

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



DETERMINACION DEL PERFIL BACTERIOLOGICO DE *Oreochromis niloticus* (TILAPIA) FRESCA Y SU RESPECTIVA AGUA DE ESTANQUE PROVENIENTE DEL CANTON ATIOCOYO, MUNICIPIO DE SAN PABLO TACACHICO, LA LIBERTAD.

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:

MARLIN YANETH ROMERO MONGE

MARIO HERBERT ROMERO RIVERA

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA

SEPTIEMBRE, 2012

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

DRA. ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

SECRETARIO

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO LOPEZ

COMITÉ DE TRABAJO DE GRADUACION

COORDINADORA GENERAL

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

ASESORA DE AREA DE ANALISIS DE ALIMENTOS, MICROBIOLOGIA

MSc. María Evelin Sánchez de Ramos

ASESORA DE AREA DE ANALISIS DE ALIMENTOS Y QUIMICA AGRICOLA

MSc. Ena Edith Herrera Salazar

DOCENTE DIRECTORA

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz

AGRADECIMIENTOS

A Dios todopoderoso por habernos guiado, dándonos espíritu de fortaleza y confianza para lograr nuestros propósitos y así poder culminar exitosamente nuestra carrera.

A nuestros padres quienes sin escatimar esfuerzo alguno sacrificaron gran parte de su vida para educarnos y a lo largo de nuestras vidas nos han apoyado y motivado a nuestra formación académica, creyendo en nosotros en todo momento sin dudar de nuestras habilidades y actitudes.

A nuestra docente directora: MSc. Coralía de los Ángeles González de Díaz, por el desempeño oportuno y eficaz que asumió con responsabilidad al revisar y corregir el trabajo de tesis muchas gracias que Dios la bendiga. Al comité de trabajo de graduación: Coordinadora general, Licda. Odette Rauda, asesoras de área: MSc. María Evelyn Sánchez de Ramos y MSc. Ena Edith Herrera Salazar, por orientarnos a lo largo de la realización de esta investigación, ya que es el resultado del esfuerzo conjunto de todos los que conformamos el grupo de trabajo.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), por prestarnos las instalaciones y permitirnos desarrollar nuestro trabajo de investigación.

A las autoridades del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), por su colaboración técnica y por proporcionarnos las muestras en estudio.

Finalmente un eterno agradecimiento a esta prestigiosa Universidad de El Salvador la cual abrió sus puertas a jóvenes como nosotros, brindándonos la oportunidad de prepararnos para un futuro competitivo y formándonos como profesionales y personas de bien para la sociedad.

Marlín y Mario

DEDICATORIA

A Dios todo poderoso que me dio la oportunidad de vivir y de regalarme una familia maravillosa y por permitirme llegar hasta este punto y haberme dado salud y sabiduría para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

Con mucho cariño y amor principalmente a mis padres que me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento por difícil que haya sido. Gracias por todo queridos y amados padres William Romero y Noris de Romero por darme una carrera para mi futuro y por creer en mi, aunque hemos pasado momentos difíciles siempre han estado apoyándome y brindándome todo su amor y comprensión por todo esto les agradezco de corazón que estén conmigo a mi lado.

A mis hermanos William y Andrea por ser mis amigos incondicionales apoyándome en todo momento, por ayudarme con sus consejos por la confianza que hemos tenido y por siempre apoyarme.

A mis amigos y amigas por sus palabras de aliento y su apoyo en todo momento.

A Mario, mi compañero de tesis. Gracias por tu amistad, apoyo y comprensión.

Marlin Yaneth Romero Monge

DEDICATORIA

A mi padre Dios y a la virgen María por todo lo que me han dado a lo largo de mi vida y por siempre estar ahí cuando más los necesito, por guiarme para poder lograr mis propósitos iluminándome, dándome fuerzas y sabiduría para enfrentar los obstáculos vividos durante este proceso.

En especial a las dos personas a quien debo estar culminando esta etapa de mi vida a mi mamá: María del Rosario Rivera de Romero por siempre querer darme todo lo que está a su alcance y por ser indispensable en mi vida y a mi papá: Mario Herbert Romero Soriano por apoyarme y aconsejarme cuando lo necesito, infinitas gracias a los dos por hacer todo el sacrificio y esfuerzo por verme formado profesionalmente y por darme la mejor herencia que un padre puede dar a un hijo el estudio.

A mi segunda mamá: Angelina Pérez por ser incondicional en mi vida y por siempre cuidarme y a mi hermana Jazmín por siempre ayudarme en lo que pudo, por su amistad y cariño.

