

REPORT NO. IAEA-R-731-F

TITLE

Radiation sensitivity of the microbial flora of
fresh white (lean) fish

FINAL REPORT FOR THE PERIOD

15 Dec. 1968 - 14 Dec. 1971

AUTHOR(S)

D.de la Sierra Serrano
G.del Real Gómez
F. Pérez Florez
M.C.Saiz de Bustamante
M.Alonso Rodríguez
J.I.Matutano Aranda

INSTITUTE

Junta de Energía Nuclear
Direccion de Química e Isótopos
Madrid, Spain

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY

DATE March 1972

5

JUNTA DE ENERGIA NUCLEAR
DIRECCION DE QUIMICA E ISOTOPOS
DIVISION DE QUIMICA NUCLEAR
SECCION DE ISOTOPOS

IS-2340/I-41

"RADIOSENSIBILIDAD DE LA MICROFLORA DEL PESCADO BLANCO FRESCO"

INFORME FINAL SOBRE EL CONTRATO DE INVESTIGACION 731/RB
AL ORGANISMO INTERNACIONAL DE ENERGIA ATOMICA DE VIENA

D. de la Sierra Serrano
G. del Real Gómez
F. Pérez Florez
M. C. Saiz de Bustamante
M. Alonso Rodríguez
J. I. Matutano Aranda

Madrid, Enero de 1.972

JUNTA DE ENERGIA NUCLEAR
DIRECCION DE QUIMICA E ISOTOPOS
DIVISION DE QUIMICA NUCLEAR
SECCION DE ISOTOPOS

IS-2340/I-41

"RADIOSENSIBILIDAD DE LA MICROFLORA DEL PESCADO BLANCO FRESCO"

INFORME FINAL SOBRE EL CONTRATO DE INVESTIGACION 731/RB
AL ORGANISMO INTERNACIONAL DE ENERGIA ATOMICA DE VIENA.

D. de la Sierra Serrano
G. del Real Gómez
F. Perez Florez
M.C. Saiz de Bustamante
M. Alonso Rodriguez
J.I. Matutano Aranda

Madrid, Enero de 1972

En el presente informe se resumen los trabajos realizados dentro del Contrato de investigación 731/RB, de acuerdo con las instrucciones publicadas por el OIEA para la preparación de estos informes.

I N D I C E

1. INFORMACION SOLICITADA POR EL O.I.E.A.

- a) (i) Número del contrato.
(ii) Título del proyecto.
(iii) Centro de investigación.
(iv) Investigador principal.
(v) Periodo de tiempo que cubre este informe.
- b) Descripción de la información.
- c) Resultados obtenidos.
- d) Conclusiones.
- e) Bibliografía.
- f) (i) Alcance de las investigaciones.
(ii) Gastos.
 - A. Personal
 - B. Equipos
 - C. Material fungible
 - D. Transporte
 - E. Total de gastos

2. DETALLE DE LOS TRABAJOS REALIZADOS

- 2.1. Introduccion
- 2.2. Material
- 2.3. Técnicas de trabajo
 - 2.3.1. Dosimetría.
 - 2.3.2. Técnicas microbiológicas
 - 2.3.3. Métodos bioquímicos

2.3.4. Tests sensoriales

2.4. Material y métodos empleados en los estudios sobre el comportamiento del Clostridium botulínico, tipo E, en el pescado irradiado.

2.5. Parámetros ensayados.

2.5.1. Dosis de irradiación

2.5.2. Niveles de contaminación inicial

2.5.3. Condiciones de irradiación

3. EXPERIENCIAS REALIZADAS HASTA 1971

3.1. Resumen de las experiencias efectuadas

4. EXPERIENCIAS REALIZADAS EN 1971

4.1. Continuación de las experiencias de irradiación de las especies "Merlucius merlucius" y "Lepidorhombus boscii"

4.2. Experiencias de irradiación de "Merlucius merlucius" y "Gadus morhua".

4.3. Ensayos de inoculación artificial de filetes de pescado con esporos del Clostridium botulinum, tipo E.

4.3.1. Inoculación de esporos del Cl. botulinum a muestras de merluza.

4.3.2. Contaminación artificial simultánea de filetes de merluza y bacalao frescos con elevadas concentraciones de esporos del Cl. botulinum, tipo E.

5. DISCUSION DE RESULTADOS

6. CONCLUSIONES GENERALES

AGRADECIMIENTO

1. INFORMACION SOLICITADA POR EL O.I.E.A.

1. INFORMACION SOLICITADA POR EL O.I.E.A.

- a) (i) Número del contrato: 731/RB
(ii) Título del proyecto: "Radiosensibilidad de la microflora del pescado blanco fresco".
(iii) Investigaciones realizadas en:

Junta de Energía Nuclear
Dirección de Química e Isótopos
División de Química Nuclear
Sección de Isótopos

- (iv) Investigador principal:

D. de la Sierra Serrano

- (v) Periodo que cubre este informe:

15 de Diciembre 1968 - 14 Diciembre 1971

- b) Descripción de la investigación:

Se han puesto a punto y desarrollado técnicas microbiológicas, bioquímicas y organolépticas con objeto de llevar a cabo las líneas de investigación siguientes:

- Estudios ecológicos sobre factores que pueden influir en la dosis de irradiación que permita una prolongación justificable de la vida comercial del pescado, mediante técnicas microbiológicas, bioquímicas y organolépticas.

- Ensayos de inoculación artificial de filetes de pescado blanco irradiado, con esporos del Clostridium botulinum, tipo E. para analizar los parámetros que pueden afectar la producción de toxina botulínica.

Los trabajos experimentales han comprendido pruebas preliminares y series de experiencias de irradiación de "Merlucius merlucius" (pescadilla y merluza), "Lepidorhombus boscii" (gallos) y "Gadus morhua" (bacalao).

Para investigar el comportamiento del Clostridium botulinum, tipo E. en el pescado irradiado se han realizado experiencias de inoculación de esporos a diferentes concentraciones, temperaturas y condiciones de irradiación en

muestras de merluza y bacalao

c) Resultados obtenidos.

Con dosis de 100-300 Krad se ha prolongado de dos a tres veces la vida comercial de los filetes de merluza y pescadilla de distintas procedencias. Con niveles bajos de contaminación inicial, del orden de 10^3 gérmenes/gramo de pescado y dosis de 50 Krad, el periodo de almacenamiento se extendió hasta 10-12 días.

En las muestras de gallos y bacalao irradiados con 100 Krad, la vida comercial del pescado aumentó de 19 a 25 días según las condiciones del pescado recibido, dependiendo principalmente de las zonas de pesca y del tiempo transcurrido desde su captura.

Los resultados de los análisis bioquímicos y organolépticos empleados, en general han mantenido correlación con las pruebas microbiológicas.

La temperatura de irradiación y conservación de las muestras ha sido de 0-2°C, medida con termohidrógrafo, excepto en los ensayos de inoculación del Cl. botulinum, tipo E.

Los resultados de las series de experiencias de inoculación artificial de filetes de merluza y bacalao con esporos del Clostridium botulinum, tipo E, han mostrado que a temperaturas de refrigeración de 3-4°C y en las condiciones estudiadas, no se ha producido toxina botulínica en las muestras irradiadas y testigo (no irradiadas), durante el periodo de tiempo en que el pescado se ha mantenido apto para el consumo. Por el contrario a temperatura de 12°C sí se pudo detectar la referida toxina una y dos semanas antes de la terminación de la vida comercial de los filetes de ambas especies de pescado.

d) Conclusiones.

De los resultados obtenidos podemos deducir las conclusiones siguientes:

1. La aplicación de dosis de 50 y 100 Krad a filetes de pescado blanco en condiciones adecuadas y a temperaturas de conservación de 0-2°C puede permitir una prolongación justificable comercialmente del periodo de almacenamiento, 12 a 21 días. Se requieren dosis mayores para índices de contaminación más elevados y cuando se utilizan materiales de envasado permeables a los gases.
2. Dosis de irradiación comprendidas entre 50 y 300 Krad aplicadas a filetes de merluza, gallos y bacalao, reducen la carga microbiana en un factor de inactivación comprendido entre 10^2 y 10^3 gérmenes/gramo.
3. Se ha confirmado en las sucesivas series de experiencias que la prolongación de la vida comercial del pescado blanco fresco es función principalmente del nivel de contaminación inicial, condiciones ecológicas y materiales plásticos empleados en el empaquetado, siempre que se mantengan las muestras a temperaturas constantes de refrigeración.
4. Los microorganismos que se han mostrado más radiosensibles han sido los del género *Pseudomonas* y del grupo coliforme, eliminándose en un 90% aproximadamente a la dosis de 100 Krad.
5. La microflora superviviente en muestras de merluza irradiadas con 100 Krad y cerradas las bolsas en atmósfera normal ha quedado constituida fundamentalmente por gérmenes de los géneros *Achromobacter* y *Micrococcos*.
6. En las muestras de merluza irradiadas y cerradas al vacío, los microorganismos residuales encontrados fueron esencialmente *Lactobacillus*, *Aeromonas* y levaduras.
7. Los filetes de "*Lepidorhombus boscii*" (gallos) y "*Gadus morhua*" (bacalao), han presentado un número rela-

tivamente grande de gérmenes coryneformes (*Corynebacterium*, etc.), junto a los géneros *Achromobacter* en muestras irradiadas y cerradas en atmósfera normal y a los *Lactobacillus* en las cerradas e irradiadas al vacío.

8. El tratamiento de los filetes de pescado con polifosfatos, ha mejorado su presentación comercial, evitando la exudación o goteo y no alterando la composición cualitativa ni cuantitativa de la microflora residual superviviente.
9. En los ensayos de inoculación artificial de filetes de merluza y bacalao con esporos del *Clostridium botulinum*, tipo E, se ha comprobado un margen de seguridad entre el periodo de tiempo comprendido en la vida comercial y la posible producción de la toxina botulínica, a temperatura de refrigeración de 3-4°C, mientras que a temperatura de 12°C, la presencia de dicha toxina pudo ser detectada antes de la descomposición del pescado.
10. No se ha apreciado diferencia en cuanto al comportamiento del *Clostridium botulinum*, tipo E, en los lotes de filetes de pescado tratados con polifosfatos con respecto a los que no han recibido dicho tratamiento en filetes inoculados con esporos de los referidos microorganismos e irradiados a dosis de 100 y 200 Krad.

e) Bibliografía.

(i) Además de la bibliografía indicada en los cuatro informes de desarrollo anteriormente enviados, las referencias relacionadas con este informe así como las consultadas durante su realización son las siguientes:

- (1) De la Sierra Serrano, D., Alonso Rodríguez, M., Matutano Aranda, J.I. Prolongación de la vida comercial del pescado mediante radiaciones ionizantes. Ponencia enviada al XIX Congreso Mundial de Veterinaria celebrado en Agosto de 1971 en México. Madrid, febrero de 1971.

