health Association, Inc., Washington, D.C.
- Baer, E.F., A.P. Duran, H.B. Leininger, R.B. Read, A.H. Schwab y A. Swartzentruber. 1976. Microbiological quality of frozen breaded fish and shellfish products. Applied and Environmental Microbiology. 31(3):337-341.
- Balakrishnan Nair, R., P.K. Tharamani y N.L. Lahiry. 1974. Studies on chilled storage of fresh water fish. II. Factors affecting quality. Journal of Food Science and Technology. 11(3):118-122.
- Corlett, D.A. 1974. Setting microbiological limits in the food industry. Food Technology. 28(10):34-40.
- Chai, T., C. Chen, A. Rosen y R.E. Levin. 1968. Detection and incidence of specific species of spoilage bacteria on fish. II. Relative incidence of Pseudomonas putrefaciens and fluorescent pseudomonads on haddock fillets. Applied Microbiology. 16(11):1738-1741.
- de León, L.R. 1976. Bacteriological flora of fish from warm sea water. MSc. Thesis. University of Wisconsin, Madison.
- Difco. 1969. Difco manual. 9ª edición. Difco Laboratories, Inc., Detroit.

- Disney, J.G. 1974. The spoilage of fish in the tropics. Tropical Products Institute, London.
- Duitschaever, C.L., D.R. Arnott y D.H. Bullock. 1973. Bacteriological quality of raw refrigerated ground beef. Journal of Milk and Food Technology. 36(7):375-377.
- Emswiler, B.S., C.J. Pierson y A.W. Kotula. 1976. Bacteriological quality and shelf life of ground beef. Applied and Environmental Microbiology. 31(6):826-830.
- Ercolani, G.L. 1976. Bacteriological quality assessment of fresh marketed lettuce and fennel. Applied and Environmental Microbiology. 31(6):847-852.
- Farber, L. y P. Lerke. 1961. Studies on the evaluation of freshness and on the estimation of the storage life of raw fishery products. Food Technology. 15(4):191-196.
- Garm, R. y L. Limpus. 1976. "Organization of fish inspection programmes in developing countries". En Proceedings of the conference on the handling, processing and marketing of tropical fish. Tropical Products Institute, London.
- Green, J.H. y J.D. Kaylor. 1977. Variations in the microbial log reduction curves of irradiated cod fillets, shrimp, and their respective homogenates. Applied and Environmental Microbiology. 33(2):323-327.
- Herbert, R.A.; M.S. Mendrie, D.M. Gibson y J.M. Shewan. 1971. Bacteria active in the spoilage of certain sea foods. Journal of Applied Bacteriology. 34(1):41-50.
- Ingram, M. 1961. Microbiological standards for foods. Food Technology. 15(2):4-12.

- Insalata, N.F. e I. Raab. 1970. The industrial significance of low temperature microbiological preservation of foods. Journal of Milk and Food Technology. 33(12): 554-561.
- Institute of Food Technology (IFT). 1974. Shelf life of foods. Food Technology. 28(8):45-48.
- Jones, D.T. 1976. "Fish inspection and quality control in the United Kingdom". En Proceedings of the conference on the handling, processing and marketing of tropical fish. Tropical Products Institute, London.
- Kempa, W. 1973. Food standards and controls in Canada. Journal of Milk and Food Technology. 36(7):392-395.
- Kreuger, R.G., N.W. Gillham y J.H. Coggin, Jr. 1973. Introduction to microbiology. Macmillan Co., New York.
- Lerke, P., R. Adams y L. Farber. 1965. Bacteriology of spoilage of fish muscle. III. Characterization of spoilers. Applied Microbiology. 13(4):625-630.
- Liston, J. 1960. The bacterial flora of fish caught in the Pacific. Journal of Applied Bacteriology. 23(3): 469-470.
- Melhman, I.J., N.T. Simon, A.C. Sanders y J.C. Olson, Jr. 1974. Problems in the recovery and identification of enteropathogenic Escherichia coli from foods. Journal of Milk Technology. 37(6):350-356.
- Miskimin, D.K., K.A. Berkowitz, M. Solberg, W.E. Riha, W.C. Franke, R.L. Buchanan y V. O'Leary. 1976. Relationships between indicator organisms and specific pathogens in potentially hazardous foods. Journal of Food Science. 41(1976):1001-1006.

