

Microbiota de interés para la salud pública de *Oreochromis* spp. (tilapia roja) cultivada en jaulas flotantes en agua dulce

Microbial of the public health interest of *Oreochromis* spp. (Red tilapia) cultured in freshwater floating cages

Mayelín Fuentes, Josefa Valladares, Giselle Grass y Yanet Pico

Centro de Investigaciones Pesqueras, 5ta. Ave. y calle 246, Santa Fe, Playa,
La Habana, Cuba, CP: 19100, Teléfono: (537) 209-7852,
E-mail: mayelin@cip.telemar.cu

RESUMEN

La microbiota de un producto pesquero incluye la identificación de las especies bacterianas de interés para la salud pública durante el cultivo, cosecha y transportación. El presente trabajo determinó la calidad bacteriológica de *Oreochromis* spp. (tilapia roja), de cultivo intensivo en jaulas flotantes de ambientes dulceacuícolas. El estudio se efectuó en la presa "La Cidra", al Norte de Matanzas en período de seca y de lluvia. Se realizaron cuatro muestreos de 60 muestras que se conservaron en nevera con hielo durante 3 h hasta su análisis. Se determinó el recuento total de microorganismos a 30 °C, el número de coliformes fecales y *Escherichia coli*; la presencia de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Streptococcus* sp., *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Vibrio cholerae* y *V. parahaemolyticus*. Los microorganismos se aislaron de piel, branquias, intestino y músculo. La carga microbiana en músculo fue menor que en el resto de los órganos analizados. En el período de lluvia el crecimiento microbiano en órganos fue mayor que en período de seca. Los géneros bacterianos de interés sanitario identificados, fueron: *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Micrococcus* y la familia *Enterobacteriaceae* y las especies identificadas fueron: *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. cepacia*, *Vibrio (Listonella) damsella*, *V. hollisae*, *V. mimicus*, algunas cepas del grupo coliformes y *Escherichia coli*.

Palabras clave: tilapia roja, *Aeromonas*, *Pseudomonas* y *Escherichia coli*.

ABSTRACT

The microbial of fisheries products including the identification of bacterial species of interest to public health during cultivation, harvesting and transportation. This study determined the bacteriological quality of *Oreochromis* spp. (Red tilapia), intensive farming in floating cages in freshwater environments. The study was conducted in the dam "La Cidra", north of Matanzas in dry and rain seasons. 60 samples were stored in a refrigerator with ice for 3 h until analysis. We determined the total colony count at 30 °C, the number of fecal coliforms and *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Vibrio cholerae* and *V. parahaemolyticus*. The organisms were isolated from the tilapia skin, gills, intestine and muscle. The microbial load in muscle was lower than in the other organs analyzed. In the rainy season microbial growth in organs was higher than in dry period. The bacterial genera identified for public health interest were: *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Micrococcus* and *Enterobacteriaceae* and the species identified were: *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. cepacia*, *Vibrio (Listonella) damsella*, *V. hollisae*, *V. mimicus*, and some strains of *Escherichia coli* and coliform group.

Keywords: red tilapia, *Aeromonas*, *Pseudomonas* and *Escherichia coli*.

INTRODUCCIÓN

La contribución de la acuicultura a la producción total de la pesca de captura y la acuicultura continuaron

aumentando y pasó del 34,5 % en 2006 al 36,9 % en 2008. En el período 1970-2008 la producción acuícola de pescado comestible aumentó a un ritmo anual medio del 8,3 % (FAO, 2010). En la acuicultura mundial la tilapia constituye el segundo grupo de

peces más importante después de las carpas chinas, por sus características biológicas y su probada asimilación de las condiciones de confinamiento (FAO, 2008).

Se prevé que en los próximos años el cultivo de tilapia en jaulas flotantes debe aportar aproximadamente de 50-60 % de las capturas en aguas interiores cubanas. En este sistema de cultivo por la tecnología que emplea (altas densidades de siembra, gran número de jaulas, especies en cultivo), durante el manejo, cosecha y transportación pueden aparecer factores que inciden en la calidad e inocuidad del producto final, aspectos que pueden ser diferentes de los que se han obtenido en la tilapia sometida a otros sistemas de cultivo (Herrera *et al.*, 2007).