- (2) De la Sierra Serrano, D. Efectos de las bajas dosis de radiaciones ionizantes sobre la microflora típica y de contaminación del pescado blanco. Trabajo presentado a la XV Reunión Bienal de la Real Sociedad de Física y Química, celebrada en Tarragona en Octubre de 1.971.
- (3) Hannesson, G. and Dagbjartsson, B., Radurization of Scampi, shrimp and cod. Report of a project organized and supervised by the joint FAO/IAEA Division of Atomic Energy in Food and Agriculture. STI/DOC/10/124, IAEA, Vienna, 1971.
- (4) Bridges, B.A., Microbiological Aspects of Radiation Sterilization. Industrial Microbiology, Vol 5, 283-326, London, Gordon and Breach, 1964.
- (5) Brooke, R.O. and Steinberg, M.A., Preservation of Fresh Unfrozen Fishery Products by Low Level Radiation. I Introduction, Food Technology, 18(7): 112-3 (July 1964).
- (6) Brooke, R.O., Ravesi, E.M., Gadbois, D.F. and Steinberg, M.A., Preservation of Fresh Unfrozen Fishery Products by Low Level Radiation. III The effects of Radiation Pasteurization on aminoacids and vitamins in clams, Food Technology, 18 (7): 116-20.(July 1964).
- (7) Brooke, R.O., Ravesi, E.M., Gadbois, D.F. and Steinberg, Preservation of Fresh Unfrozen Fishery Products by Low Level Radiation. V. The effects of Radiation Pasteurization on amino acids and vitamins in Haddock Fillets, Food Technology 20(11): 99-102 (November 1966).
- (8) Sinnhuber, R.O., and Lee, J.S., Effects of the Irradiation on the Microbial Flora Surviving Irradiation Pasteurization of Seafoods, Annual Report, April 1, 1966-March 31, 1967, USAEC Report TID-24171, Oregon State University, April 15, 1967.

- (9) Horne, T., European Conference on the Use of Ionizing Radiation for Food Preservation, International. J. Radiation Biology, 1: 95-102 (Jan. 1959)
- (10) Sinnhuber, R.O., and Lee J.S. , Effects of Irradiation of the Microbial Flora Surviving Irradiation, USAEC Report TID-22289, Oregon State University, April 26, 1965.
- (11) Sinskey, T.J., Pablo, I.S., Silverman, G.J. and Ronsivalli, L., Effect of Packaging on the Major Microbial Flora of Irradiated Haddock, Nature, 213: 425-6 (Jan. 28, 1967).
- (12) Slavin, L.W., Ronsivalli, L.J., and Connors, T.J., Status of Research and Developmental Studies on Radiation Pasteurization of Fish and Shellfish in the United States, in Food Irradiation, Proceedings of the International Symposium, Karlsruhe, June 6-10, 1966, pp. 509-33, International Atomic Energy Agency, Vienna, 1966 (STI/PUB/127).
- (13) Yu, T.C., Landers, M.K., and Sinnhuber, R.O., Browning Reaction in Irradiation- Sterilization of Seafoods products, Food Technology, 23: 224-6 (Feb. 1969).
- (14) Van der Schaaf, A., and Mossel, D.A.A., Gamma Radiation Sanitation of Fish and Blood Meals, International Journal of Applied Radiation and Isotopes, 14: 557-62 (1963).
- (15) Tinker, B.L., Ronsivalli, L.J., and Slavin, J.W., Suitability of Flexible Plastics as Packaging Materials for Radiopesterization of Seafoods, Food Technology, 20(10): 122-4 (Oct. 1966).
- (16) Spinelli, J., and Miyauchi, D., Irradiation of Pacific Coast Fish and Shellfish. 5. The Effect of 5' inosine monophosphate on the Flavor of Irradiated fillets, Food Technology, 22: 781-3 (June 1968).
- (17) Anónimo, Some Aspects of Food Irradiation; A Visual Portfolio, Food Technology, 20(2): 44-5 (Feb. 1966).

- (18) Segner, W.P., Schmidt, C.F., Boltz, J.K. Groth Characteristics of type E Clostridium botulinum in the temperature Range 34 to 50 F. Contract No.: AT(11-1)1183) Annual Report to the United States Atomic Energy Commission, COO-1183-30, TID-4500, January 15, 1968.
 - (19) Spinelli, J., Dollar, A.M., Wedemeyer, G.A., and Gallager, E.C., Irradiation of Fish Fillets: Relation of vapor phase reactions to storage quality, International Journal of Applied Radiation and Isotopes, 20: 167-75 (1969).
 - (20) Ward, B.Q., Inoculated Pack Studies on Low Dose Irradiated Marine Products: Shrip. USAEC Report ORO-3698-2, University of Miami, May 1, 1968.
 - (21) Wheaton, E., Pratt, G.B. and Jackson, J.M., Radioresistance of Five Strains of Clostridium botulinum in Selected Food Products, J., Food Sci., 26: 345-50 (1961).
 - (22) Whitehair, L.A. and Anderson, D.L., Wholesomeness, Biochemical and Microbiological Aspects of the AEC Radiation Pasteurization of Food Program, Res. Develop. Ass. Activ. Rpt., 16: 56-62 (1964).
 - (23) Yu, T.C., Landers, M.K., and Snnhuber, R.O., Browning Reaction in Radiation-Sterilized Seafood Products, Food Technology, 23: 224-6 (Feb. 1969)
- f) (i) Los trabajos efectuados durante el desarrollo del contrato se han ajustado a las directrices y recomendaciones propuestas y aprobadas por el OIEA desde su iniciación y en las sucesivas renovaciones del contrato.
- (ii) La relación de gastos correspondiente a personal, equipos, material y transporte en el periodo de tiempo comprendido entre el 15-12-1968 al 14-12-1971 se resume en el cuadro siguiente:

Contrato	Periodo de tiempo	Gastos en dólares U.S.A.			Transporte	Total general
		Personal	Equipos	Material fungible		
371	15- 12- 68	8.379	2.899	3.005	65	14.348
	14- 9- 69					
E1/RB	15- 9- 69	6.836	450	2.660	110	10.056
	14- 3- 70					
E2/RB	15- 3- 70	7.086	595	2.610	130	10.425
	14- 9- 70					
E2/RB	15- 9- 70	7.086	710	2.768	85	10.649
	14- 3- 71					
	15- 3- 71	10.630	980	3.067	148	14.825
	14- 12- 71					

TOTAL GENERAL DE GASTOS 60.299

2. DETALLE DE LOS TRABAJOS REALIZADOS

2. DETALLE DE LOS TRABAJOS REALIZADOS

2.1. Introducción

En el presente informe final correspondiente al contrato de investigación OIEA-JEN 371/RB se resume la labor efectuada para dicho proyecto desde Diciembre de 1.968 hasta Diciembre de 1.971. Los trabajos han sido llevados a cabo en los laboratorios y dependencias de la Sección de Isótopos de la Junta de Energía Nuclear, en la Sección Veterinaria de la Escuela Nacional de Sanidad y en el Laboratorio de Radiobiología del Servicio de Fisiopatología del Patronato de Biología Animal.

Las especies de pescado ensayadas han sido "Merlucius merluccius" (merluza), "Lepidorhombus boschii" (gallos) y "Gadus morhua" (bacalao). Durante el desarrollo de las investigaciones se han seguido dos líneas fundamentales de trabajo:

- A) Determinaciones de la prolongación de la vida comercial del pescado irradiado mediante pruebas microbiológicas, bioquímicas y sensoriales.
- B) Estudio de las condiciones que pueden afectar la producción de toxina botulínica en filetes de pescado irradiado, previamente inoculados con esporos de Clostridium botulinum, tipo E.

En las series de experiencias se tuvieron en cuenta y aplicaron las recomendaciones y normas publicadas por el OIEA sobre la investigación en la irradiación de pescado, metodología microbiológica de los alimentos irradiados, y conclusiones del Panel sobre Irradiación de Productos de la Pesca organizado por la División Conjunta FAO/OIEA celebrado en Viena del 15 al 19 de Diciembre de 1.969.

Asimismo, se adoptaron todas las precauciones necesarias relativas a los trabajos con gérmenes patógenos en las experiencias de inoculación artificial de esporos del Cl. botulinum, tipo E.

2.2. Material

Como materia prima se utilizó pescado capturado por barcos de arrastre en diversas zonas y profundidades marítimas a la altura del litoral Noroeste de España. El transporte se realizó desde el puerto pesquero de Vigo a la Junta de Energía Nuclear, eviscerado, en vagones frigoríficos o camiones siempre en condiciones de refrigeración. El tiempo transcurrido desde su captura hasta la irradiación osciló entre las 48 y las 72 horas.

Las piezas se hicieron filetes de un peso aproximado de 100 gramos empaquetándose en bolsas de polietileno o rilsan (nylon francés), permeable e impermeable a los gases respectivamente, esterilizadas previamente por irradiación y cerradas herméticamente con máquina soldadora eléctrica en atmósfera normal y vacío.

Los lotes de muestras irradiadas y control se mantuvieron durante las experiencias a temperaturas de $2 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, excepto en las pruebas de inoculación del Clostridium botulinum, tipo E. El control de dichas temperaturas se efectuó mediante termohidrógrafos instalados en los frigoríficos.

2.3. Técnicas de trabajo

Las irradiaciones se llevaron a cabo introduciendo las muestras rodeadas de bolsas de hielo en el recipiente de la geometría tres de la Unidad de Irradiación Gamma de Co - 60 denominada "Nayade", perteneciente a la Sección de Isótopos, División de Química Nuclear, Dirección de Química e Isótopos de la J.E.N. Las intensidades de dosis fueron 0.41/Mrad/hora en las pruebas preliminares y de 1.134 Mrad/h. en las restantes experiencias.

2.3.1. Dosimetria

Teniendo en cuenta las normas y recomendaciones del Panel de la División Conjunta FAO/OIEA (15-19 Diciembre 1.969), se efectuaron comprobaciones periódicas y sistemáticas de la dosimetria en las muestras de pescado, para hallar la forma más adecuada de colocación de los filetes, con objeto de conseguir la más uniforme distribución de la dosis aplicada. Dada la situación vertical de las fuentes de Co-60 (en barras) y la trayectoria de isodosis, se consideró que la posición más adecuada es la horizontal a ambos lados del plano medio perpendicular a dichas fuentes.

La colocación de dosímetros centrales y laterales según técnica de Fricke, confirmó esta teoría obteniéndose datos de las lecturas de las densidades ópticas en los que se procuraron evitar las fuentes de error que pudieran afectar a los valores (diferencias entre las densidades ópticas del blanco y la del dosímetro irradiado, etc.).

Como la altura de las fuentes radiactivas es de 9 cm el plano medio formado por una lámina de aluminio se colocó a 4'5 cm de la base, dentro del recipiente contenedor de las muestras.

2. 3.2. Técnicas microbiológicas

Los métodos empleados fueron similares a los indicados en los informes de desarrollo IS 2340/I-24, 28, 33 y 35 correspondientes a los periodos de tiempo cubiertos por este mismo contrato de investigación y remitidos al OIEA.