- Morita, R.Y. 1975. Psychrophilic bacteria. Bacteriological Reviews. 39(2):144-167.
- Nickerson, J.T.R. y S.A. Goldblith. 1962. A study of the microbiological quality of haddock fillets and shucked, soft-shelled clams processed and marketed in the greater Boston area. Journal of Milk and Food Technology. 25(1):7-12.
- Raj, H. y J. Liston. 1961. Survival of bacteria of public health significance in frozen sea foods. Food Technology. 15(10):429-434.
- Read, R.B., Jr. y E.F. Baer. 1974. Rôle of the regulatory in setting microbiological quality standards. Food Technology. 28(10):42-46.
- Sawant, P.L. y N.G. Magar. 1961. Studies on frozen fish. II. Some chemical changes occurring during frozen storage. Food Technology. 15(8):347-350.
- Shewan, J.M. 1961. "The microbiology of sea-water fish". En G. Borgstrom (ed.). Fish as food. Vol. 1. Academic Press, Inc., New York.
- Shewan, J.M. 1970. Bacteriological standards for fish and fishery products. Chemistry and Industry. 2(1970):193-199.
- Shewan, J.M. 1971. The microbiology of fish and fishery products, a progress report. Journal of Applied Bacteriology. 34(2):299-497.
- Shewan, J.M. 1976a. "The bacteriology of fresh and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action". En Proceedings of the conference on the handling, processing and marketing of tropical fish. Tropical Products Institute, London.

- Shewan, J.M. 1976b. Microbial standards for foods. Food Technology. 30(12):493-495.
- Shewan, J.M. y G. Hobbs. 1967. The bacteriology of fish spoilage and preservation. Progress in Industrial Microbiology. 6:169-204.
- Shewan, J.M. y N.R. Jones. 1957. Chemical changes occurring in cod muscle during chill storage and their possible use as objective indices of quality. Journal of Science and Food Agriculture. 8:491-498.
- Siegel, S. 1975. Estadística no paramétrica aplicada a la ciencia de la conducta. Trillas, México.
- Silverman, G.J., J.T.R. Nickerson, D.W. Duncan, N.S. Davis, J.S. Schachter y M.M. Joselow. 1961. Microbiological analysis of frozen raw and cooked shrimp. I. General results. Food Technology. 15(11):455-458.
- Silverrio, R. y R.E. Levin. 1967. Evaluation of methods for determining the bacterial population of fresh fillets. Journal of Milk and Food Technology. 30(4):242-246.
- Surkiewicz, B.F., M.E. Harris, R.P. Elliott, J.F. Macaluso y M.M. Strand. 1975. Bacteriological survey of raw beef patties produced at establishments under federal inspection. Applied Microbiology. 29(3):331-334.
- Surkiewicz, B.F., M.E. Harris y R.W. Johnston. 1973. Bacteriological survey of frozen meat and gravy produced at establishments under federal inspection. Applied Microbiology. 26(4):574-576.
- Thatcher, F.S. y D.S. Clark. 1968. Microorganisms in food. International Committee on Microbiological Specifications for Foods. University of Toronto Press, Toronto.

- Tretsven, W.I. 1963a. Bacteriological survey of filleting processes in the Pacific Northwest. I. Comparison of methods of sampling fish for bacterial counts. Journal of Milk and Food Technology. 26(6):302-306.
- Tretsven, W.I. 1963b. Bacteriological survey of filleting processes in the Pacific Northwest. II. Swab technique for bacteriological sampling. Journal of Milk and Food Technology. 26(7):383-389.
- Watanabe, K. y G. Ulstrup. 1973. Bacterial counts and quality of iced fish retailed at a Lusaka market, Zambia. Journal of Applied Bacteriology. 36(3):513-522.
- Yeterian, M., L. Chugg, W. Smith y C. Coles. 1974. Are microbiological quality standards workable? Food Technology. 28(10):23-25.

APENDICE A. Métodos microbiológicos.

A. Método para recuento de microorganismos aeróbicos en placa.

1. Preparar las muestras de acuerdo al procedimiento recomendado por Thatcher y Clark (1968) para la preparación y dilución de licuados.
2. Pipetear un mililitro de cada dilución decimal deseada del licuado a juegos duplicados de cajas de Petri. El nivel de diluciones a usar puede variar de acuerdo al recuento esperado de bacterias.
3. Añadir rápidamente a cada caja de Petri 10-15 mililitros de agar para métodos estándar (SPC, Difco), derretidos previamente y mantenidos a $45 \pm 1^\circ$ C.
4. Mezclar los licuados y el agar por movimiento de rotación de las cajas de Petri.
5. Preparar una caja de Petri adicional, sin cultivo, como control de esterilidad.
6. Una vez el agar ha solidificado, invertir las cajas de Petri e incubarlas a $35 \pm 1^\circ$ C (modificado a 25° C en este trabajo) por 48 ± 3 horas.
7. Usando el contador de colonias, contar todas las colonias de las cajas que contengan de 30 a 300 colonias.
8. Computar el número de bacterias como microorganismos aeróbicos por gramo de muestra.