Conocer la microbiota de los productos pesqueros nos permite determinar los microorganismos indicadores de la calidad higiénico-sanitaria y cuáles pueden ser activados durante el deterioro (González, 1981; Fernández, 2000).

Este trabajo constituye la primera investigación en la que se realiza la determinación de la microbiota de la tilapia roja en cultivo intensivo en jaulas en aguas interiores cubanas y su objetivo es identificar las especies bacterianas de interés higiénico-sanitario de este producto de consumo humano

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio se analizaron 60 ejemplares de la especie tilapia roja cultivadas en jaulas flotantes, en la presa "La Cidra", al Norte de la provincia de Matanzas. Se efectuaron cuatro muestreos durante el año 2008, dos muestreos en marzo y mayo; meses que se comportaron como período de seca; aunque mayo está declarado oficialmente dentro del período de lluvia tuvo un comportamiento diferente porque la sequía se extendió hasta finales del mes y los otros dos muestreos se realizaron en período de lluvia (julio y agosto). En cada muestreo se capturaron 15 animales con peso promedio 363-391 g y tallas entre 26 x 12 cm y 30 x 14 cm. Los peces fueron colocados en bolsas estériles de polietileno y se almacenaron con hielo durante 3 h hasta su análisis en el laboratorio. Además se tomaron tres muestras de agua de cultivo en cada mes y se midieron parámetros físico-químicos (temperatura y pH) del medio acuático, en el momento de la toma de muestra.

En el laboratorio las muestras se colocaron en bandejas de acero inoxidable y se separaron en tres grupos de cinco ejemplares, donde se procedió en condiciones asépticas a la toma de muestra de piel, músculo, branquias e intestino. A partir de 22 g de muestra en una bolsa estéril Stomacher 400, se adicionaron 198 mL de solución salina peptonada (SSP) y se homogenizó durante 3 min, para obtener la

suspensión inicial 1:10. De la suspensión inicial se obtuvieron diluciones seriadas hasta 10⁷ según la metodología descrita en NC ISO 6887-1:2003. Las determinaciones realizadas fueron las siguientes: enumeración de microorganismos a 30 °C (NC ISO 4833:2002), detección y enumeración de coliformes (ISO 4831:2006) y *Escherichia coli* (ISO 7251:2005), detección de *Salmonella* spp. (ISO 6579:2002), *Vibrio parahaemolyticus* (ISO 8914:1990) y *Vibrio cholerae* (FAO, 1981; OMS, 1990). Además, se llevó a cabo la detección de *Listeria monocytogenes* según ISO 11290-1:1996, y *Streptococcus* spp. De acuerdo con lo descrito por González (1981). Para la detección de *Pseudomonas* spp. y *Aeromonas* spp. se tomó 0,1 mL de SSP y se realizó la inoculación por inundación de la superficie en placas de Petri con CromoCen® AGN (medio cromogénico y fluorogénico) y Agar Triptona Soya (TSA) que se incubaron a 37 °C durante 24 h.

A partir de los medios diferenciales utilizados en los análisis bacteriológicos de órganos de tilapia roja se realizó el aislamiento e identificación de géneros bacterianos, a través de la caracterización morfológica de las colonias y la microscópica del cultivo axénico. Por último, la realización de pruebas bioquímicas primarias, secundarias y terciarias, las cuales responden al Manual OXOID (1993) y al *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (1994).

Para la toma de muestras de agua se sumergieron frascos estériles de color ámbar de 250 mL en diferentes puntos del embalse cercanos al área de cultivo a 1 m de profundidad. Estos se mantuvieron en hielo hasta su análisis en el laboratorio. Las determinaciones de coliformes fecales y *E. coli* se realizaron según *Standard methods for the examination of water and wastewater* (1998).