A mis amigos y amigas en especial a mi friend Darling por siempre darme esas palabras de ánimo a seguir adelante y por la comprensión que tuvieron.

A mi compañera de tesis Marlín, gracias por su amistad, por el trabajo en armonía y por poner de su parte para cumplir el propósito que nos trazamos.

Mario Herbert Romero Rivera

INDICE

N° de página

Resumen	
Capítulo I	
1.0 Introducción	xxi
Capítulo II	
2.0 Objetivos	23
Capítulo III	
3.0 Marco Teórico	25
3.1 Generalidades de la tilapia	25
3.2 Características biológicas de la tilapia	25
3.2.1 Distribución	25
3.2.2 Genero Oreochromis	26
3.2.3 Hábitos alimenticios	26
3.2.4 Reproducción	26
3.2.5 Caracteres sexuales	29
3.2.6 Anatomía de la tilapia	30
3.3 Calidad e Inocuidad del cultivo de tilapia	31
3.4 Infraestructura de la granja de producción	34
3.5 Tipos de cultivo	35
3.5.1 Cultivo en estanques rústicos	35
3.5.2 Cultivo en corrales jaulas flotantes	36
3.5.3 Cultivo de alta densidad en tanques	36
3.6 Sistemas de cultivo	36
3.6.1 Cultivo extensivo	36
3.6.2 Cultivo semi-intensivo	36

3.6.3 Cultivo intensivo	38
3.7 Higiene del personal	38
3.8 Peligros de origen biológico	
3.8.1 Microorganismos indicadores	41
3.8.2 Bacterias patógenas	45
3.9 Calidad del Agua	46
Capítulo IV	49
4.0 Diseño Metodológico	
4.1 Tipo de estudio	52
4.2 Investigación bibliográfica	52
4.3 Investigación de campo	52
4.3.1 Universo	53
4.3.2 Muestra	53
4.3.3 Muestreo	53
4.3.4 Modelo matemático para el muestreo	54
4.3.5 Instrumentos de recolección	55
4.4 Parte experimental	56
4.4.1 Recolección de muestras	56
4.4.2 Guía de inspección	56
4.5 Preparación de las muestras	59
4.6 Análisis bacteriológico del musculo (carne) y vísceras de la tilapia fresca.	60
4.6.1 Aislamiento e identificación de <i>E. coli</i>	61
4.6.1.1 prueba presuntiva para <i>E. coli</i>	61
4.6.1.2 prueba confirmativa para <i>E. coli</i>	61
4.6.2 Aislamiento e identificación de <i>St. Aureus</i>	62
4.6.2.1 preparación de la dilución 10 ⁻¹	62
4.6.2.2 aislamiento y cuantificación	62
4.6.2.3 prueba de coagulasa	63

4.6.2.4	prueba de catalasa	64
4.6.3	Aislamiento e identificación de <i>Salmonella sp</i>	64
4.6.3.1	Enriquecimiento	64
4.6.3.2	aislamiento e identificación	64
4.6.4	Aislamiento e identificación de <i>Listeria</i>	65
	<i>Monocytogenes</i>	
4.6.4.1	enriquecimiento selectivo	65
4.6.4.2	siembra en medios selectivos e identificación	65
4.6.4.3	pruebas presuntivas: catalasa	66
4.6.4.4	prueba de CAMP	66
4.6.5	Aislamiento e identificación de <i>Vibrio</i>	
	<i>Parahaemolyticus</i>	67
4.6.5.1	Enriquecimiento	67
4.6.5.2	aislamiento e identificación	67
4.6.5.3	prueba de oxidasa	68
4.6.5.4	pruebas bioquímicas	68
4.7	Análisis bacteriológico del Agua del Estanque	68
4.7.1	Determinación de Coliformes Totales	68
4.7.2	Determinación de Coliformes Fecales	69
4.8	Análisis bacteriológico de muestras de manipuladores	69
4.8.1	Recuento de <i>St. Aureus</i>	69
4.8.2	Determinación de <i>E. coli</i>	70
Capítulo V		
5.0	Resultados y Discusión de Resultados	71
Capítulo VI		
6.0	Conclusiones	94