B. Método para enumeración de coliformes: determinación del Número Más Probable (NMP).

1. Pipetear un mililitro de cada dilución decimal deseada del licuado a cada uno de tres tubos de caldo lauril sulfato triptosa (LST, Difco).
2. Incubar los tubos a $35 \pm 5^\circ$ C por 24 horas.
3. Después de 24 horas, anotar los tubos que muestran producción de gas (la producción de gas se hace notoria con el uso de campanillas de Durham) y continuar con el método para determinación de organismos coliformes de origen fecal (Método C). Los tubos negativos (sin producción de gas) se incuban por 24 horas adicionales.
4. Después de las 24 horas adicionales de incubación, seleccionar los tubos con producción de gas y continuar con el Método C; descartar los tubos negativos.

C. Método para determinación de organismos coliformes de origen fecal.

1. Seleccionar los tubos de LST que fueron positivos para la producción de gas en el Método B.
2. Inocular con un asa de 3 milímetros de diámetro los cultivos de los tubos seleccionados en tubos separados de caldo E.C. (EC Broth, Difco).
3. Incubar los tubos de caldo E.C. a $45.5 \pm 2^\circ$ C y deter-

- minar la producción de gas después de 24 y 48 horas.
4. Todos los tubos que muestran producción de gas pueden considerarse positivos (presencia de organismos coliformes de origen fecal).

D. Método para enumeración de Staphylococcus aureus coagulasa positivo.

1. Inocular 4 tubos de caldo tripticasa soya (CTS, Difco) (cloruro de sodio al 10%) con un mililitro de los licuados de la muestra. La dilución máxima de la muestra debe ser suficientemente grande para dar resultados negativos por lo menos para una dilución.
2. Incubar los tubos a 35-37° C por 48 horas.
3. Sembrar cada tubo inoculado con un asa de 3 milímetros de diámetro en cajas de Petri con agar Vogel-Johnson (VJA, Difco), de tal manera que se obtengan colonias separadas.
4. Incubar las cajas a 35-37° C por 48±2 horas.
5. De todas las diluciones examinadas, seleccionar por lo menos una colonia de cada tipo diferente que haya reducido el telurito; examinarlas para producción de coagulasa (Método E).

E. Examen de actividad de coagulasa.

1. Cultivar las colonias que hayan reducido el telurito

en caldo de infusión cerebro-corazón (BHI, Difco) e incubar a 35-37° C por 20-24 horas.

2. Añadir 0.1 mililitro del cultivo resultante en 0.3 mililitros de plasma de conejo con EDTA (Difco), e incubar a 35-37° C por 4 horas.
3. Examinar los tubos y tomar como positivos los que posean coágulos densos grandes.

APENDICE B. Medios de cultivo utilizados.

1. Caldo de infusión cerebro-corazón (BHI, Difco).

Infusión de cerebro de ternero	200.0 gramos
Infusión de corazón de buey	250.0 gramos
Peptona	10.0 gramos
Cloruro de sodio	5.0 gramos
Fosfato de sodio monohidratado	2.5 gramos
Glucosa	2.0 gramos

Preparación: Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada. Colocar 5 mililitros del caldo en tubos de ensayo de 15 ó 20 mililitros y esterilizarlos en autoclave a 121° C por 15 minutos. pH final = 7.4.

2. Caldo E.C. (EC Broth, Difco).

Triptosa o tripticasa	20.0 gramos
Lactosa	5.0 gramos
Sales biliares	1.5 gramos
Fosfato de potasio monohidratado	4.0 gramos
Fosfato de potasio dihidratado	1.5 gramos
Cloruro de sodio	5.0 gramos

Preparación: Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada; si es necesario calentar suavemente para su disolución completa. Colocar 10 mililitros del

caldo en tubos de ensayo de 20 ó 25 mililitros con campanillas de Durham. Esterilizar en autoclave a 121° C por 10 minutos. pH final = 6.8.