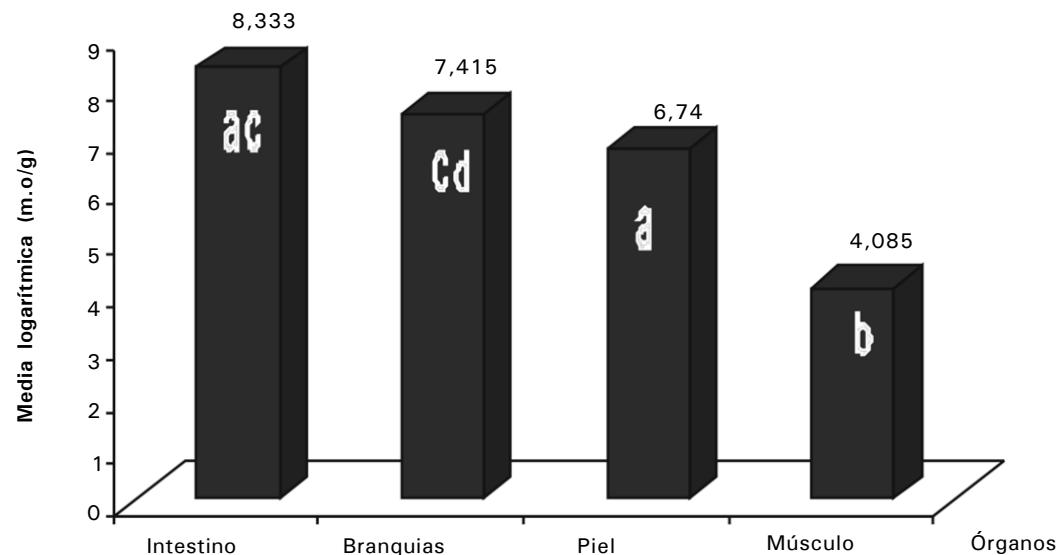
Los resultados se procesaron estadísticamente utilizando el programa SigmaStat versión 3.5: 2006, se aplicó un ANOVA por dos vías para comparar las cargas microbianas de cada órgano analizado en los muestreos realizados. Los datos del recuento de microorganismos a 30 °C fueron transformados a log₁₀ y luego se calculó la media logarítmica de todos los grupos. Para determinar las diferencias significativas entre las medias de los grupos comparados, se aplicó el método de rangos múltiples HOLM – SIDAK.

RESULTADOS

La figura 1 muestra el recuento de microorganismos a 30 °C/g, se observó que en el músculo fue significativamente menor para $p \leq 0,001$, en el orden de 102 a 105 en comparación con el resto de los órganos.

En la figura 2 se muestran diferencias significativas entre los recuentos de microorganismos a 30 °C/g de los órganos analizados en cada período para una $p \leq 0,001$, con aumento en los conteos microbianos en julio y agosto. En marzo y mayo la temperatura y el

pH del agua fueron de 25,5-26,1 °C y 8,0-8,27 respectivamente; mientras que en el período de lluvia (julio y agosto) la temperatura del agua ascendió en un rango desde 28,9-30 °C y el pH tuvo valores de 7,7-7,9.



Nota: Letras diferentes indican diferencias significativas.

Fig. 1. Comparación entre las medias logarítmicas de los recuentos de microorganismos a 30 °C de los órganos analizados.