Capítulo VII

7.0 Recomendaciones

97

Bibliografía

Anexos

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

1. Parámetro que determinan la calidad del agua del estanque
2. Análisis bacteriológico realizado a cada muestra en estudio
3. Calculo del tamaño de muestra a partir del software Win Episcopo
4. Probabilidad de diagnosticar al menos un animal como realmente positivo con prevalencia del 30 %
5. Guía de Inspección de inspección para verificar el cumplimiento de las Buenas Practicas Acuicolas (BPA)
6. Procedimiento del Aislamiento e Identificación de ***E.coli***
7. Procedimiento del Aislamiento e Identificación de ***St. Aureus***
8. Procedimiento del Aislamiento e Identificación de ***Salmonella sp***
9. Procedimiento y Resultados de Pruebas Bioquímicas
10. Procedimiento del Aislamiento e Identificación de ***Listeria monocytogenes***
11. Procedimiento del Aislamiento e Identificación de ***Vibrio parahaemolyticus***
12. Procedimiento del Análisis bacteriológico del Agua del estanque
13. Procedimiento de la toma de muestra, Aislamiento e Identificación de ***E.coli*** y ***St. Aureus*** en manos de manipuladores
14. Tablas de valores máximos admisibles en cada una de las determinaciones
15. Tabla para calcular el Numero mas Probable NMP
16. Informe brindado a las autoridades del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG)
17. Ubicación geográfica de Atiocoyo, San Pablo Tacachico, La Libertad

INDICE DE CUADROS

CUADRO N°	N° de pagina
1. Características Reproductivas de la tilapia	29
2. Buenas Practicas Acuicolas	33
3. Critérios microbiológicos para El método de enjuague para el manipulador (manos) según norma del Perú	41
4. Limites máximos de contaminantes microbiológicos permitidos al pescado fresco	48
5. Factores que limitan la proliferación de bacterias patógenas	49
6. Análisis de Aguas Recreacionales	50
7. Resumen del tamaño de muestra	53
8. Resultados de la guía de inspección realizadas a las granjas de cultivo de tilapia del canton Atiocoyo	74
9. Porcentaje de cumplimiento de las buenas practicas acuícolas por granja de cultivo	76
10. Resultados de las determinaciones del manipulador	81
11. Resultados de las determinaciones del agua del estanque	84
12. Resultados de las determinaciones realizadas al músculo y vísceras de la tilapia.	87

INDICE DE FIGURAS

FIGURA Nº	Nº de pagina
1. <i>Oreochromis niloticus</i> macho	30
2. <i>Oreochromis niloticus</i> hembra	30
3. Anatomia de <i>Oreochromis niloticus</i>	30
4. Diagrama de flujo general de producción de tilapia	32
5. Cultivo en estanques rústicos	35
6. Jaulas flotantes en estanques rústicos	35
7. Tanques de alta densidad	36
8. Cultivo extensivo	37
9. Aireadores	37
10. Sistema intensivo	38
11. Método de “cuadricular” el estanque	57
12. Utensilios (redes, atarrayas, baldes) utilizados para Recolectar las tilapias	57
13. Transporte de las tilapias recolectadas	57
14. Recolección de muestra de agua del estanque	58
15. Material utilizado para la toma de muestra del manipulador	58
16. Procedimiento de la toma de muestra del manipulador y transporte de la muestra	59
17. Recolección de datos con la Guía de Inspección	59
18. Extracción de vísceras y carne de las tilapias en estudio	60
19. Preparación de la muestra (dilución 10^{-1})	60
20. Muestra de las manos del manipulador	61
21. Gráfico de las granjas de cultivo de tilapia con su respectivo	77

23. porcentaje de cumplimiento de las Buenas Prácticas Acuícolas.	
22. Infraestructura, Diseño y Construcción de las granjas	78
23. Presencia de animales domésticos, vacas, caballos y aves	79
24. Tecnología (aireadores) y manejo del agua de cultivo	80
25. Pruebas para confirmar presencia de St. Aureus	81
26. Pruebas de confirmación para E. coli	83
27. Toma de muestra del manipulador	83
28. Estanques del cantón Atiocoyo	85
29. Prueba positiva para E. coli en muestras de agua	86
30. Prueba positiva en medio cromocult para E. coli	88
31. 87Crecimiento en medios selectivos Oxford y palcam y prueba de CAMP para Listeria monocytogenes	90
32. Pruebas bioquímicas para Listeria monocytogenes	90
33. Medio selectivo TCBS y prueba oxidasa para Vibrium parahaemolyticus.	93

INDICE DE TABLAS

TABLA Nº	Nº de pagina
1. Seleccion del tamaño de muestra (numero de tilapias) a una determinada prevalência.	56

