

Evaluación de la calidad bacteriológica de tilapia fresca (*Oreochromis niloticus*) proveniente de la Zona Norte de Costa Rica

Graciela Morales, Laura Blanco, María Laura Arias y Carolina Chaves

Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica

RESUMEN. El presente trabajo evaluó la flora normal y patógena asociada a la tilapia (*Oreochromis niloticus*), ya que no existen estudios previos, a nivel nacional, sobre la calidad microbiológica de este producto. Con este propósito, se determinó el Recuento Total Aerobio (RT), el número de coliformes totales (CT) y coliformes fecales (CF), *Enterococcus* sp., *Aeromonas* sp., bacterias lácticas y la presencia de *Listeria* sp y *Salmonella* spp. a partir de la superficie externa de la tilapia. Se recolectaron 50 muestras provenientes de las zonas de San Carlos y Cañas y se transportaron en frío hasta el Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Aguas de la Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, donde se efectuaron los análisis señalados según la metodología presentada por la American Public Health Association, 1998. Los resultados obtenidos confirman, desde el punto de vista microbiológico, la frescura de las tilapias al momento de su análisis, sin embargo, los niveles de coliformes encontrados fueron inaceptables para el consumo humano. No se logró aislar *Listeria* sp., pero el aislamiento de *Salmonella* spp. confirmó la contaminación fecal de las aguas de crianza de la tilapia, aparte de su importancia a nivel de salud pública. También se encontró que la tilapia presenta un número elevado de *Aeromonas* sp. como parte de su flora normal, por lo que se recomienda incluir este género dentro de las normas de calidad para pescado fresco. Según los datos obtenidos, no existe diferencia significativa (95% de confianza) entre el RT, los niveles de CT y CF, *Enterococcus* sp y *Aeromonas* sp. a partir de la tilapia proveniente de los criaderos de las zonas de San Carlos y Cañas.

Palabras clave: Tilapia, evaluación microbiológica, *Enterococcus* sp., *Aeromonas* sp., *Listeria* sp., *Salmonella* spp.

INTRODUCCION

La tilapia (*Oreochromis niloticus*), es un pez del grupo de los Telósteos, orden Peciformes, perteneciente a la familia Ciclidae, sub familia Tilapiinae y género *Oreochromis*. Aunque se conocen más de 100 especies de tilapia, sólo algunas son de importancia a nivel de producción en condiciones controladas de cultivo: tilapia roja, tilapia nilótico, tilapia áurea y tilapia stirling (1).

La tilapia presenta una serie de características biológicas y ecológicas especiales como un rápido crecimiento, resistencia a enfermedades y condiciones adversas, conversión eficiente del

SUMMARY. Bacteriological evaluation of fresh tilapia (*Oreochromis niloticus*) coming from the northern region of Costa Rica. The following work presents an evaluation of the normal and pathogenic flora associated to tilapia (*Oreochromis niloticus*), since there are no previous national studies referred to the microbiological quality of this product. The total aerobic plate count, lactic bacteria, *Enterococcus* sp and *Aeromonas* sp and fecal and total coliform count, and the presence of *Listeria* sp and *Salmonella* spp from the external surface of tilapias were evaluated. A total of 50 samples, coming from San Carlos and Cañas zones were transported in ice to the Food and Water Microbiology Laboratory, Universidad de Costa Rica, where the laboratory analysis were performed, according to the methodology presented by de American Public Health Association, 1998. The results obtained confirm the microbiological freshness of the product when the analysis was performed, although coliform levels were unacceptable. *Listeria* sp was not found, but the isolation of *Salmonella* spp. confirms the fecal contamination of water where the tilapia is grown, aside of the Public Health concern. Also, it was found a high number of *Aeromonas* sp, as part of its normal flora, so we recommend including this genus in the quality standards for fresh fish. According to the data obtained, there was no significant difference (95% confidence) between the total plate count, fecal and total coliforms, *Enterococcus* sp. and *Aeromonas* sp. from the samples coming from the zones of San Carlos and Cañas. **Key words:** Tilapia, microbiological evaluation, *Enterococcus* sp., *Aeromonas* sp., *Listeria* sp., *Salmonella* spp.

alimento, alta fecundidad, maduración temprana, aceptación de alimentos artificiales, entre otros. Su capacidad de producir una alta descendencia a una edad relativamente temprana, la hace ideal para su "cultivo". La tilapia madura a una edad de dos o tres meses, y en adelante puede tener crías cada tres o seis semanas, si se encuentra en condiciones óptimas (2)

La tilapia, considerada en otro tiempo un pescado de bajo valor, adecuada solamente para mercados étnicos, ha ganado popularidad en años recientes. Actualmente, tiene buena aceptación por el consumidor y es considerada una atractiva opción del menú en cadenas de restaurantes a nivel nacional e internacional.