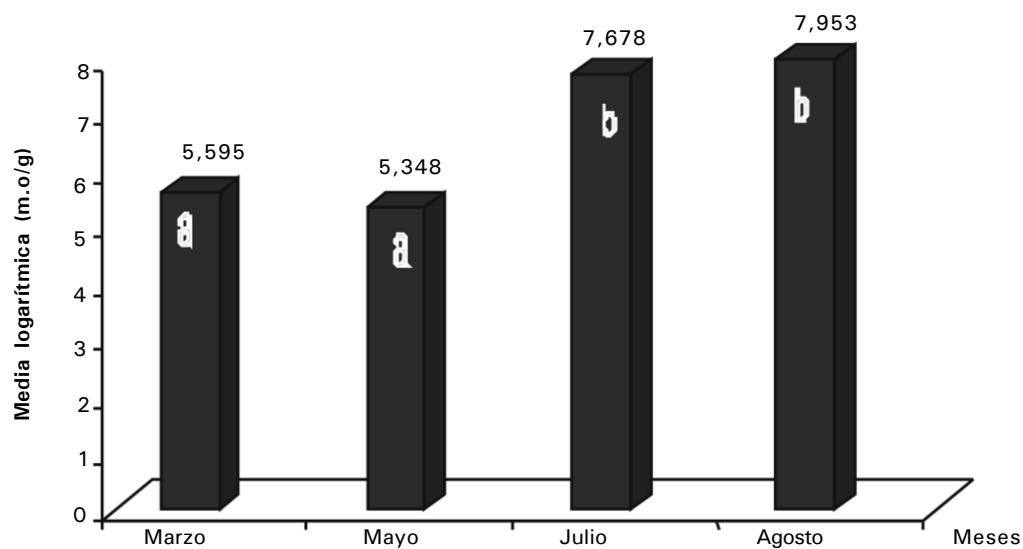


Fig. 2. Comparación de las medias logarítmicas del recuento de microorganismos a 30 °C en cada mes.

Durante el estudio se observó un predominio de bacterias gram negativas (70-76 %) mientras que las gram positivas oscilaron entre 22-30 %.

La identificación a partir del medio diferencial CromoCen® CC, demostró que las bacterias coliformes

fecales formaron colonias de coloración azul verdosa y *Escherichia coli* con fluorescencia azul. En el microscopio se observaron bacilos alargados gram negativos.

Se aislaron *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli*. En la figura 3

se observa la incidencia de coliformes fecales y *Escherichia coli* en la tilapia roja. Donde *Escherichia coli* representa casi la mitad de las colonias que fueron aisladas de coliformes fecales..

Los valores de *E. coli* en el agua del embalse (TABLA 1) en marzo y mayo, indican la ausencia de la misma en el

agua, mientras que en julio y agosto indican la presencia *E. coli* en el agua según APHA (1998).

En julio y agosto el NMP de coliformes fecales y *E. coli/g* de producto no cumplieron con las especificaciones microbiológicas establecidas para el pescado fresco por la NC 585:2008.

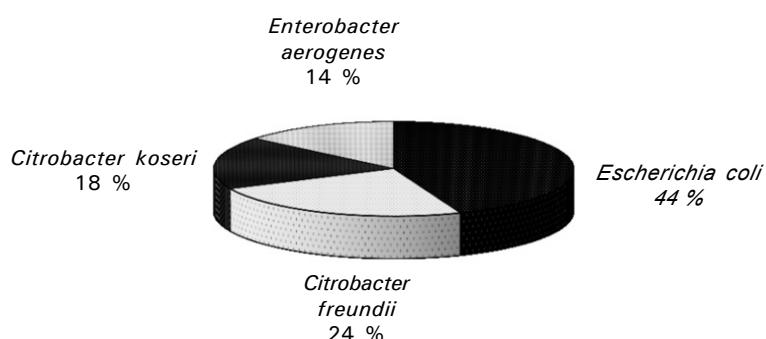


Fig. 3 . Proporción de colonias de coliformes fecales aisladas en tilapia roja.

TABLA 1. Contenido de NMP de coliformes fecales y *E.coli* /g de producto y el NMP de *E. coli*/100 mL de agua de cultivo

Meses analizados	Muestras analizadas	NMP de Coliformes fecales/producto	NMP de <i>E. coli</i> /producto	NMP de <i>E. coli</i> /100 mL de agua de cultivo
Marzo	1	< 0,3	< 0,3	< 2
	2	0,3	< 0,3	< 2
	3	0,4	< 0,3	< 2
Mayo	1	0,3	< 0,3	< 2
	2	0,6	< 0,3	< 2
	3	0,7	< 0,3	< 2
Julio	1	2,3	1,9	250
	2	2,8	2,1	220
	3	2,3	1,4	280
Agosto	1	7,5	6,4	540
	2	9,3	7,5	220
	3	2,4 x 10	9,3	430

No se aisló *Salmonella spp.*, ni *Listeria monocytogenes*, por lo que cumplieron con los límites de calidad establecidos en la NC 585:2008 y FAO (2008) para el pescado fresco.

La diversidad de géneros bacterianos identificados en la tilapia roja y su incidencia porcentual en los períodos de seca y lluvia se exponen en las figuras 4 y 5.