En los estudios experimentales comparativos efectuados con las especies de merluza-gallos y merluza-bacalao, se ampliaron y perfeccionaron los métodos de aislamiento e identificación con medios de cultivo selectivos y numerosas pruebas bioquímicas con la finalidad de establecer una posible relación entre la microflore típica y de contaminación fecal y las condiciones ecológicas del pescado que pudiera repercutir en los gérmenes residuales supervivientes del pescado irradiado, obteniéndose interesantes datos que se detallan más adelante.

-16 -

En las pruebas sistemáticas de control se utilizaron los procedimientos siguientes:

A) Métodos de enumeración de microorganismos

1) Gérmenes mesófilos aeróbios

Se efectuaron estos recuentos mediante siembras en profundidad en placas Petri con medios de cultivo "Plate Count Agar" (P.C.A) de la casa "Difco" siguiendo la técnica de las diluciones decimales. En las últimas experiencias se empleó también el "Tryptic soy-yeast extract agar" (TSYEA) del "Baltimore Biological Laboratories" (BBL). Cuando se calculó que los gérmenes sobrepasaban los 3.000 por gramo de muestra las siembras se realizaron en superficie después de secar bien el agar nutritivo durante 24-48 horas a temperatura ambiente y extendiendo 0'1 ml de la dilución con una varilla de vidrio de dimensiones aproximadas de 3'5 mm de diámetro, 20 cm de longitud doblada en ángulo recto a 3 cm de su terminación.

2) Mesófilos totales (aerobios más anaerobio)

Siembra y cultivo en tubos de 160 x 16 mm en "AC Medium" (Difco). Este medio debido a su contenido en ácido ascórbico, unido a los restantes componentes permite el recuento con suficiente aproximación no sólo de los gérmenes aerobios sino también de los anaerobios.

Las siembras en cada dilución se realizaron por duplicado y triplicado.

La incubación duró 72 horas con dos temperaturas: estufa a 30°C y a temperatura de laboratorio que osciló entre 18-20°C.

3) Microorganismos anaerobios mesófilos

Se determinaron con el "PCA" y "Nutrient Agar (difco). Los anaerobios estrictos con campana especial metálica para efectuar el vacío e introducir las placas Petri sembradas

por los dos procedimientos indicados anteriormente. Los anaerobios estrictos junto con los facultativos mediante siembras y cultivos similares en tubos largos de 420 X 8 mm.

4) Psicrófilos

Siembra en medio de cultivo "Marin Agar", "Nutrient Agar" y "PCA" (Difco). Incubación a 4-6°C durante 12 días y a 15°C 6 días.

5) Bacterias coliformes

Siembras en placas Petri con agar desoxicolato sódico y en caldo lactosado con verde brillante y bilis al 2% contenido en tubos de 160 x 16 mm con campana Durham. Incubación a 37°C durante 24-48 horas. Para seguir los procesos de aislamiento e identificación de los gérmenes fecales y aerógenos se emplearon también los medios de cultivo sólidos "Eosin Metilene Blue Agar" y "Endo Agar" y el medio líquido "Lauryl Sulphate Tryptose Broth" (Difco) este último con campana Durham para registrar las fermentaciones gaseosas.

6) Escherichia coli, tipo I.

En los casos que interese determinar estas bacterias se siguió la técnica de Makenzie con posteriores comprobaciones mediante las pruebas o tests del IMViC (indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer y Citrato), teniendo en cuenta el cuadro recomendado por la Asociación Internacional de Sociedades de Microbiología en su Comité para las especificaciones en los alimentos (ICMSF)

B) Determinaciones del comportamiento bioquímico microbiano.

La presencia de gérmenes productores de SH_2 se efectuó con agua de triptona adicionada del 0.05% de citrato de hierro y del 0.02% de cistina, observando los tubos en que se produce el ennegrecimiento debido a la precipitación del hierro.

El indol se detectó mediante el reactivo de Ehrlich-Kovacs.

En la realización de las pruebas bioquímicas se emplearon los siguientes reactivos:

Koser Citrate Medium (Difco)
G F Basal Medium (Difco)
Differentiation Disks Oxidase (Difco)
Motility Test Medium con Beef Extract (Difco)
Sensitivity Disks Penicillin (Difco)
Sensitivity Disks Terramycin (Difco)
Arginine

En los análisis de investigación dirigidos al aislamiento e identificación de microorganismos específicos se utilizó la clasificación del "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (7ª Edición de 1.957). Las resiembras a partir de los medios de cultivo empleados en las pruebas de control indicadas permitieron en aislamiento de numerosas colonias en cada una de las experiencias. Sucesivos pases en medios de cultivo especiales y selectivos permitieron su ulterior identificación.

La pauta general seguida para la identificación de los diferentes grupos principales de gérmenes ha sido:

1) Microorganismos Gram- positivos

a) Bacilos, Esporulados (Catalasa +) y no esporulados (catalasa +): Corynebacterium.

Catalasa(-) y Lactato (-) = Lactobacillus

b) Cocos, - Con temperatura óptima de 20-30°C aerobios degradan los hidratos de carbono por metabolismo oxidativo y no crecen en el medio selectivo Chapman 110 son Micrococos y en el caso de que se presenten en paquetes cúbicos de 8, Sarcinas.

Los Estafilococos se investigaron mediante el medio "Baird-Parker" incubando a 30-37°C durante 24 horas.

c) *Clostridium welchii*.

La investigación de los gérmenes del género *Clostridium welchii* y del grupo sulfito-reductores en general se llevó a cabo empleando el medio de cultivo "Iron Sulphite Agar" (Oxoid). Incubación a 44°C durante 24 horas.

2) Microorganismos Gram-negativos:

Por ser los gérmenes más numerosos que se encuentran en las muestras de pescado se empleó una sistemática más compleja con arreglo a la siguiente pauta:

- a) Reacción de Hugh y Leifson, para conocer el modo de ataque a los hidratos de carbono (glucosa y/o lactosa). De esta forma se subdividieron las colonias en dos grandes grupos: productoras de la degradación de dichos azúcares por metabolismo fermentativo con o sin producción de gas, entre las que se encuentran las colonias constituidas por Enterobacteriáceas y Aeromonas diferenciadas a su vez por flagelos peritricos o cefalotricos respectivamente; y, las que podían producir distinto proceso de degradación de los azúcares, bien oxidativo, inerte o fermentativo entre las que se encontraron las de Pseudomonas con pigmento fluorescente, las no pigmentadas, los Flavobacterium con pigmento amarillo, y las de Achromobacter sin pigmentaciones.
- b) Las Enterobacteriáceas se investigaron según la producción de ácido, ácido y gas y SH_2 así como por el test INViC para distinguir las bacterias fecales de las aerógenas, del grupo Escherichia-Achromobacter.
- c) Reacción de la oxidasa, que permitió la distinción entre importantes grupos bacterianos unida a las pruebas de diferenciación de la sensibilidad a los antibióticos de penicilina y terramicina, así como las reacciones de decarboxilación de la arginina facilitaron la clasificación de las Pseudomonas, Achromobacter, Flavobacterium y Vibrios.

C) Población fúngica

Para el recuento y tipificación de la población fúngica se han aplicado las técnicas y medios de cultivo recomendados por el Comité Mixto FAO/OIEA en el nº 104 de los "Technical Reports Series".

2.3.3. Métodos bioquímicos

Se llevaron a cabo determinaciones del nitrógeno de las bases volátiles totales (NBVT), de la trimetilamina (TMA) y de los ácidos volátiles totales (AVT), de las muestras, como índices de la actividad bioquímica de la microflora residual y testigo. Para las valoraciones del NBVT se empleó la técnica de Okoloff basada en el desplazamiento de las bases volátiles por el óxido de magnesio y posterior medida volumétrica del destilado por retroceso. En la TMA se ha utilizado el método espectrométrico de Dyer y en los análisis de los AVT la técnica de la Asociación Oficial de químicos de Agricultura de los EE.UU. (AOAC), con ligeras modificaciones. Asimismo se ha aplicado el método de ASAKAWA fundado en la determinación de la "Relación de destilación" (RD) de los ácidos volátiles. Este último método sigue esencialmente la técnica de la AOAC pero relaciona proporcionalmente la frescura del pescado con los valores de la RD que existe entre el tanto por ciento de acidez de la segunda fracción de 50 ml del destilado con la primera.

Todos los métodos bioquímicos anteriormente indicados han sido descritos con detalle y figuran en las referencias bibliográficas de los informes de desarrollo IS 2340/I-24 y I-28 (1.969 y 1.970).

2.3.4. Tests sensoriales

Mediante un test escalar hedónico de 5 puntos y utilizando un panel no entrenado de 20 miembros procedente del personal de la plantilla del laboratorio, se han valorado los caracteres sensoriales de apariencia, olor y textura de los filetes en estado crudo. (ficha nº 1).

Para valorar el sabor de las muestras cocidas, se ha constituido un segundo panel compuesto de 10 jueces, seleccionados del anterior por poseer mayor agudeza en la valoración para el pescado crudo.

Las muestras control e irradiadas se han presentado a los jueces codificadas, reflejando estos, individualmente, sus marcas en las fichas nº 2 y 3.

Las valoraciones de pescado cocido se efectuaron preparando las muestras de la forma siguiente: los controles congelados se sometieron a vapor fluente durante veinte minutos, sin previa descongelación; las irradiadas se sumergieron en un baño de agua hirviendo durante diez minutos.

El criterio de calidad se estableció considerando que toda muestra que no alcanzara con arreglo a la escala hedónica un valor de "3" en el promedio de los parámetros estudiados se estima concluida su vida comercial, siendo igualmente desechada toda muestra que no obtenga, en alguno de los parámetros un valor mínimo de "2'8".

Para estimar si los datos obtenidos en las valoraciones halladas de cada uno de los parámetros procedentes de una población pequeña como la de nuestros paneles, pudieran ser significativos desde el punto de vista de grupos numerosos de consumidores, se sometieron estos resultados a tratamiento estadístico, utilizando la distribución de la "t" de Student, adoptando una probabilidad del 90%.

A partir de las experiencias realizadas a comienzos del año 1.970 y de acuerdo con las recomendaciones del Panel Mixto FAO/OIEA (1969), las determinaciones organolépticas se centraron en la valoración del olor en estado crudo verificándose mediante una escala hedónica de 9 puntos propuesta por el "Bureau of Commercial Fisheries of Gloucester, Massachusetts". Los resultados se sometieron al análisis de la varianza.

F I C H A N° 1

Escala de valoración de 5 puntos para la apariencia, olor y textura del pescado blanco irradiado y control en estado crudo

1. Apariencia

- 5.- Muy brillante, como fluorescente a la luz, sin defectos (hemorragias o zonas violáceas u oscuras)
- 4.- Color brillante, pero algo apagado como de cera.
- 3.- Ausencia de color propio del pescado, como si estuviera decolorado.
- 2.- Pequeñas opacidades, presencia de defectos (hemorragias, zonas oscuras o violáceas)
- 1.- Completamente opaco (a la luz) y presencia de defectos ostensibles.