En los últimos años, el mercado mundial de pescado ha evolucionado, tanto cuantitativa como cualitativamente, y de manera continua. Ejemplo de esto es que en 1961, los 3 mil millones de habitantes del planeta consumían anualmente, un promedio de 8,9 kg de pescado per cápita. En 1998, según las estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO), los 6 mil millones de habitantes del planeta consumían un promedio anual de 15,7 kg de pescado per cápita. En términos generales, la producción y el comercio de pescado se multiplicaron por 4 en los últimos 40 años, debido a la duplicación de la población y al aumento del consumo. En América Latina, la evolución fue similar: los 225 millones de latinoamericanos que consumían un promedio de 5,4 kg/persona de pescado en el año 1961, aumentaron a 490 millones que consumen un promedio de 9,6 kg/persona en 1998 (3).

El panorama global de la acuicultura es el de una industria localizada principalmente en países en vías de desarrollo, enfocada a la producción de pescado de agua dulce (4). En cuanto a la producción de tilapia, Taiwán es el mayor exportador del mundo en términos de volumen. Los mayores proveedores de filetes congelados a los Estados Unidos son Taiwán, Tailandia e Indonesia, mientras que Costa Rica domina el mercado de tilapia fresca a ese país (5).

Desde principio de la década de los setentas, se ha promovido el desarrollo de la acuicultura en Costa Rica (6), siendo casi totalmente dominada por el tipo continental de agua dulce, con énfasis en el cultivo de peces, específicamente trucha y tilapia. El cultivo de esta última se da en las siete provincias del país, no obstante, Guanacaste es la provincia con mayor producción (30 productores con 7215 toneladas/año) y Alajuela, específicamente San Carlos, posee el mayor número de productores (435 con 444 toneladas/año).

La producción de tilapia tiene un gran potencial, ya que el país cuenta con condiciones climáticas, hidrográficas y topográficas favorables para este tipo de actividad, además de su cercanía al mayor mercado de consumo de tilapia (EEUU) (7).

Con respecto a la flora microbiana de la tilapia viva, ésta depende de la flora existente en las aguas de donde proviene (5) y varía de acuerdo con el hábitat de la especie, sobre todo con la temperatura, profundidad, grado de contaminación de las aguas y cercanía de la costa. Se destaca la presencia de psicrófilos Gram negativos incluyendo *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Vibrionaceae* y *Aeromonadaceae*. Entre los Gram positivos existe una proporción variable de *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* y *Corynebacterium* (8). Las bacterias patógenas o indicadoras de contaminación raramente son encontradas en el pescado recién capturado, a no ser que provenga de aguas excesivamente contaminadas con materia fecal (5).

A pesar de la importancia económica de este producto, no existen estudios a nivel nacional sobre la caracterización de la flora normal y patógena asociada a la tilapia. El objetivo del presente trabajo es evaluar la calidad microbiológica de tilapia fresca, analizando la presencia de bacterias indicadoras de contaminación así como patógenas de importancia en Salud Pública.

MATERIALES Y METODOS

Recolección de muestras

Se recolectó un total de 50 tilapias de aproximadamente 188 ± 32 g cada una, provenientes de los estanques de productores de la zona de San Carlos (n=40) así como de una empresa comercializadora a nivel industrial ubicada en Cañas, Guanacaste (n=10). Estas últimas muestras se utilizaron como referencia con el fin de comparar la calidad microbiológica de las tilapias entre la zonas de San Carlos y Cañas.

Para capturar las tilapias se usó el método habitual del sitio de muestreo, incluyendo el uso de redes, anzuelo, cuerda, coladores, encierro de malla, entre otros. Con el fin de no alterar la flora de piel y escamas, se evitó el contacto de tilapias con cualquier elemento fuera de su ambiente natural. Una vez fuera del estanque, las muestras fueron colocadas en bolsas estériles y depositadas de inmediato en hielera para su transporte. Las muestras fueron mantenidas en frío hasta su análisis en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Aguas de la Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. El estudio se realizó entre los meses de noviembre 2002 y abril del 2003.