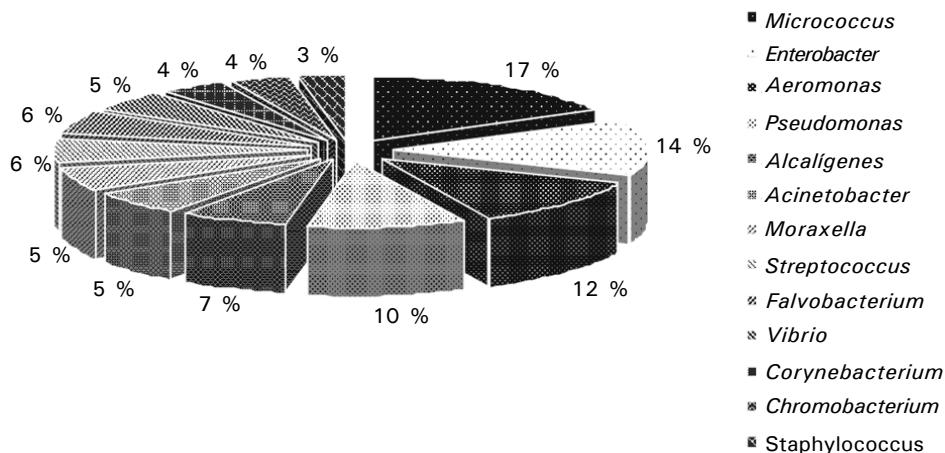


Fig. 4. Porcentaje de géneros bacterianos identificados e incidencia en época de seca.

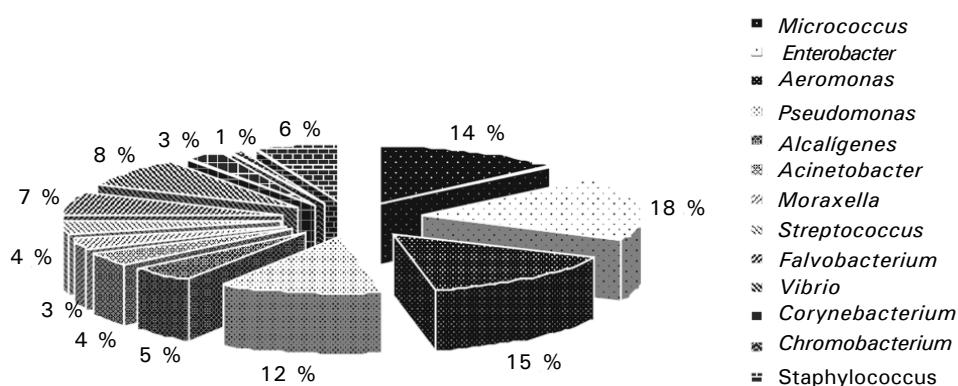


Fig. 5 Porcentaje de géneros bacterianos identificados y su incidencia en el período de lluvia.

Los resultados demuestran que los géneros bacterianos que predominaron en la tilapia roja fueron: *Micrococcus* (15-17 %), *Aeromonas* (12-15 %), *Pseudomonas* (10-12 %), así como géneros de la familia *Enterobacteriaceae* (14-18 %).

Del medio diferencial Cromocen AGN, se aislaron *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas cepacia*. Las especies identificadas de *Vibrio* fueron: *V (Listonella) damsela*, *V. hollisae* y *V. mimicus*. No se aisló *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio cholerae*, por lo que las muestras analizadas cumplieron con los criterios de calidad establecidos en la NC 585:2008 para el pescado fresco.

DISCUSIÓN

Para determinar la microbiota del pescado es importante conocer la carga microbiana de la piel, branquias e intestino, debido a que son los órganos que se encuentran en contacto directo con el músculo y constituyen el origen de la invasión bacteriana, por lo cual si el número de bacterias aumenta en dichos órganos, proporcionalmente aumentará en el músculo (FAO, 2009).

En el músculo del pescado fresco, se reportan recuentos microbianos entre 10^2 - 10^6 microorganismos/g (Molina *et al.*, 2000; Chitiry *et al.*, 2004; Agüeira *et al.*, 2004;

Scherer *et al.*, 2006). El Codex Alimentarius (2003) y la NC 585:2008 para el pescado fresco, proponen para este órgano un límite de 10^6 microorganismos/g para la enumeración de m.o a 30 °C, por lo que las muestras analizadas cumplieron con las especificaciones microbiológicas establecidas.