2.- Olor

- 5.- Muy bueno - fuerte olor fresco como a mar
- 4.- Bueno - sin olor.
- 3.- Regular - Ligero olor a pescado
- 2.- En el límite para el consumo - Fuerte olor a pescado pasado
- 1.- Incomible - Fuerte olor a descomposición o podredumbre (olor amoniacal).

3.- Textura

- 5.- Firme - Elástico a la presión digital
- 4.- Alguna pérdida de elasticidad
- 3.- Pérdida de la firmeza o elasticidad sin llegar a blando
- 2.- Blando o correoso.
- 1.- Muy blando, como fofo o pulposo, retiene la impresión digital.

F I C H A N° 2

Valoración sensorial del pescado crudo irradiado

Nombre _____ Fecha _____

Muestras Parámetros	Muestra n°	Muestra n°	Muestra n°	Muestra n°
Apariencia				
Olor				
Textura				

Nota.- De acuerdo con su apreciación, coloque la marca que cree corresponde a cada muestra, en cada uno de los parámetros considerados.

F I C H A N° 3

VALORACION SENSORIAL DEL PESCADO COCIDO IRRADIADO

Nombre _____ Fecha _____

	MUESTRA N° 1				MUESTRA N° 2				MUESTRA N° 3				MUESTRA N° 4			
	APARIENCIA	TEXTURA	OLOR	SABOR	APARIENCIA	TEXTURA	OLOR	SABOR	APARIENCIA	TEXTURA	OLOR	SABOR	APARIENCIA	TEXTURA	OLOR	SABOR
5. Muy Buena																
4. Buena																
3. Regular																
2. En el límite de consumo																
1. Inaceptable																
COMENTARIOS Y SUGERENCIAS																

2.4. Material y métodos empleados en los estudios sobre el comportamiento del *Clostridium botulinum*, tipo E, en el pescado irradiado.

En los estudios del *Clostridium botulinum*, tipo E y de la producción de su toxina se siguieron las técnicas recomendadas por el Panel de Expertos de la FAO/OIEA con la colaboración de la Asociación Internacional de Sociedades de Microbiología (IAMS) (Technical Reports Series No. 104) y los métodos utilizados por Segener y col (18).

Las experiencias, en esta línea de trabajo, se realizaron con las especies "*Merluccius merluccius*" (merluza) y "*Gadus morhua*" (Bacalao), ambas en estado fresco.

Para las inoculaciones artificiales de filetes de pescado se prepararon diluciones de dos cepas de *Cl. Botulinum*, tipo E.: una procedente de "Welcome" (Inglaterra) y otra del Instituto Pasteur de Paris. Ambas han sido valoradas para probar su poder toxígeno, con resultados positivos.

La obtención de suspensiones de esporos con suficiente concentración se llevó a cabo sembrando a partir de la cepa "Welcome" en el medio de cultivo "TPG" adicionado del 1% de Yeast Extract". Transcurrido el tiempo de incubación de 96 horas a 30°C, se centrifugó obteniéndose una densa suspensión que fue pasterizada para eliminar las formas vegetativas. En observación microscópica los frotis teñidos por los colorantes habituales, se comprobó, en cada campo, la existencia de elevado número de formas esporuladas típicas, del referido microorganismo. Los esporos producidos, antes de preparar la suspensión, fueron lavados repetidamente y de nuevo centrifugados con objeto de eliminar toda posible existencia de toxina.

La inoculación de cada filete se realizó por inyecciones fraccionadas, en número de 12 a 14 practicadas a distinta profundidad del espesor del filete a través de diferentes

puntos de su superficie para conseguir la mayor uniformidad posible en la distrución de los esporos.

Simultáneamente a la inoculación de los filetes de pescado se sembraron esporos de la suspensión en medios de cultivo "Cooked Meat Medium" y Tarozzi", que actuaron como testigo y para comparar las valoraciones de la toxina.

Las pruebas de control para comprobar la existencia de gérmenes botulínicos y de su toxina se efectuaron semanalmente a partir de los siete días siguientes a las inoculaciones tanto de los cultivos sembrados como de los filetes contaminados artificialmente.

Además de la técnica clásica de inoculación de ratones protegidos y no protegidos con el suero botulínico correspondiente, se detectó la presencia de toxina por la técnica de doble difusión en gel de agar.

En la detección de la toxina botulínica se utilizó el procedimiento del acetato sódico (solución tampón, pH 5'5, 05 M) con y sin previa digestión trípica, empleada por Segner y col. (18), comprendiendo los siguientes tiempos:

a) Añadir con pipeta 2g de la muestra (macerado de pescado triturado y homogeneizado con el "Ultraturrax") a 2 ml de la solución de acetato sódico tampón.

b) La muestra diluida se mantiene a 3°C durante 20-24 horas para así procurar la toxina que pudiera existir retenida intracelularmente.

c) En los casos en que se ensayó la digestión trípica se añadió 0'2 ml de tripsina a 10% recientemente preparada incubándose durante 3 horas a 37°C.

d) Se inocularon intraperitonealmente fracciones de 0'5 ml a pares de ratones con y sin protección de suero antibotulínico, tipo E., procedente del Instituto Pasteur de Paris, observándose los síntomas clínicos y muertes.

Los recuentos del número de gérmenes botulínicos de las distintas suspensiones y de las muestras de pescado inoculado artificialmente, se efectuaron mediante siembras en medios sólidos de agar-sangre y "Reinforced Clostridial Agar" (oxid), incubados en condiciones de estricta anaerobiosis con campanas de vacío así como también por siembras en tubos con tioglicolato adicionado del 1% de agar.

La comprobación de que los microorganismos de las colonias formadas pertenecían a la especie *Clostridium botulinum*, tipo E, se realizó por la reacción de inmunofluorescencia.

2.5. Parámetros ensayados.

En el planteamiento de las experiencias se ha tenido en cuenta el estudio de los efectos producidos por la variación de los parámetros considerados de mayor interés desde el punto de vista tecnológico y sanitario. De acuerdo con los objetivos propuestos, se han ensayado y analizado las variables siguientes:

2.5.1. Dosis de irradiación

En las experiencias preliminares se aplicó la dosis de 300 kilorads y posteriormente las de 50, 100, 150 y 200 Krad, con la finalidad de hallar la dosis que permitiera prolongar la vida comercial del pescado un tiempo mínimo justificable desde el punto de vista comercial.

2.5.2. Niveles de contaminación inicial.

Se utilizó pescado procedente de distintas zonas y diferentes condiciones ecológicas con objeto de poder valorar la influencia de los niveles de contaminación inicial y del tiempo transcurrido desde la captura sobre la extensión del periodo de almacenado en las muestras irradiadas en comparación con las testigo.

2.5.3. Condiciones de irradiación.

Se emplearon distintos materiales plásticos de empaque-

efectuar el vacío e introducir las placas Petri sembradas

3. EXPERIENCIAS REALIZADAS HASTA 1971

tamiento y diferentes atmósferas. En primer lugar se emplearon bolsas de polietileno (permeable a los gases) y después nylon francés denominados comercialmente "rilsan". El 70% de las muestras (aproximadamente) se cerraron en atmósfera normal y el 30% restante se soldaron al vacío. Durante las irradiaciones las muestras fueron mantenidas en todo momento a temperatura de refrigeración de $0-2^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ mediante la colocación de bolsas de hielo que rodearan las muestras de pescado.

3. EXPERIENCIAS REALIZADAS HASTA 1971.

3.1. Resumen de las experiencias efectuadas.

Se llevaron a cabo dos experiencias preliminares sobre muestras de pescado procedentes del mercado minorista, para así poder conocer las condiciones reales de la contaminación inicial de esta clase de pescado en el comercio, tal como lo adquiere el ama de casa. En estas pruebas detalladas en el informe IS 2340/I-24 (1969) la única dosis aplicada fue la de 300 Krad utilizándose como material de empaquetado el polietileno comercial. La temperatura de conservación se mantuvo a $3^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. El 25% de las muestras no se irradiaron conservándose como testigo.

De acuerdo con lo indicado en los cuatro informes de desarrollo de este contrato de investigación enviados al OIEA, se han realizado hasta el 15-3-71 las siguientes experiencias:

1. Diez experiencias de irradiación de "Merlucius merlucius" (merluza) en las que se han variado: las temperaturas de conservación, materiales de empaquetado y diferentes atmósferas (atmósfera normal y vacío) así como las condiciones ecológicas determinadas por distintas zonas de captura y profundidades del mar.

2. Cuatro experiencias de irradiación mixta de las especies "Merlucius merlucius" (merluza) y "Lepidorhombus boschii" (gallos) para efectuar estudios comparativos.

3. Dos series de pruebas de inoculación artificial de esporos del *Clostridium botulinum*, tipo E a filetes de merluza con objeto de estudiar las condiciones que pueden afectar la producción de toxina botulínica correspondiente.

Los detalles de todas experiencias y pruebas se han comunicado al OIEA en los informes de desarrollo IS 2340/I-24, 28, 33 y 35 y han servido de base a los trabajos publicados y presentados en las XIV y XV Reuniones Bienales de la Real Sociedad de Física y Química celebradas en Sevilla (1969) y en Tarragona (1971), en la Reunión organizada por la División Mixta FAO/OIEA sobre conservación de pescado por irradiación celebrada en Viena (1969) y como ponencia en el XIX Congreso Mundial de Veterinaria que ha tenido lugar en Mexico (1971), cuyas referencias bibliográficas se indican en los cuatro informes anteriormente citados.

Como ampliación de cada una de las referidas experiencias a continuación se indican los resultados obtenidos al término de las mismas, para así poder establecer de forma significativa, los efectos de las dosis de irradiación aplicadas sobre la prolongación de la vida comercial de los filetes de pescado, mediante datos tabulados no publicados con anterioridad. (Tablas Nº I a XIV):

T A B L A I : RESULTADOS DE LA 1ª EXPERIENCIA

IRRADIACION CON 200 KRAD Y CONSERVACION A DOS TEMPERATURAS

28 dias después de la irradiación

		A + 2°C	A + 8-10°C
Recuento de la microflora total	Aerobios	6.4 ⁽¹⁾	8.7
	Anaerobios	3.2	5.1
	Psicrófilos	6.2	7.6
Pruebas bioquímicas	SH ₂	2.1	4.2
	Indol	---	2
	NH ₃	---	1
Coliformes		2.2	4.5
Clostridium sulfito-reductores		---	---
Prueba de Makenzie		---	1.2
Enterococos		---	2.
Enterobacteriáceas		0	0
Estafilococos (Baird-Parker)		< 2	< 2

(1) Resultados expresados en log 10 del número de microorganismos por gramo.