Análisis de laboratorio

A partir de cada muestra se realizó un recuento total aerobio, recuento de bacterias lácticas, de coliformes totales, fecales, *Enterococcus* y *Aeromonas* sp., determinación de la presencia de *Listeria* sp y *Salmonella* spp según la metodología descrita en American Public Health Association (9).

Preparación de muestras

Cada muestra fue pesada en balanza granataria y se le agregó un volumen de agua peptonada estéril (APE) 0,1% igual a su peso. Se realizó un lavado de la superficie de la tilapia durante 1,5 min aproximadamente. El líquido resultante se utilizó para hacer diluciones decimales (10^{-2} a 10^{-8}) también con APE 0,1%.

Recuento total de mesófilos aerobio

De cada dilución preparada, se inoculó por duplicado y mediante esparcimiento, 0,1 mL en placas de agar estándar (Difco®) + TTC (2,3,5 cloruro de trifeniltetrazolium). Estas placas fueron incubadas a 35°C por 48 horas

Recuento de coliformes

Se realizó a partir de cada dilución preparada, por vaciado, utilizando agar bilis rojo violeta (Difco ®), el cual fue incubado a 35°C por 48 h para la determinación de coliformes totales y a 44,5°C por 24 h para la determinación de coliformes fecales.

Recuento de bacterias lácticas

Se realizó por esparcimiento a partir de cada dilución preparada utilizando agar Rogosa (Difco ®), el cual fue incubado a temperatura ambiente por 4 días.

Recuento de enterococcus

Se realizó por esparcimiento a partir de cada dilución preparada utilizando agar EVA (ethyl violet agar) (Difco ®) el cual fue incubado a 35°C por 48 h.

Detección de género *Listeria*

A partir de la dilución inicial, se inoculó 10 mL en caldo *Listeria*, el cual fue incubado a 35°C por 24 h como enriquecimiento. El aislamiento selectivo se realizó en agar Oxford (Difco ®) el cual fue incubado a 35°C por 48 h. Las colonias sospechosas (halo negro y presencia central) fueron confirmadas por pruebas que incluyen el Gram, moviliad, catalasa, oxidasa, utilización de carbohidratos y CAMP.

Detección de *Salmonella* spp.

Se realizó un enriquecimiento a partir de la dilución inicial por 24 a 35°C. Posteriormente, se realizó un enriquecimiento selectivo utilizando caldo selenito y caldo tetrionato, incubados a 35 y 43°C por 24 h. El aislamiento selectivo fue hecho en agar XLD y agar Hecktoen, los cuales se incubaron a 35°C por 24h. Las cepas sospechosas fueron identificadas utilizando el sistema API 20E® así como pruebas serológicas (antisuero poli A-I + Vi Difco ®)

Cuantificación de *Aeromonas* sp.

Se realizó a partir de cada dilución utilizando agar SA (almidón ampilicina) el cual fue incubado a 35°C por 48 h y posteriormente inundado con solución de lugol-yoduro para verificar la hidrólisis del almidón.

Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico Statistix for Windows. En la Tabla 1 se señalan los resultados obtenidos y porcentajes de positividad del análisis de recuento total mesófilo aerobio, coliformes totales, fecales y *Enterococcus* a partir de las muestras de tilapia procedentes de San Carlos y Cañas.

TABLA 1
Distribución porcentual de las muestras de tilapia según el recuento total aerobio, recuento de coliformes totales, fecales y *Enterococcus* sp.

| UFC/g | Recuento total mesófilo aerobio n=50 | % | Coliformes totales n=50 | % | Coliformes fecales n=50 | % | Enterococcus sp. n=50 | % |
|----------------------------------|--------------------------------------|----|-------------------------|----|-------------------------|----|-----------------------|----|
| <10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 4 | 0 | 0 |
| 10-10 ² | 0 | 0 | 3 | 6 | 9 | 18 | 17 | 34 |
| 10 ² -10 ³ | 5 | 10 | 10 | 20 | 13 | 26 | 22 | 44 |
| 10 ³ -10 ⁴ | 13 | 26 | 20 | 40 | 20 | 40 | 10 | 20 |
| 10 ⁴ -10 ⁵ | 21 | 42 | 13 | 26 | 6 | 12 | 1 | 2 |
| 10 ⁵ -10 ⁷ | 11 | 22 | 4 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Comparando los resultados de recuento total aerobio con los parámetros establecidos por la ICMSF (International Commission for the Microbiological Examination of Foods, 1998) para pescado crudo (10), se encuentra que únicamente 12% de las muestras presentan una aceptación marginal y ninguna sobrepasa el límite de 10⁷ UFC/g, lo cual refleja la frescura del producto en el momento del análisis. Un segundo parámetro contemplado por la ICMSF para pescado crudo establece un límite máximo de 5,0 x 10² UFC/g para coliformes fecales; 58% de las muestras evaluadas presentaron valores superiores y por lo tanto inaceptables.