ABREVIATURAS

Agar VRB	Agar Violet Red Bile lactosa
Agar XLD	Agar Xilosa lisina Desoxicolato
BAM	Manual de Análisis Bacteriológico
BPA	Buenas Prácticas Acuicolas
Caldo RV	Caldo Rappaport Vassilidius
Caldo TT	Caldo Tetratonato
CENSALUD	Centro de Investigación y Desarrollo en Salud
E. coli	Escherichia coli
mos	Microorganismos
Mx	Muestra
NMP/mL	Número Más Probable por mililitro de muestra
NSO	Norma Salvadoreña Obligatoria
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
OMS	Organización Mundial de la Salud
RTCA	Reglamento Técnico Centroamericano
St. aureus	Staphylococcus aureus
sp	Especie
spp	Especies

UFC/g	Unidades Formadoras de Colonias por gramo de muestra.
UFC/manos	Unidades Formadoras de Colonias por manos muestreadas.
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colonias por mililitro de muestra.
MAG	Ministerio de Agricultura y Ganaderia
CENDEPESCA	Dirección de Desarrollo de la Pesca y la Acuicultura

RESUMEN

En El Salvador año con año el cultivo de tilapia aumenta considerablemente convirtiéndose en una fuente de ingreso económico para la población salvadoreña en especial para los habitantes del cantón Atiocoyo, San Pablo Tacachico, en el departamento de La Libertad, quienes se dedican a ello y según datos de Dirección de Desarrollo de la Pesca y la Acuicultura CENDEPESCA son la zona a nivel nacional con mayor producción de tilapia siendo una dificultad de que no hay un estudio que indique cómo está la calidad microbiológica de la tilapia si esta es ó no apta para el consumo humano, por ello con este propósito se determinó el perfil bacteriológico de la (***Oreochromis niloticus***) tilapia fresca y su respectiva agua de estanque proveniente de 10 granjas de Atiocoyo.

El estudio consistió en realizar un diagnostico de las instalaciones de las granjas de cultivo por medio de una guía de inspección basada en las Buenas Practicas Acuícolas en la mayoría de granjas a excepción de la granja N°10 que no cumplen las Buenas Practicas Acuícolas lo que hace que no se implementen los requisitos que esta especifica y que incluyan aspectos para optimizar y garantizar la calidad de la crianza de tilapias, también se determino la presencia de ***Staphylococcus aureus*** y ***Escherichia coli***. En las manos de los manipuladores que están en contacto directo con la tilapia fresca identificándose en 9 de 10 muestras ***Staphylococcus epidermidis*** y ***Escherichia coli*** lo cual indica malas practicas higiénicas de parte de los manipuladores. Se determino que el agua de los estanques tiene cargas bacterianas de Coliformes totales y Coliformes fecales aunque estan dentro de los limites aceptables.

Se investigo en 90 tilapia fresca (carne y vísceras) la presencia de: ***Escherichia coli***, ***Staphylococcus aureus***, ***Salmonella sp***, ***Vibrium***

parahaemolyticus y ***Listeria monocytogenes*** siendo así el 100% de las muestras negativas a la presencia de alguna de estas bacterias, aunque tanto en carne como en vísceras si se logró identificar ***Listeria sp*** y ***Vibrium sp*** en la granja N°3. La bacteria que se identificó en 80 muestras de tilapias fue ***Escherichia coli***, lo cual se le atribuye a que tanto en manipuladores como en el agua hay contaminación de origen fecal por ende en vísceras y carne de tilapia es normal que se encuentre

Todos estos resultados fueron comparados con las respectivas normas para el caso de los manipuladores con la normativa de Perú del Ministerio de Salud para superficies vivas (manos), para el agua del estanque con la normativa de aguas recreacionales Organización Mundial para la Salud OMS y para la tilapia con la normativa del Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08.

Por lo que se recomienda que las granjas de cultivo del cantón Atiocoyo implementen los procedimientos de las Buenas Prácticas Acuícolas e Higiénicas y que realicen estos análisis bacteriológicos a la tilapia y al agua del estanque por lo menos una vez cada año.

Los resultados obtenidos fueron entregados a las autoridades del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) quienes se los darán a conocer a los productores de tilapia del cantón Atiocoyo.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

A nivel nacional la acuicultura a mostrado recientemente un gran desarrollo para cubrir un gran déficit de proteína animal. Los piscicultores señalan a la tilapia como uno de los peces favoritos para la cría, debido a su capacidad para soportar condiciones ambientales adversas y por su facilidad para reproducirse varias veces al año y en grandes cantidades pero para lograr la crianza de tilapias de optima calidad es necesario controlar ciertos parámetros como la higiene de los manipuladores, utensilios que se utilizan en la manipulación para su crianza, el diseño de la infraestructura de la granja y la calidad del agua que se utiliza en la granja.