T A B L A II : RESULTADOS DE LA 2ª EXPERIENCIA
 APLICACION DE DIFERENTES DOSIS DE IRRADIACION A MUESTRAS
 EMPAQUETADAS CON POLIETILENO

24 días después de la irradiación

		100 Krad	200 Krad
Recuento de la microflora total	Aerobios	6.3 ⁽¹⁾	5.4
	Anaerobios	2.8	2.2
	Psicrófilos	6.1.	5.2
Pruebas bioquímicas	SH ₂	1	---
	Indol	---	---
	NH ₃	---	---
Coliformes		1.2	---
Prueba de Makenzie		---	---
Enterococos		1	---
Clostridium sulfito-reductores		---	---
Estafilococos (Baird-Parker)		< 2	< 2

(1) Resultados expresados en log 10 del número de microorganismos por gramo.

T A B L A I I I : RESULTADOS DE LA 3ª EXPERIENCIA
 IRRADIACION DE MUESTRAS DE PESCADO EMPAQUETADO EN "RILSAN"
 CERRADAS AL VACIO Y EN ATMOSFERA NORMAL. (100 KRAD)

18 dias después de la irradiación

		Atmósfera normal	Vacío
Recuento de la microflora total	Aerobios	5.5 ⁽¹⁾	5.1
	Anaerobios	2.3	3.3
	Psicrófilos	5.4	5.2
Pruebas bioquímicas	SH ₂	---	---
	Indol	---	---
	NH ₃	---	---
Coliformes		1.3	1.1.
Prueba de Makenzie		---	---
Enterococos		---	---
Clostridium sulfito-reductores		---	---
Estafilococos (Baird-Parker)		< 2	< 2

(1) Resultados expresados en log 10 del número de microorganismos por gramo.

T A B L A IV : RESULTADOS DE LA 4ª EXPERIENCIA
 IRRADIACION DE MUESTRAS DE PESCADO EMPAQUETADAS EN "RILSAN"
 Y POLIETILENO (100 KRAD)
 25 dias post-irradiación

		"Rilsan"	Poliétileno
Recuento de la microflora total	Aerobios	5.1	6.2
	Anaerobios	2.1	2.5
	Psicrófilos	4.8	5.4
Pruebas bioquímicas	SH ₂	1	2
	Indol	---	---
	NH ₃	---	---
Coliformes		1.6	2.8
Prueba de Makenzie		---	---
Enterococos		---	1
Clostridium sulfito-reductores		---	---
Estafilicocos (Baird-Parker)		< 2	< 2

(1) Resultados expresados en log 10 del número de microorganismos por gramo.

T A B L A V : RESULTADOS DE LA 5ª EXPERIENCIA
 APLICACION DE DOSIS DE 50 y 100 KRAD A FILETES DE PESCADO

21 días después de la irradiación

Muestras cerradas en atmósfera normal

		50 Krad	100 Krad
Recuento	Aerobios	6.1 (1)	5.3
de la	Anaerobios	2.2	1.7
microflora	Psicrófilos	6	5
total			
Pruebas bioquímicas	SH ₂	1	---
	Indol	---	---
	NH ₃	---	---
Coliformes		2.1	1.8
Prueba de Makenzie		---	---
Enterococos		1	1
Clostridium sulfito-reductores		---	---
Salmonellas y Enterobacteriá- ceas		---	---

(1) Resultados expresados en log 10 del número de microorganismos por gramo.

T A B L A VI : RESULTADOS DE LA 6ª EXPERIENCIA
APLICACION DE DOSIS DE 50 y 100 KRAD A FILETES DE PESCADO
EN BOLSAS CERRADAS AL VACIO A + 2°C.

23 dias después de la irradiación

Composición cuantitativa de la microflora

	<u>50 Krad</u>	<u>100 Krad</u>
Pseudomonas	11	7
Achromobacter	5	3
Flavobacterias	2	1
Corynebacterias	7	9
Micrococcos	6	8
Sarcinas	3	2
Lactobacilos	57	62
Bacilos	1	--
Aeromonas	7	8
E. coli	--	--
Proteus	--	--
Enterobacteriáceas	--	--
Varios	1	--

T A B L A VII : RESULTADOS DE LA 7ª EXPERIENCIA

IRRADIACION DE MERLUZA CAPTURADA EN PESCA DE ALTURA (VERTICAL
DEL PUNTO "ROCA" DE PORTUGAL)

Muestras cerradas en atmósfera normal

Composición cuantitativa de la microflora a los 22 días
post- irradiación

	<u>50 Krad</u>	<u>100 Krad</u>
Pseudomonas	5	6
Achromobacter -.....	56	59
Flavobacterias	4	6
Corynebacterias	21	17
Micrococos	8	7
Sarcinas	1	3
Lactobacilos	2	1
Bacilos	--	--
Aeromonas	1	--
E. coli	--	--
Proteus	1	--
Enterobacteriáceas	--	--
Varios	1	1

T A B L A V I I I : R E S U L T A D O S D E L A 8ª E X P E R I E N C I A
I R R A D I A C I O N D E M E R L U Z A P R O C E D E N T E D E P E S C A D E A L T U R A E N E L
C A N T A B R I C O

Filetes empaquetados en bolsas al vacío

Composición cuantitativa (%) de la microflora a los 21 días
post - irradiación

	<u>50 Krad</u>	<u>100 Krad</u>
Pseudomonas	9	6
Achromobacter	10	13
Flavobacterias	3	1
Corynebacterium	8	6
Micrococos	7	5
Sarcinas	1	--
Lactobacilos	54	61
Bacilos	--	1
Aeromonas	6	7
E. coli.....	--	--
Proteus	--	--
Enterobacteriáceas	--	--
Varios	2	--

T A B L A IX : RESULTADOS DE LA 9ª EXPERIENCIA :
IRRADIACION DE MERLUZA CAPTURADA EN LA PLATAFORMA CONTI-
NENTAL A LA ALTURA DEL LIMITE DE LA FRONTERA CON PORTUGAL

Muestras cerradas en atmósfera normal

Composición cuantitativa (%) de la microflora a los 20 días
después de la irradiación

	<u>50 Krad</u>	<u>100 Krad</u>
Pseudomonas	7	5
Achromobacter	59	62
Flavobacterias	3	1
Corynebacterium	12	15
Micrococcos	7	9
Sarcinas	2	3
Lactobacilos	5	2
Bacilos	1	1
E. Coli	1	--
Proteus	1	--
Enterobacteriáceas	--	--
Varios	2	2

T A B L A X : RESULTADOS DE LA 10ª EXPERIENCIA
IRRADIACION DE MERLUZA CAPTURADA EN LA PROXIMIDAD COSTERA
(DESEMBOCADURA DEL MIÑO)

Muestras empaquetadas en bolsas al vacfo

Composición cuantitativa (%) de la microflora a los 23 dias
después de la irradiación

	<u>50 Krad</u>	<u>100 Krad</u>
Pseudomonas	4	6
Achromobacter	13	11
Flavobacterium	2	3
Corynebacterium	1	5
Micrococcos	8	10
Sarcinas	--	1
Lactobacilos	55	61
Bacilos	2	--
Aeromonas	9	2
E. Coli	1	--
Proteus	2	--
Enterobacteriáceas.....	1	--
Varios	2	1

T A B L A XI : RESULTADOS DE LA 11ª EXPERIENCIA

1ª IRRADIACION COMPARATIVA DE "MERLUCIUS MERLUCIUS" (MERLUZA)
Y "LEPIDORHOMBUS BOSCHII" (GALLOS)

27 días después de la irradiación con 100 Kilorads

		Merluza	Gallos
Recuento de la microflora total	Aerobios	5.8 (1)	6.1
	Anaerobios	2.2	3.
	Psicrófilos	5.4	5.8
Pruebas bioquímicas	SH ₂	2	1
	Indol	1	—
	NH ₃	—	—
Coliformes		2.4	1
Clostridium sulfito-reductores		—	—
Prueba de Makenzie		—	—
Enterococos		2.	1.
Estafilococos (Baird-Parker)		< 2	< 2

(1) Resultados expresados en log 10 del número de microorganismos por gramo.

T A B L A X I I : R E S U L T A D O S D E L A 1 2 ª E X P E R I E N C I A

2ª IRRADIACION COMPARATIVA DE "MERLUCIUS MERLUCIUS" (MERLUZA)
Y "LEPIDORHOMBUS BOSCHII" (GALLOS)

23 días después de la irradiación con 100 Krad

Muestras empaquetadas en atmósfera normal

Composición cuantitativa de la microflora (%)

	<u>Merluza</u>	<u>Gallos</u>
Pseudomonas	4	6
Achromobacter	63	41
Flavobacterias	2	3
Coryneformes	10	32
Micrococos	5	7
Sarcinas	4	3
Lacotobacilos	6	5
Bacilos	2	1
Proteus	1	--
E. coli	--	--
Enterobacteriáceas	--	--
Varios	3	2

T A B L A XIII : RESULTADOS DE LA 13ª EXPERIENCIA
3ª SERIE DE IRRADIACIONES DE "MERLUCIUS MERLUCIUS" (MERLUZA)
Y "LEPIDORHOMBUS BOSCI" (GALLOS)

Muestras cerradas al vacío 25 días post-irradiación con 100 Krad

		Merluza	Gallos
Recuento de la microflora total	Aerobios	5.1 ⁽¹⁾	5.7
	Anaerobios	2	1.8
	Psicrófilos	5.	5.1
Pruebas Bioquímicas	SH ₂	2	1
	Indol	—	1
	NH ₃	—	—
Coliformes		2.1	1.3
Prueba de Makenzie		—	—
Enterococos		1	1
Clostridium sulfito-reductores		—	—
Estafilococos (Baird-Parker)		< 2	< 2

(1) Resultados expresados en log 10 del número de microorganismos por gramo.

T A B L A X I V : RESULTADOS DE LA 14ª EXPERIENCIA

4ª SERIE DE IRRADIACIONES DE "MERLUCIUS MERLUCIUS" (MERLUZA)
Y "LEPIDORHOMBUS BOSCHII" (GALLOS)

28 días después de las irradiaciones con 100 Krad

Muestras cerradas al vacío

Composición cuantitativa de la microflora (%)

	<u>Merluza</u>	<u>Gallos</u>
Pseudomonas	8	10
Achromobacter	13	9
Flavobacterias	—	1
Coryneformes	5	21
Micrococcos	3	1
Sarcinas	2	1
Lactobacilos	59	50
Bacilos	—	—
Escherichia coli	—	—
Aeromonas	8	7
Proteus	1	—
Enterobacteriáceas	—	—
Varios	1	

4. EXPERIENCIAS REALIZADAS EN 1971

4. EXPERIENCIAS REALIZADAS DESDE EL ULTIMO INFORME DE DESARROLLO ENVIADO AL OIEA.

Estas experiencias comprendieron dos series de pruebas con merluza y gallos y tres grupos de ensayos de irradiación de merluza y bacalao, siempre en estado fresco.

4.1. Continuación de las experiencias de irradiación de las especies "Merluccius merluccius" y "Lepidorhombus boscii"

Durante el segundo trimestre del año 1971 se llevaron a cabo dos nuevas experiencias de irradiación de pescado blanco fresco de las indicadas especies: merluza y gallos.