Los recuentos de coliformes totales son útiles como

indicadores de higiene (11). En este caso, un 74% de las muestras tenían un recuento igual o mayor a 10³ UFC/g, lo cual refleja una higiene deficiente. Esta alta carga de coliformes podría explicarse principalmente por una alta contaminación de las aguas de crianza de tilapia, la cual puede deberse a filtración de aguas negras en los estanques, uso de alimento de baja calidad, entre otros (5).

Los recuentos de enterococos son relativamente altos, un 22% de las muestras poseen un recuento superior a 10³ UFC/g, denotando de nuevo contaminación. La diferencia con los porcentajes obtenidos para coliformes fecales se debe a que estos últimos presentan un tiempo de generación mucho me-

nor que los cocos Gram positivos (9). Por otro lado, se puede destacar la mayor sensibilidad de estos últimos como índice de contaminación fecal, como ha sido reportado en la literatura (9).

En el presente trabajo, se logró aislar una cepa de *Salmonella* sp. a partir de una de las muestras provenientes de la zona de San Carlos. Su presencia confirma, una vez más, la contaminación de las aguas de crianza con materia fecal. Esta bacteria podría llegar al agua a través del alimentos que se le administra a los peces o mediante el "abono orgánico" de los estanques con excremento de animales como la gallinaza (12). El uso de este tipo de abono fue impulsado desde los años setentas en Costa Rica, como una forma de aumentar la productividad del pescado de agua dulce en estanques (6). Actualmente, no se conoce qué tan difundida es esta práctica.

El hallazgo de una cepa de *Salmonella* sp. es de suma importancia desde el punto de vista de Salud Pública y más si se considera la baja sensibilidad del método utilizado, donde se necesita una población mayor a 10^2 UFC/g para obtener un resultado positivo. La baja sensibilidad del método, aún cuando es el estandarizado, se debe a la interferencia por la abundante flora competitiva, el pobre estado fisiológico de la bacteria, y la necesidad de aislarla mediante un medio primario no selectivo (9).

Aeromonas sp fue aislada a partir del 98% de las tilapias evaluadas, donde el 80% presentó recuentos superiores a 10^3 UFC/g. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Hanninen et al en 1997 (13) donde se aisló esta bacteria a partir del 93% de las muestras (n=29) y los de Neyts et al (14), donde se obtuvo un 55% de positividad a partir de muestras de pescado y camarón. A pesar de repetidos aislamientos de esta bacteria, su dosis infectante no está definida, ni hay normas que regulen cuál debe ser el recuento permitido en pescado (14,15).

Por otro lado, diversos estudios han demostrado que *Aeromonas* es capaz de reproducirse y deteriorar peces de agua dulce conservados en hielo y a temperatura ambiente (10,16). Gram & Huss (8) citan a esta bacteria como el agente de descomposición específico del pescado de agua dulce mantenido en atmósfera aerobia y a temperatura ambiente; González et al confirman su papel de agente de deterioro en peces de agua dulce conservados en hielo (17).

Aeromonas sp. también es importante a nivel de Salud Pública. Varias especies presentan la habilidad de producir toxinas a bajas temperaturas asociadas a intoxicaciones alimentarias (15).

Con respecto a *Listeria* sp., no se aislaron cepas a partir de las muestras de tilapia analizadas. Estudios similares realizados a partir de peces han proporcionado datos divergentes, presentándose amplias variaciones en los porcentajes de aislamiento. Karunasagar (2000) refiere que estas diferencias pueden deberse a la metodología utilizada, a diferencias

en el tipo de muestra analizada (pescado fresco y fileteado) y a variaciones debidas a las distintas especies de peces o a la estación del año (18).