En julio y agosto se observó un aumento en los conteos microbianos respecto a marzo y mayo. En julio y agosto la temperatura del agua ascendió hasta 28,9-30 °C y el pH cercano a la neutralidad (pH = 7,9 y 7,7) generalmente el óptimo para el desarrollo bacteriano según Fernández (2000). Durante estos meses, la temperatura registrada se encuentra declarada por la NC ISO 4833:2002, como la temperatura de incubación que permite recuperar la microbiota total en los alimentos.

FAO (2009) plantea que el número total de microorganismos de los peces vivos y recién capturados varía enormemente. Shewan (1977) plantea que los pescados capturados en aguas cálidas presentan recuentos ligeramente superiores entre (10^3 - 10^7 ufc/g), mientras que el pescado capturado en aguas templadas contienen menor número de microorganismos desde 102 hasta 10^5 ufc/g. En los productos recién capturados la carga microbiana encontrada depende en gran medida de la contaminación microbiológica de sus ambientes acuáticos, buenas prácticas higiénico-sanitarias durante el manejo, cosecha y transportación; aspectos que inciden en la calidad e inocuidad del producto final (Herrera *et al.*, 2007).

Dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, se encuentran los coliformes fecales como microorganismos indicadores de la calidad higiénico-sanitaria y otros géneros bacterianos reconocidos por la FAO (2008) como patógenos al hombre.

Las bacterias de interés sanitario no autóctonas identificadas en esta investigación se encuentran en su mayoría dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, las cuales están presentes en los productos pesqueros como resultado de la contaminación a partir del reservorio animal/humano. Esto puede ser a causa del vertimiento en el embalse de residuales con desechos sólidos y efluentes de origen fecal provenientes de la ciudad, los cuales sirven de sustrato a *E. coli*, potenciado además por las altas temperaturas que caracterizan esta época del año.

No se aislaron *Salmonella* spp., *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* y *Listeria monocytogenes*, cumpliendo con los criterios de calidad exigidos en la NC 585:2008 para el pescado fresco y por la FAO (2008).

El predominio de bacterias gram negativas que se observó durante el presente estudio, fue establecido por Gram & Huss (1996), Álvarez & Agurto (2000) y Víquez *et al.* (2003) que plantean que la microbiota del medio acuático se caracteriza por la presencia de bacterias negativas a la tinción de Gram.

El predominio de *Micrococcus*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, así como géneros de la familia *Enterobacteriaceae* en la tilapia roja en estudio, se corresponde con los resultados de Sakata (1989) donde menciona a estos géneros bacterianos como los predominantes en ambientes dulceacuícolas.

Algunas bacterias que forman parte de la microbiota de los peces, pueden infectar al hombre y causan enfermedades entéricas. El hallazgo de *Aeromonas* y *Pseudomonas* es importante a nivel de salud pública pues algunas especies se consideran patógenos oportunistas, (Fernández, 2000; Centeno & Rodríguez, 2005). En cuanto a las bacterias aisladas de los medios Cromocen AGN, *A. sobria*, es típica de agua dulce según Rodríguez & Ribeiro (2004), y se le considera un agente causal de enteritis en humanos y septicemia en personas inmunocomprometidas (FDA, 2004).

Vibrio (*Listonella*) *damsela*, *V. hollisae* y *V. mimicus* se encuentran dentro de las doce especies patógenas potenciales más importantes de este género, por producir casos esporádicos de gastroenteritis y de infecciones extraintestinales que se transmiten al hombre a través de los alimentos (Fernández, 2000; Farfán, 2002).

Los géneros *Aeromonas*, *Pseudomonas* y *Vibrio* han sido reconocidos por FAO (2008) como causante de enfermedades transmitidas por alimentos.

Los resultados indican que investigaciones de este tipo permitirán definir la calidad bacteriológica de tilapia roja y declarar las bacterias de interés sanitario a tener en cuenta para establecer los controles microbiológicos de calidad durante su procesamiento tecnológico y almacenamiento o al usarla como materia prima en los productos de valor agregado.