El pescado se transportó en cajas de 40-45 Kg conteniendo 25 Kg de gallos marinos y 15-20 Kg de merluza. Esta llegó en piezas de 4-5 Kg por unidad (aproximadamente) y los gallos en piezas de 500-1000 g.

Los datos facilitados por el proveedor sobre la historia del pescado desde su captura indicaron que la merluza fue capturada por arte de pesca de aparejo y anzuelo en la zona de "Beaques" (Noroeste de la península ibérica), llegando al laboratorio 72 horas después de su captura. Los gallos se pescaron mediante procedimiento de "Arrastre" en la zona del "Gran Sol" invirtiéndose de 4 a 5 días en llegar al Centro de Irradiación.

El pescado fue fileteado con la mayor asepsia posible, obteniéndose en cada envío medio centenar de muestras de merluza y 70 (aproximadamente) de gallos de unos 100 g de peso.

El 50% de las muestras se trataron con polifosfatos para evitar el goteo o exudación de los filetes dentro de las bolsas. El 70% se irradiaron quedando el resto como testigo (sin irradiar). La mayor parte se cerraron en atmósfera normal y el 12% al vacío.

En las dos experiencias citadas la distribución de las muestras en lotes fue la siguiente:

Merluza:

8 paquetes cerrados en atmósfera normal e irradiados con 0'1 Mrad.
8 paquetes " " " " no irradiados (testigo)
2 paquetes " al vacío irradiados con 0'1 Mrad
2 " " " " no irradiados (testigo)
6 paquetes (atmósfera normal) irradiados, tratados con polifosfatos
6 paquetes " " no irradiados " " "
2 " (vacío) irradiados y tratados con polifosfatos
2 " " no irradiados " " "

Se destinaron para las pruebas de inoculación artificial de esporos del Cl. botulinum, tipo E, 16 paquetes todos ellos cerrados en atmósfera normal con la siguiente distribución:

4 paquetes irradiados con 0'1 Mrad y tratados con polifosfatos.
4 paquetes no irradiados (testigo) y tratados con polifosfatos
4 paquetes irradiados sin polifosfatos.
4 " no irradiados " "

Todos los paquetes fueron envasados en nylon ll denominado comercialmente "rilsan" recibiendo todas las muestras irradiadas la misma dosis de 0'1 Mrad

Las 70 muestras formadas por filetes de gallos fueron distribuidas similarmente.

Como testigos en congelación se reservaron un total de 6 filetes, de los cuales 4 se cerraron en bolsas con atmósfera normal y dos al vacío.

Las muestras tratadas con polifosfatos se sumergieron antes de ser envasadas en una solución al 3% del producto comercial denominado "TARIF TF". al que se añadió el 1% de cloruro sódico.

Los resultados obtenidos de las siembras del macerado muscular de ambas especies de pescado, antes de la irradiación (nivel de contaminación inicial) y de las pruebas de control, se indican en las tablas XV a XXII.

En la Sección Veterinaria de la Escuela Nacional de Sanidad se realizaron inoculaciones artificiales de esporos del Cl. botulinum, tipo E, a filetes de merluza a las concentraciones de 10^4 y 10^6 esporos/gramo de pescado, cuyos ensayos se detallan más adelante.

4.2. Experiencias de irradiación de "Merlucius merlucius" y "Gadus morhua".

Siguiendo una sistemática similar a las anteriores experiencias se filetearon las piezas recibidas de merluza y bacalao obteniéndose los lotes que a continuación se indican:

Bacalao:

16	muestras	(atmósfera normal)	irradiadas	con	0'1 Mrad
10	"	"	"	"	no irradiadas (testigo)
9	"	(al vacío)	e irradiadas	con	0'1 Mrad
4	"	(" ")no irradiadas	(testigo)	
12	"	(atmósfera normal y polifosfatos)	irradiadas		
6	"	(" " " " " ")	no irradiadas		
5	"	(al vacío y polifosfatos)	irradiadas		
5	"	(" " " " " ")	no irradiadas		

En congelación y para análisis comparativos se conservaron:

10	muestras	cerradas	en	atmósfera	normal
10	"	"	"	al	vacío

Los resultados de estas tres experiencias últimas se reflejan en las tablas XXII a XXXIV.

4.3. Ensayos de inoculación artificial de filetes de pescado con esporos del *Clostridium botulinum*, tipo E.

Estas pruebas fueron llevadas a cabo aplicando las técnicas descritas en el apartado 2.4. utilizando cuatro remesas de pescado, dos inoculando filetes de merluza fresca y otras dos inyectando simultáneamente dichos esporos a filetes de bacalao y merluza siempre frescos.

Teniendo en cuenta que la producción de la toxina botulínica, tipo E, en el pescado irradiado puede ser influida por varios parámetros, se han ensayado como más importantes los siguientes:

- 1) Dosis de irradiación
- 2) Distintos niveles de contaminación artificial (concentración de esporos)
- 3) Materiales plásticos de envasado
- 4) Diferentes temperaturas de conservación
- 5) Tratamiento con sales minerales (polifosfatos)
- 6) Condiciones de irradiación.

Vamos a resumir la forma en que se han probado estas variables.

1) Dosis de irradiación

Aunque la dosis de 100 Krad se ha mostrada la más adecuada en nuestras experiencias, para prolongar la vida comercial del pescado irradiado un tiempo mínimo justificable con perspectivas para la industrialización del proceso, también se ha ensayado la dosis de 200 kilorads con objeto de conseguir más larga conservación.

2) Concentraciones de esporos

En las dos primeras series de inoculaciones las concen-

tración de esporos fue de 10^4 y 10^6 esporos/gramo de pescado y en las dos últimas se utilizó únicamente la concentración de 10^6 esporos/gramo. Estas concentraciones de la suspensión de esporos inyectada supone un gran margen de seguridad en los estudios realizados, ya que son muy superiores a las posibles contaminaciones naturales que se estiman por la mayor parte de los investigadores que son del orden de 0'17 esporos por 10 gramos de pescado, en las zonas donde se han hallado dichos microorganismos.

3) Materiales plásticos de envasado

Se ha empleado en la mayoría de las muestras ensayadas el nylon denominado comercialmente "rilsan" y en algunas pruebas los filetes han sido empaquetados en polietileno, para así ensayar el efecto de los envases permeables a los gases.

4) Diferentes temperaturas de conservación

Las temperaturas a que han estado sometidas las muestras han sido: de refrigeración a $+3-4^{\circ}\text{C}$, a 12°C y a temperatura ambiente de $22-24^{\circ}\text{C}$.

5) Tratamiento con polifosfatos

Se ha empleado el producto comercialmente denominado "TARI-TF-5" que está constituido por una mezcla de polifosfatos. El procedimiento seguido ha sido el mismo que en las demás experiencias es decir por inmersión.

6) Condiciones de irradiación

El mayor número de muestras (70% aproximadamente) han sido irradiadas en atmósfera normal y el resto en bolsas cerradas al vacío.

Durante las irradiaciones los paquetes se protegieron de dobles bolsas de plástico para prevenir roturas evitan-

do posibles contaminaciones accidentales.

4.3.1. Inoculación de esporos de *Cl. botulinum* a muestras de merluza .

A partir de las suspensiones de esporos conteniendo 2.5×10^5 esporos/ml y 5×10^7 esporos/ml se han efectuado dos series de inoculaciones artificiales en filetes de merluza a unas concentraciones de 10^4 y 10^6 esporos/g. de pescado.

Para llevar a cabo la primera de estas experiencias se inyectaron en cada filete de 50 g de merluza 2 ml de la suspensión de esporos conteniendo 2.5×10^5 esporos/ml, obteniéndose por consiguiente una concentración de 10^4 esporos/g de pescado (500.000 esporos por filete).

Los lotes de muestras fueron los siguientes:

- 1) Muestras inoculadas e irradiadas con 100 Krad
- 2) " " " " " 200 "
- 3) " inoculadas (testigo) no irradiadas
- 4) " inoculadas tratadas con polifosfatos e irradiadas con 100 Krad
- 5) " tratadas con polifosfatos inoculadas e irradiadas con 200 Krad.
- 6) " tratadas con polifosfatos, inoculadas (testigo) sin irradiar.

En la segunda de estas series de inoculaciones se siguió la misma sistemática, cambiando únicamente la concentración de esporos que se realizó a partir de la suspensión que contenía 5×10^7 esporos/ml., por lo que se inoculó en cada filete de 50 g, 1 ml para así conseguir el nivel de 10^6 esporos/g de pescado.

Todas las muestras fueron envasadas en "rilsan" y cerradas en atmósfera normal. La temperatura de conservación

fue de 3-4°C.

Los recuentos de gérmenes y pruebas de control realizadas semanalmente mostraron que en las condiciones ensayadas no se había producido toxina en los filetes inoculados irradiados y testigo (no irradiados), durante el periodo de tiempo comprendido en la vida comercial del pescado, mientras que en los cultivos sembrados simultáneamente, sí se pudo detectar la presencia de toxina puesta de manifiesto mediante las pruebas de inoculaciones intraperitoneales a ratones no protegidos y protegidos con el suero antituberculínico correspondiente.

4.3.2. Contaminación artificial simultánea de filetes de merluza y bacalao frescos con elevadas concentraciones de esporos del *Cl. botulinum*, tipo E.

Estos ensayos comprendieron dos series de inoculaciones de filetes de ambas especies en las que se utilizó la suspensión de esporos conteniendo 5×10^7 esporos/ml, correspondiendo las muestras a las dos últimas experiencias de irradiación de las mismas especies.

En la primera serie de dichas inoculaciones se empleó además de la temperatura de refrigeración de 3-4°C, la temperatura ambiente de $22^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ y en la segunda el 50% de las muestras fue conservado a $12^{\circ} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

Los lotes de muestras formados fueron los siguientes:

- 1) Muestras inoculadas, introducidas en bolsas de "rilsan", cerradas en atmósfera normal e irradiadas con 100 Krad.
- 2) Idem de Idem irradiadas con 200 Krad
- 3) Idem de Idem no irradiadas (testigo)
- 4), 5) y 6) Las mismas características y condiciones pero previamente tratadas con polifosfatos
- 7), 8), 9), 10), 11) y 12) Lotes de muestras en las mismas condiciones excepto que fueron soldadas las bolsas al

vacío.

13), 14) y 15) Muestras inoculadas, introducidas en bolsas de polietileno, respectivamente irradiadas con 100, 200 Krad y no irradiadas (testigo).

Con objeto de poder efectuar los análisis semanales de control de tan elevado número de muestras, las pruebas se realizaron escalonadamente por grupos de lotes, manteniendo las restantes muestras en congelación hasta el día de los ensayos en que fueron descongeladas antes de las inoculaciones y consiguientes tratamientos.

Los resultados de todas estas series de pruebas muestran en su conjunto una vez más que, en condiciones normales y a pesar de lo elevado de las concentraciones de esporos, no se ha podido detectar la presencia de toxina en la casi totalidad de los filetes inoculados de las dos especies ensayadas, mediante la inyección intraperitoneal a pares de ratones no protegidos y protegidos con el suero antibotulínico, tipo E, durante el periodo de tiempo de la vida comercial del pescado, a temperaturas de refrigeración de 3-4°C y envasados en "rilsan" (impermeable a los gases).