3. Caldo laurilsulfato triptosa (LST, Difco).

Triptosa, triptona o tripticasa	20.00 gramos
Lactosa	5.00 gramos
Fosfato de potasio monohidratado	2.75 gramos
Fosfato de potasio dihidratado	2.75 gramos
Cloruro de sodio	5.00 gramos
Laurilsulfato de sodio	0.10 gramos

Preparación: Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada. Colocar 10 mililitros en tubos de ensayo de 20 ó 25 mililitros con campanillas de Durham. Esterilizar en autoclave a 121° C por 10 minutos. pH final = 6.8 aproximadamente.

4. Solución de peptona al 0.1% (Difco).

Peptona	10.0 gramos
Cloruro de sodio	5.0 gramos

Preparación: Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121° C por 15 minutos. pH final = 7.2.

5. Agar para métodos estándar (SPC, Difco).

Triptona	5.0 gramos
Glucosa	1.0 gramos
Extracto de levadura	2.5 gramos
Agar	15.0 gramos

Preparación: Añadir los ingredientes a un litro de agua destilada. Calentar hasta ebullición, agitando constantemente. Esterilizar en autoclave a 121° C por 15 minutos. pH final = 7.0.

6. Caldo tripticasa soya con 10% NaCl (TSB, Difco).

Tripticasa	17.0 gramos
Fitona	3.0 gramos
Cloruro de sodio	100.0 gramos
Fosfato de potasio monohidratado	2.5 gramos
Glucosa	2.5 gramos

Preparación: Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121° C por 15 minutos. pH final = 7.2.

7. Plasma de conejo con EDTA.

Preparación: Disolver 100 miligramos (una ampolleta) de Bacto-coagulasa Plasma Deshidratado (Difco) en 3 mililitros de agua destilada estéril.

8. Agar Vogel-Johnson (VJA, Difco).

Triptona	10.0 gramos
Extracto de levadura	5.0 gramos
Manitol	10.0 gramos
Fosfato de potasio monohidratado	5.0 gramos
Cloruro de litio hexahidratado	5.0 gramos
Glicina	10.0 gramos
Agar	16.0 gramos
Rojo fenol	0.025 gramos
Telurito de potasio	0.2 gramos

Preparación: Añadir todos los ingredientes, con excepción del telurito de potasio, a un litro de agua destilada. Mezclar y calentar hasta ebullición por un minuto. Esterilizar en autoclave a 121° C por 15 minutos. Añadir 2 mililitros de telurito de potasio al 1% a cada 100 mililitros de agar estéril. pH final = 7.2.

APENDICE C. Análisis de varianza de una clasificación por rangos de Kruskal-Wallis.

El análisis de varianza de una clasificación por rangos de Kruskal-Wallis es una prueba utilizada para decidir si un cierto número de muestras independientes pertenecen a poblaciones diferentes, o si las diferencias entre las muestras son simples variaciones aleatorias, semejantes a las esperadas entre distintas muestras de una población.

La hipótesis nula en esta prueba supone que las muestras proceden de la misma población o de poblaciones idénticas con respecto a los promedios.

Para evaluar la hipótesis nula se efectúan los siguientes pasos:

1. Cada una de las N observaciones es reemplazada por rangos en una sola serie, tomando los resultados obtenidos en todas las muestras. El dato más pequeño es reemplazado por el rango 1, y así sucesivamente hasta el dato más grande, que se sustituye por el rango N . N es el número de observaciones independientes de las k muestras.
2. Se encuentra la suma de los rangos para cada muestra (R_j). La prueba de Kruskal-Wallis determina si la desigualdad entre la suma de los rangos es tan grande que probablemente las muestras tomadas no proceden de la

misma población.

3. Conociendo

N = número de observaciones totales,

k = número de muestras,

R = suma de los rangos de cada muestra, y

n = número de observaciones para cada muestra,

se aplica la siguiente fórmula:

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^k \frac{R_j^2}{n_j} - 3(N+1).$$

4. Si el valor de H es igual o mayor que el valor de Chi cuadrado de la tabla de valores críticos de Chi cuadrado, en el nivel de significancia (α) fijado previamente y para el valor observado de grados de libertad ($gl = k - 1$), la hipótesis nula puede ser rechazada para ese nivel de significancia.
5. Cuando existen resultados iguales entre dos o más observaciones, a cada dato se le asigna la media de los rangos con los que está ligado. El valor de H se ve influido, en cierto grado, por las ligas entre observaciones, por lo que es necesario corregir este efecto, dividiendo el valor de H entre $1 - \frac{\sum T}{N^3 - N}$, donde $T = t^3 - t$ (t es el número de observaciones ligadas en un grupo de resultados ligados).