REFERENCIAS

- Agueira, D., Grosman, F., Tabera, A., Sanzano, P. & Porta, R. (2004). Valoración de la calidad de carne de pejerrey *Odentesthesbonariensis*. *Revista Aquatic.*, Disponible en http://www.revistaquatic.com/aquatic/pdf/20_02.pdf Consultado el 12-11-08.
- Álvarez, J. D. & Agurto, C. P. (2000). Bacterioflora Gram negativa aerobia de tilapias silvestres y cultivadas en la región central de Venezuela durante el período 1999-2000. *Veterinaria Tropical*, 25 (2), 209-228.
- Borja, A. (2002). Los impactos ambientales de la acuicultura y la sostenibilidad de esta actividad. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.*, 18 (1-4), 41-49.
- Centeno, S. & Rodríguez, R. (2005). Evaluación microbiológica de pescados congelados producidos en Cumana, Venezuela, Estado Sucre. *Revista Científica*, 15 (2), 168-175.

- Chytiri, S., Chouliara, I., Savvaidis, I. & Kontominas, M. G. (2004). Microbiological chemical and sensory aquaculture rainbow trout. *Food Microbiology*, 21, 157-165.
- FAO. Documento Técnico de Pesca. No. 334. Roma, FAO. 174 pp.
- FAO (1981). *Manuales para el control de la calidad de alimentos 4. Análisis microbiológico*. Roma.
- FAO (2008). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*. Departamento de pesca y Acuicultura. Roma.
- Farfán, M. (2002). Estudio de la estructura genética de poblaciones de *Vibrio cholerae*. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona.
- FDA (2004). *Aeromonas hydrophila*. Disponible en: <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap17.html> Consultado el 18-01-09.
- Fernández, E. (200). *Microbiología e Inocuidad de los Alimentos*. Universidad Autónoma de Querétaro. México.
- Gram, L. & Huss, H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *Int J. Food Microbiol.*, 33, 121-137.
- Herrera, N. A., Güemez, J. & Aguirre, M. L. (2007). Calidad microbiológica del mero *Epinephelus moriovalencienヌs*. *Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico*, Yucatán, Dzilám de Bravo, 4 (40), 1-5.
- Huss, H. (1997). Aseguramiento de la calidad de los productos pesqueros.
- Huss, H. (1998). El pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad. *FAO. Documento técnico de pesca 348*.
- Merlo, E. (1980). Estudio de la flora microbiana de la *Tilapia* spp. *Folletos Nacionales MIP. Centro de desarrollo de productos pesqueros*. La Habana.
- Molina, M., Garro, O. & Judis, M. (2000). Composición y calidad microbiológica de la carne de Surubí. *Comunicaciones Científicas. Universidad Nacional del Nordeste*.
- NC 585 (2008). *Contaminantes microbiológicos en alimentos – Requisitos sanitarios*.
- NC ISO 4833 (2003). Microbiología para el consumo humano y animal. Método horizontal para la enumeración de microorganismos a 30 °C. *Técnica por conteo de colonias*. (3^a ed.).
- Rodrigues, D. P. & Ribeiro, R. V. (2004). *Aeromonas*. In Vieira, R.H.S.F., *Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática* (pp. 151-174). São Paulo, Varela.
- Rodríguez, M. C. & Prieto, A. (1987): Microfloraaerófila del intestino de *Oreochromis aureus* de cultivo y el agua asociada. *Análisis cuantitativo*. La Habana. *Bol. Tec. No. 1*, 11.
- Sakata, T. (1989). Microflora of healthy animals. In B. Austin y D. A. Austin (Eds.), *Methods for the Microbiological Examination of Fish and Shellfish* (pp. 141-163). England: Ellis Horwood Ltd. Chichester, U.K.
- Scherer, R., Rossini, A., Bochi, C., Steffens, C. & Martins, L. (2006). Chemical and microbiological quality of grass carp (*Ctenopharyngodonidella*) slaughtered by different methods. *Food Chemistry*, 99, 136-142.
- Víquez, F., Aiello, J. & Amerling, C. (2003). *Características biométricas y químicas de la tilapia de agua dulce (*Oreochromis niloticus*) y uso del pH y de las características organolépticas para estimar su vida sensorial almacenada a 5 °C*. Universidad de Costa Rica.