Por el contrario, en las muestras inoculadas y empaquetadas en bolsas de polietileno comercial (permeable a los gases) y conservadas a temperatura de 12°C la presencia de toxina pudo ser demostrada por la prueba antes indicada en la mayoría de los casos.

En las muestras conservadas a temperatura ambiente de $22 \pm 5^\circ\text{C}$., la escasa duración del periodo de tiempo de la vida comercial no permitió la formación de la toxina en las muestras testigo e irradiadas con 100 Krad presentándose algunos casos positivos en las irradiadas con 200 Krad.

A continuación se relacionan los lotes de muestras con sus respectivos resultados,

PRODUCCION DE TOXINA POR EL CLOSTRIDIUM BOTULINUM, TIPO E

MUESTRAS EMPAQUETADAS EN ATMOSFERA NORMAL

=====

Inoculación de muestras envasadas en "rilsan" (impermeable a los gases) y almacenadas a 12°C.

=====

Concentración de la inoculación = 10⁴ esporos/gramo de pescado:

	<u>Dosis de irradiación (Krad)</u>		
	<u>0</u>	<u>100</u>	<u>200</u>
<u>Pescado:</u>	<u>Primera detección de toxina</u>		
Merluza	---	---	3 ^a semana
Bacalao	---	2 ^a semana	2 ^a "

Concentración de la inoculación = 10⁶ esporos/gramo de pescado:

	<u>Dosis de irradiación (Krad)</u>		
	<u>0</u>	<u>100</u>	<u>200</u>
<u>Pescado:</u>	<u>Primera detección de toxina</u>		
Merluza	---	3 ^a semana	2 ^a semana
Bacalao	---	2 ^a "	2 ^a "

Inoculación de muestras envasadas en "polietileno" (permeable a los gases) y almacenadas a 12°C.

=====

Concentración de la inoculación = 10⁴ esporos/gramo de pescado:

	<u>Dosis de irradiación (Krad)</u>		
	<u>0</u>	<u>100</u>	<u>200</u>
<u>Pescado:</u>	<u>Primera detección de toxina</u>		
Merluza	----	3 ^a semana	2 ^a semana
Bacalao	----	2 ^a "	2 ^a "

Concentración de la inoculación = 10⁶ esporos/gramo de pescado:

	<u>Dosis de irradiación (Krad)</u>		
	<u>0</u>	<u>100</u>	<u>200</u>
<u>Pescado:</u>	<u>Primera detección de toxina</u>		
Merluza	---	2 ^a semana	2 ^a semana
Bacalao	1 ^a semana	1 ^a "	1 ^a "

PRODUCCION DE TOXINA POR EL CLOSTRIDIUM BOTULINUM, TIPO E

MUESTRAS EMPAQUETADAS AL VACIO

=====

Inoculación de muestras empaquetadas en "rilsan" (impermeable a los gases) y almacenadas a 12°C.

=====

Concentración de la inoculación = 10⁴ esporos/gramo de pescado

	<u>Dosis de irradiación (Krad)</u>		
	<u>0</u>	<u>100</u>	<u>200</u>
<u>Pescado:</u>	<u>Primera detección de toxina</u>		
Merluza.....		3ª semana	3ª semana
Bacalao		2ª "	2ª "

Concentración de la inoculación = 10⁶ esporos/gramo de pescado

	<u>Dosis de irradiación (Krad)</u>		
	<u>0</u>	<u>100</u>	<u>200</u>
<u>Pescado:</u>	<u>Primera detección de toxina</u>		
Merluza		3ª semana	3ª semana
Bacalao	1ª	1ª "	2ª "

T A B L A XV : RESULTADOS DE LA 15ª EXPERIENCIA
 5ª IRRADIACION COMPARATIVA DE "MERLUCIUS MERLUCIUS" (MERLUZA)
 Y "LEPIDORHOMBUS BOSCI" (GALLOS)

Nivel de contaminación inicial

		Gallos	Merluza
Recuento de la microflora total	Aerobios	3,1 ⁽¹⁾	2,3
	Anaerobios	1,8	1,1
	Psicrófilos	3.	2,1
Pruebas bioquímicas	SH ₂	1	—
	Indol	—	—
	NH ₃	—	—
Coliformes		1	1
Prueba de Makenzie		—	—
Clostridium sulfito-reductores		—	—
Enterococos		1	1

(1) Resultados expresados en log 10 del número de microorganismos por gramo.

T A B L A X V I : RESULTADOS DE LA 15ª EXPERIENCIA
 5ª IRRADIACION COMPARATIVA DE "MERLUCIUS MERLUCIUS" (MERLUZA)
 Y "LEPIDORHOMBUS BOSCHII" (GALLOS)

24 días después de la irradiación

100 Krad

		Gallos	Merluza
Recuento de la microflora	Mesófilos	6.1 ⁽¹⁾	5.8
	psicrófilos	5.7	5.2
Pruebas bioquímicas	SH ₂	2	1
	Indol	---	---
	NH ₃	---	---
Coliformes		2.1	2.8
Prueba de Makenzie		---	---
Enterococos		---	1
Clostridium sulfito-reductores		---	---
Estafilococos (Baird-Parker)		< 2	< 2

(1) Resultados expresados en log 10 del número de microorganismos por gramo.

T A B L A XVII : RESULTADOS DE LA 15ª EXPERIENCIA
5ª IRRADIACION COMPARATIVA DE "MERLUCIUS MERLUCIUS" (MERLUZA)
Y "LEPIDORHOMBUS BOSCHII" (GALLOS)

Muestras cerradas en atmósfera normal e irradiadas con 100 Krad
Composición cuantitativa de la microflora (%) a los 24 días
post - irradiación

	<u>Gallos</u>	<u>Merluza</u>
Pseudomonas	7	5
Achromobacter	48	57
Flavobacterias	2	1
Corynebacterias	31	13
Micrococcos	4	9
Sarcinas	2	3
Lactobacilos	3	2
Bacilos	--	--
Aeromonas	1	2
E. coli	--	--
Proteus	--	1
Enterobacteriáceas	--	4
Varios	2	3

T A B L A XVIII : RESULTADOS DE LA 16ª EXPERIENCIA
6ª SERIE DE IRRADIACIONES DE MERLUZA Y GALLOS FRESCOS

Nivel de contaminación inicial

		Merluza	Gallos
Microflora total	Mesófilos	2.5 ⁽¹⁾	3.2
	Psicrófilos	2	3.1
Pruebas bioquímicas	SH ₂	---	1
	Indol	---	---
	NH ₃	---	---
Coliformes		1.5	1
Prueba de Makenzie		---	---
Enterococos		---	---
Clostridium sulfito-reductores		---	---

(1) Resultados expresados en log 10 del número de microorganismos por gramo.

T A B L A X I X : RESULTADOS DE LA 16ª EXPERIENCIA
 6ª SERIE DE IRRADIACIONES DE MERLUZA Y GALLOS FRESCOS

27 días después de la irradiación con 100 kilorads

Muestras empaquetadas al vacío

		Merluza	Gallos
Recuento de la microflora total	Aerobios	5.9 (1)	6.2
	Anaerobios	4.1	4.3
	Psicrófilos	3.8	3.5
Pruebas bioquímicas	SII ₂	2	2
	Indol	—	—
	NH ₃	—	—
Coliformes		2.5	2.3
Prueba de Makenzie		—	—
Enterococos		1	—
Clostridium sulfito-reductores		—	—
Estafilococos (Baird-Parker)			

(1) Resultados expresados en log 10 del número de microorganismos por gramo.

T A B L A XX : RESULTADOS DE LA 16ª EXPERIENCIA

6ª IRRADIACION COMPARATIVA DE MERLUZA Y GALLOS FRESCOS

MUESTRAS CERRADAS AL VACIO, TRATADAS CON POLIFOSFATOS

E IRRADIADAS CON 100 KRAD

Composición cuantitativa de la microflora (%) después de
transcurridos los 27 días de la irradiación

	<u>Gallos</u>	<u>Merluza</u>
Pseudomonas	8	5
Achromobacter	10	9
Flavobacterias	2	1
Corynobacterias	11	7
Micrococcos	5	3
Sarcinas	2	4
Lactobacilos	55	63
Bacilos	2	1
Aeromonas	4	6
E. coli	--	--
Proteus	--	--
Enterobacteriáceas	1	--
Varios	--	1

T A B L A XXI : RESULTADOS DE LA 17ª EXPERIENCIA
1ª SERIE DE IRRADIACIONES DE "GADUS MORHUA" (BACALAO) Y
DE "MERLUCIUS MERLUCIUS" (MERLUZA)

Indice de contaminación inicial

		Bacalao	Merluza
Microflora total	Mesófilos	3.1 ⁽¹⁾	2.7
	Psicrófilos	3	2.2
Pruebas bioquímicas	SH ₂	1	1
	Indol	---	---
	NH ₃	---	---
Coliformes		1.1	1.4
Escherichia coli I		---	---
Enterococos		---	---
Clostridium sulfito-reductores		---	---

(1) Resultados expresados en log 10 del número de microorganismos viables por gramo.

T A B L A XXII: RESULTADOS DE LA 17ª EXPERIENCIA

1ª SERIE DE IRRADIACIONES DE BACALAO Y MERLUZA FRESCOS

28 días después de la irradiación con 100 kilorads

Muestras empaquetadas en atmósfera normal

		Bacalao	Merluza
Recuento de la microflora total	Aerobios	6.5 ⁽¹⁾	6.2
	Anaerobios	2.2	2.1
	Psicrófilos	5.	5.2
Pruebas bioquímicas	SH ₂	2	2
	Indol	---	---
	NH ₃	---	---
Coliformes		2.3	2.7
Escherichia coli I		---	---
Enterococos		---	1
Cl. sulfito - reductores		---	---
Estafilicocos (Baird-Parker)		< 2	< 2

(1) Resultados expresados en log 10 del número de microorganismos por gramo.

T A B L A XXIII : RESULTADOS DE LA 17ª EXPERIENCIA

1ª SERIE DE IRRADIACIONES DE FILETES DE BACALAO Y MERLUZA

26 días después de la irradiación con 100 kilorads

Muestras cerradas en atmósfera normal

Composición cuantitativa de la microflora (%)

	<u>Bacalao</u>	<u>Merluza</u>
Pseudomonas	11	7
Achromobacter	44	53
Flavobacterias	3	2
Coryneformes	31	15
Micrococcos	3	8
Sarcinas	2	5
Lactobacillus	2	3
Bacillus	1	2
Aeromonas	1	1
E. coli	--	--
Proteus	--	--
Enterobacteriáceas	1	3
Varios	1	1

T A B L A XXIV : RESULTADOS DE LA 18ª EXPERIENCIA :

2ª SERIE DE IRRADIACIONES DE FILETES DE BACALAO Y MERLUZA

Indice de contaminación inicial.