A partir de la cuantificación de bacterias lácticas en las muestras analizadas se obtuvo resultados bajos (94% de las muestras presentan recuentos inferiores a 10^3 UFC/g). Estos resultados coinciden con otros estudios en donde las bacterias lácticas están presentes sólo en altas cantidades como flora de descomposición de pescado almacenado al vacío o con atmósfera modificada mediante CO_2 (productos levemente conservados) (8,17).

En cuanto a la comparación de zonas de producción de tilapia, no existe diferencia significativa ($p < 0,05$) en cuanto a todos los parámetros evaluados excepto bacterias lácticas, donde San Carlos presenta recuentos mucho mayores que Cañas. Esta diferencia podría explicarse por variación en el pH del agua, en la temperatura ambiental y en las condiciones climáticas de ambas zonas geográficas.

Nuestro estudio refleja la flora microbiológica superficial que presenta la tilapia en su entorno, incluyendo la presencia de microorganismos de deterioro y patógenos; pero no refleja la flora derivada de la manipulación, ni la carga posterior a su procesamiento, por lo que se recomienda, en un futuro trabajo, valorar estos parámetros y su impacto sobre su exportación y la Salud Pública.

También, dado el elevado número de *Aeromonas* sp. aislado, se recomienda incluir este género dentro de las normas de calidad para pescado fresco.

REFERENCIAS

1. Chacón E. Biología general de la tilapia: curso básico de acuicultura, énfasis en trucha y tilapia. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Santa Clara, 2002.
2. Pérez H, Castillo J. Perfil metodológico para el cultivo de tilapia en estanques de tierra y jaulas flotantes. Informe de Prodepesca. Convenio Istmo/B7-310/IB ALA/90/09. Unión Europea- OSPESCA, 1998.
3. Ramírez R. Aspectos de mercado nacional e internacional de la tilapia: Curso básico de acuicultura, énfasis en trucha y tilapia. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Santa Clara : 2002,74-80.
4. Howgate P. Review of the public health safety of products from aquaculture. Int J Food Sci Tech. 1998;33: 99-125.
5. Viquez F, Aiello J, Amerling C. Características biométricas y químicas de la tilapia de agua dulce (*Oreochromis nilotica*) y uso del pH y de las características organolépticas para estimar su vida útil sensorial almacenada a 5°C. Tesis. Universidad de Costa Rica, 2003.
6. Nanne H. La proteína a domicilio. Troquel. 1977;1: 30-31.
7. Otárola A. Producción acuícola en Costa Rica: curso básico de acuicultura, énfasis en trucha y tilapia. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Santa Clara. 2002;69-73.

8. Gram L & Huss H. Microbiological spoilage of fish and fish products. *Int J Food Microbiol.* 1996;33:121-137.
9. American Public Health Association. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, 1998.
10. ICMSF. Microorganisms in foods: microbiological ecology of food contaminants. Blackie Academic and Professional, London, 1998.
11. Arias ML, Chaves C, Antillón F & Villalobos L. Microbiología de Aguas y Alimentos. Manual de Laboratorio. Lara Segura y Asociados, San José, 2002.
12. Dalsgaard A. The occurrence of human pathogenic *Vibrio* spp. and *Salmonella* in aquaculture. *Int J Food Sci. Tech.* 1998;33: 127-138.
13. Hänninen M, Oivanen P, Hirvelä-Koski V. *Aeromonas* species in fish, fish eggs, shrimp and freshwater. *Int J Food Microbiol.* 1997;34: 17-26.
14. Neyts K, Huys G, Uyttendaele J, Swings J & Debevere J. Incidence and identification of mesophilic *Aeromonas* spp. from retail foods. *Letters in Appl. Microbiol.* 2000;31: 359-363.
15. González C, Santos J, García López M, González N & Otero A. Mesophilic *Aeromonads* in wild and aquacultured freshwater fish. *J Food Prot.* 2001;64: 687-691.
16. González Rodríguez M, Santos J, Otero A, García López IM. PCR detection of potentially pathogenic aeromonads in raw and cold smoked freshwater fish. *J Appl Microbiol.* 2002;93: 75-680.
17. González Rodríguez M, Sanz J, Santos J, Otero A, García López M. Foodborne pathogenic bacteria in prepackaged fresh retail portions of farmed rainbow trout and salmon stored at 3°C. *Int J Food Microbiol.* 2002;77: 161-168.
18. Karunasagar I. Listeria in tropical fish and fishery products. *Int J Food Microbiol.* 2000,62: 177-181.

Recibido: 06-02-2004

Aceptado: 06-09-2004