Por consiguiente, cuando existen ligas entre observaciones, el valor de H se puede calcular con la siguiente fórmula:

$$H = \frac{\frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^k \frac{R_j^2}{n_j} - 3(N+1)}{1 - \frac{\sum T}{N^3 - N}}$$

Se adjunta el programa Fortran IV elaborado para la determinación de H de la prueba Kruskal-Wallis.

```

0001 FTN4
0002 PROGRAM PESCA
0003 C PROGRAM PESCA ESTA DISEÑADO PARA ENCONTRAR EL VALOR
0004 C DE H EN EL ANALISIS DE VARIANZA DE UNA CLASIFICACION
0005 C POR RANGOS DE KRUSKAL-WALLIS PARTIENDO DE LAS MATRI-
0006 C CES POR RANGOS, OBTENIDAS POR EL ORDENAMIENTO SERIA-
0007 C DO DE LOS DATOS ORIGINALES(OBSERVACIONES). PARA MA-
0008 C YOR REFERENCIA CONSULTE LA TESIS DE J.M. RIDELEMAN
0009 C DE 1973.
0010 DIMENSION JRD(20,20), ELEM(401), TJ(401), RJ(20), DJ(20), IPAR(5)
0011 CALL RIPAR(IPAR)
0012 LEC=IPAR(1)
0013 WRITE(LEC,400)
0014 WRITE(LEC,200)
0015 C ENTRADA DE DATOS
0016 DO 1 I=1,20
0017 RJ(I)=3.0
0018 DJ(I)=3.0
0019 K=I
0020 DO 12 J=1,20
0021 L=J
0022 WRITE(LEC,300)
0023 READ(LEC,*)JRD(J,I)
0024 IF(ORD(J,I)5,1,13
0025 13 RJ(I)=RJ(I)+JRD(J,I)
0026 DJ(I)=DJ(I)+1.0
0027 12 CONTINUE
0028 1 CONTINUE
0029 6 ORD(L,K)=0.0
0030 C COMPUTO DEL NUMERO DE COLUMNAS
0031 IF(L.EQ.1)K=K-1
0032 CDAT=0.0
0033 C CONTEO DE DATOS
0034 DO 2 M=1,K
0035 CDAT=CDAT+DJ(M)
0036 2 CONTINUE
0037 N=CDAT
0038 M=0
0039 DO 3 L=1,K
0040 J=DJ(L)
0041 DO 3 I=1,J
0042 M=M+1
0043 ELEM(I)=ORD(I,L)
0044 3 CONTINUE
0045 ELEM(I+1)=0.0
0046 C CONTEO DE LIGANDOS
0047 DO 4 I=1,J
0048 TJ(I)=1.0
0049 IF(I.EQ.N)GO TO 4
0050 DO 9 J=I+1,J
0051 IF(ELEM(I).EQ.0.0)GO TO 4
0052 IF(ELEM(J).EQ.0.0)GO TO 9
0053 IF(ELEM(I)-ELEM(J))9,5,9
0054 8 TJ(I)=TJ(I)+1.0
0055 ELEM(J)=0.0
0056 9 CONTINUE
0057 4 CONTINUE
0058 C CORRECCION POR EXISTENCIA DE LIGANDOS
0059 SLIG=0.0
0060 DO 10 I=1,I
0061 SLIG=SLIG+(TJ(I)**3 - TJ(I))
0062 10 CONTINUE
0063 FAC=12.0/(CDAT*(CDAT+1.0))
0064 SRJ=0.0
0065 DO 11 M=1,K
0066 SRJ=SRJ+RJ(M)**2/DJ(M)
0067 11 CONTINUE
0068 SLIG=1.0 - SLIG/(CDAT**3 - CDAT)
0069 C DETERMINACION DEL VALOR DE H
0070 H=(FAC*SRJ - 3*(CDAT+1.0))/SLIG
0071 WRITE(LEC,100) H
0072 100 FORMAT(3X,"H TIENE EL VALOR COMPUTADO DE"E14.7)
0073 200 FORMAT("EMPIECE A ESCRIBIR SUS DATOS")
0074 300 FORMAT(" *")
0075 400 FORMAT("RECUERDE COLOCAR 0.0 AL FINAL DE CADA COLUMNA"/
0076 G"Y -1.0 AL FINAL DE TODOS SUS DATOS")
0077 END
0078 ENDS

```