		Bacalao	Merluza
Microflora total	Mesófilos	3.3.	3
	Psicrófilos	3.1	2.8
Fructas bioquímicas	SH ₂	1	1
	Indol	--	--
	NH ₃	--	--
Coliformes		1.1	1.3
Escherichia coli I		--	--
Enterococos		--	--
Clostridium sulfito-reductores		--	--

T A B L A X V : RESULTADOS DE LA 18ª EXPERIENCIA

2ª SERIE DE IRRADIACIONES DE FILETES DE BACALAO Y MERLUZA

24 días después de la irradiación con 100 Krad

Muestras cerradas al vacío

		Bacalao	Merluza
Recuento de la microflora total	Aerobios	6.2 ⁽¹⁾	5.7
	Anaerobios	2	2.1
	Psicrófilos	5.6	5.1
Pruebas bioquímicas	SH ₂	1	1
	Indol	---	---
	NH ₃	---	---
Coliformes		2.1	3.
Escherichia coli		---	---
Enterococos		---	1
Clostridium sulfito-reductores		---	---
Estafilococos (Baird-Parker)		< 2	< 2

(1) Resultados expresados en log 10 del número de microorganismos por gramo.

T A B L A XXVI : RESULTADOS DE LA 18ª EXPERIENCIA

2ª SERIE DE IRRADIACIONES DE FILETES DE BACALAO Y MERLUZA

25 días después de la irradiación con 100 Krad

Muestras cerradas al vacío

Composición cuantitativa de la microflora (%)

	<u>Bacalao</u>	<u>Merluza</u>
Pseudomonas	3	5
Achromobacter	14	9
Flavobacterias	1	3
Coryneformes.....	8	4
Micrococcos.....	3	2
Sarcinas	1	3
Lactobacilos	59	63
Bacillus	1	3
Aeromonas	6	5
E. coli I	—	—
Proteus	—	—
Enterobacteriáceas	3	1
Varios	1	2

T A B L A XXVII : RESULTADOS DE LA 19ª EXPERIENCIA
 3ª SERIE DE IRRADIACIONES DE FILETES DE BACALAO Y MERLUZA

Indice de contaminación inicial

		Bacalao	Merluza
Microflora total	Mesófilos	3.5 ⁽¹⁾	2.9
	Psicrófilas	3.2	2.6
Pruebas bioquímicas	Sii ₂	1	1
	Indol	—	—
	NH ₃	—	—
Coliformes		1.2	1.4
Escherichia coli I		—	—
Enterococos		—	—

(1) Resultados expresados en log 10 del número de microorganismos viables por gramo

T A B L A XXVIII : RESULTADOS DE LA 19ª EXPERIENCIA
 3ª SERIE DE IRRADIACIONES DE FILETES DE BACALAO Y MERLUZA
 MUESTRAS CERRADAS EN ATMOSFERA NORMAL Y TRATADAS CON POLI-
 FOSFATOS

25 días después de la irradiación con 100 Krad

		Bacalao	Merluza
Recuento de la microflora total	Aerobios	5.2 (1)	5.3
	Anaerobios	2.1	2
	Psicrófilos	5	5
Pruebas bioquímicas	SH ₂	2	2
	Indol	—	—
	NH ₃	—	—
Coliformes		2.3	2.5
Escherichia coli I		—	—
Enterococos		—	1
Clostridium sulfito-reductores		—	—

(1) Resultados expresados en log 10 del número de microorganismos viables por gramo

T A B L A XXIX : RESULTADOS DE LA 19ª EXPERIENCIA
3ª SERIE DE IRRADIACIONES DE FILETES DE BACALAO Y MERLUZA
MUESTRAS CERRADAS EN ATMOSFERA NORMAL Y TRATADAS CON POLI-
FOSFATOS

25 días después de la irradiación con 100 Krad

Composición cuantitativa de la microflora (%)

	<u>Bacalao</u>	<u>Merluza</u>
Pseudomonas	8	5
Achromobacter	41	49
Flavobacterias	1	3
Coryneformes	35	13
Micrococcos	6	9
Sarcinas	2	5
Lactobacilos	2	1
Bacillus	1	3
Aeromonas	3	2
E. coli	—	—
Proteus	—	—
Enterobacteriáceas	—	7
Varios	1	3

5. DISCUSION DE RESULTADOS

Las experiencias de irradiación realizadas con "Merlucius merlucius" (merluza), "Lepidorhobus boschii" (gallos) y "Gadus morhua" (bacalao), han facilitado la obtención de importantes datos comparativos que amplian nuestros conocimientos sobre los efectos bactericidas de las radiaciones ionizantes en las muestras de pescado blanco ensayado y por consiguiente sobre la prolongación de su vida comercial.

Las diferencias encontradas en el transcurso de las experiencias desde el punto de vista microbiológico principalmente han sido las siguientes:

- En el aspecto cuantitativo, la carga microbiana total en los filetes de gallos y bacalao han sido mayor que en los de merluza. Este hecho puede ser consecuencia de que las capturas de los primeros se efectúa en general, más alejada de la costa (pesca de altura "Gran Sol"), que las de merluza, realizada en las proximidades del litoral y en la plataforma continental de la región Noroeste de nuestra península.

- En los análisis cualitativos de la microflora típica y de contaminación, las diferencias han sido bastante significativas. Los gérmenes predominantes de las muestras de merluza fueron los de los géneros Achromobacter-Pseudomonas, mientras que en los filetes de gallos y bacalao se ha encontrado un porcentaje más elevado de microorganismos coryneformes (Corynebacterium, etc.). Las características diferenciales de ambos grupos en el cuadro microbiano de la descomposición de los filetes han determinado cambios en los irradiados con respecto a los testigo. La mayor radioresistencia de los gérmenes Gram positivos ha influido considerablemente en la aparición de un nuevo modelo de microflora residual.

El efecto de las radiaciones en los filetes de merluza se tradujo en la reducción del 90% de las *Pseudomonas*, quedando como gérmenes supervivientes predominantes determinadas estirpes del género *Achromobacter* más radioresistentes con algunos *Micrococcos* y *Sarcinas*, mientras que en los paquetes cerrados al vacío han predominado los *Lactobacillus*, seguidos de *Aeromonas* y pequeñas cantidades de otras especies Gram positivas junto con levaduras radioresistentes que se han podido desarrollar al faltarles la competencia de la microflora típica.

Por el contrario, en las muestras de gallos y bacalao, se han encontrado además de los géneros *Achromobacter* (en bolsas cerradas en atmósfera normal) y *Lactobacillus* (al vacío), grupos importantes de gérmenes coryneformes, que han cambiado en cierta medida, la fisonomía de la microflora residual superviviente, como queda reflejado en las tablas de las distintas experiencias.

Las condiciones ecológicas han influido de forma decisiva sobre el contenido de gérmenes marinos y más aún en los de procedencia terrestre. Por ello, las muestras de merluza (capturadas más próxima a la costa) han mostrado mayor número de gérmenes coliformes y enterococos propios de la contaminación fecal, que los filetes de gallos y bacalao. Es más, dentro de cada especie se ha apreciado también esta influencia según las zonas de captura y profundidad de las aguas. Los gallos y bacalao de mayor tamaño capturados en formas más alejadas y profundas presentaron índices más bajos de contaminación terrestre ya que fueron obtenidos en pesca de altura y arrastre del fondo de grandes profundidades. Todas estas condiciones determinaron cambios de respuesta ante la irradiación y consiguiente extensión de la vida de almacenado.

En relación con las experiencias de inoculación artificial de filetes de merluza y bacalao con diferentes concentraciones de esporos del *Clostridium botulinum*, tipo E, podemos destacar los siguientes hechos:

- Los parámetros que han ejercido mayor influencia en la producción de la toxina botulínica han sido:

- 1) Temperatura de almacenamiento
- 2) Concentración de esporos inoculados por gramo de pescado.
- 3) Especies contaminadas artificialmente
- 4) Dosis de irradiación aplicadas, y condiciones (vacío, etc)

- No se pudo detectar la referida toxina en los filetes inoculados incluso a elevadas concentraciones de esporos del orden de 10^6 esporos/gramo, e irradiados a las dosis de 100 y 200 Krad, siempre que fueron almacenados a temperaturas de refrigeración de $3-4^{\circ}\text{C}$. Ello prueba que la temperatura óptima de crecimiento de estos microorganismos, al menos en la cepa utilizada es superior a la indicada.

Para una misma concentración de esporos y cuando la temperatura se fijó en $12^{\circ} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$., la producción de toxina pudo ser detectada por primera vez en la 1ª, 2ª y 3ª semana de almacenamiento según los casos.

La precocidad en la aparición de la toxina según pudo observarse en la relación de resultados, ha sido mayor en el bacalao que en la merluza, en las muestras empaquetadas al vacío que en las cerradas en atmósfera normal y en las muestras que recibieron más elevada dosis de irradiación (200 Krad).

No se conocen aún las razones por las que unas especies favorecen más que otras la intensidad de producción de la

toxina botulínica. Se sabe, sin embargo, que los enzimas proteolíticos juegan un importante papel en la destrucción de la toxina sobre todo en los filetes no irradiados, así como también la microflora competitiva, ya que rebajan en general el contenido de nutrientes especialmente de carbohidratos indispensables para la formación de la toxina.

La irradiación al destruir la mayoría de los gérmenes vegetativos, evita también la disminución de los hidratos de carbono por los mismos, esencialmente de la ribosa y glucosa, ocasionando, por tanto, condiciones más favorables para la producción de la toxina a medida que aumenta la dosis, reduciéndose, al mismo tiempo, el margen de seguridad existente entre la descomposición del pescado y la producción de dicha toxina.

A pesar de lo indicado, las condiciones experimentales para la producción de la toxina botulínica, requieren concentraciones tan elevadas de esporos que contrastan con las reales de una posible contaminación natural, hasta el punto de que el riesgo potencial de la seguridad para el consumo, puede considerarse con muy escasa probabilidad de presentación.

6. CONCLUSIONES GENERALES

Las conclusiones generales de este informe final son las indicadas en el apartado d de la información solicitada por el O.I.E.A.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean expresar su agradecimiento en primer lugar al Organismo Internacional de Energía Atómica por la concesión de la renovación del Contrato de investigación 731/R2/RB.

A la Junta de Energía Nuclear y en especial a D.R. Fernandez Collini, Director de Química e Isótopos, a D. F. de la Cruz Castillo, Jefe de la División de Química Nuclear, a D. M. del Val Cob, Jefe de la Sección de Isótopos y a D. N. Ortín Suñé, Jefe del Grupo de Aplicaciones, por las facilidades, orientaciones y consejos que hicieron posible la realización de los trabajos.

Al Dr. J. Leboreiro Dobarro, Inspector de Sanidad del Cuerpo Nacional Veterinario y al proveedor de pescado D. J. Mariño Garrido de Vigo, gracias a los cuales se pudo disponer del pescado en condiciones satisfactorias para las experiencias.