Actualmente en El Salvador entidades como el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), a través de la Dirección de Desarrollo de la Pesca y la Acuicultura (CENDEPESCA), inauguro el sistema de producción popular de tilapia en el cantón Atiocoyo, con el objetivo de mejorar la dieta alimenticia de la población y promover un desarrollo socioeconómico local, ya que es una buena alternativa para consumo de una carne saludable y con alto porcentaje en nutrientes, tiene buen sabor y buen precio.

Estos antecedentes de explotación y aprovechamiento del cultivo de la tilapia hicieron necesario la realización de un estudio para determinar el perfil bacteriológico de este pez debido a que: a nivel nacional no hay estudios que den referencia sobre la flora patógena e indicadora asociada a la tilapia y en segundo la fuente de agua proviene de las cuencas del río sucio.

El presente estudio se baso en establecer un perfil bacteriológico de las tilapias cultivadas en el cantón Atiocoyo, San Pablo Tacachico, La Libertad, para establecer dicho perfil se realizo un diagnóstico de las instalaciones por medio de una guía de inspección para productos acuícolas así como también se

evaluó a los manipuladores directos de la tilapia fresca en los que se investigo la presencia ***Escherichia coli*** y ***Staphylococcus aureus*** que se comparo con la normativa de Perú del Ministerio de Salud para superficies vivas (manos). Se determino la calidad del agua de los estanques aislando, investigando la presencia de Coliformes totales y fecales que respectivamente fueron comparados con la normativa de aguas recreacionales Organización Mundial para la Salud OMS, y como último estudio se analizaron tilapias frescas en donde se investigo presencia de ***Escherichia coli***, ***Staphylococcus aureus***, ***Listeria monocytogenes***, ***Vibrium parahaemolyticus*** y ***Salmonella sp*** (tanto en musculo como en visceras) dichos resultados obtenidos fueron comparados con la normativa del Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08.

Todos estos resultados fueron dados a conocer a las autoridades del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), a la División de servicios veterinarios (sanidad acuícola).

Dichos análisis fueron realizados en el Laboratorio de Alimentos de Microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud CENSALUD en el periodo de Mayo a Junio del año 2012.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General:

Determinar el perfil bacteriológico de ***Oreochromis niloticus*** (tilapia) fresca y su respectiva agua de estanque proveniente del cantón Atiocoyo, municipio de San Pablo Tacachico, La Libertad.

2.2 Objetivos Específicos:

- 2.2.1 Realizar un diagnóstico de las instalaciones de los estanques del cantón Atiocoyo por medio de una guía de inspección basada en las Buenas Prácticas Acuícolas.
- 2.2.2 Determinar la presencia de ***Staphylococcus aureus*** y ***Escherichia coli*** en las manos de los manipuladores que están en contacto directo con la tilapia fresca.
- 2.2.3 Identificar la presencia de bacterias Coliformes Totales y Coliformes Fecales en el agua del estanque de cultivo de la tilapia.
- 2.2.4 Investigar la presencia de ***Escherichia coli***, ***Staphylococcus aureus***, ***Salmonella sp.***, ***Listeria monocytogenes*** y ***Vibrio parahaemolyticus*** en el músculo y vísceras de las tilapias criadas en los estanques del cantón Atiocoyo.
- 2.2.5 Comparar los resultados obtenidos con las normas establecidas por la Guía Técnica proveniente de las Normas Legales de Perú, la normativa para aguas recreacionales de la Organización Mundial para la Salud y el Reglamento Técnico Centroamericano Microbiológico 67.04.50:08.
- 2.2.6 Proporcionar los resultados obtenidos, a la división de servicios veterinarios (sanidad acuícola) del Ministerio de Agricultura y Ganadería de El Salvador.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 GENERALIDADES DE LAS TILAPIAS

Las tilapias, como se les conoce a un grupo de peces de origen africano, habita principalmente en regiones tropicales del mundo, donde existen las condiciones necesarias para su reproducción y crecimiento. La tilapia en comparación con otros peces, posee extraordinarias cualidades para el cultivo, como: crecimiento acelerado, tolerancia a altas densidades, adaptación a cautiverio, aceptación de una amplia gama de alimentos, alta resistencia a enfermedades, además de contar con algunos atributos para el mercado, como: carne blanca de buena calidad, buen sabor, poca espina, buena talla y precio accesible, que le confiere una preferencia y demanda comercial en la acuicultura mundial.⁽⁶⁾

Tilapia como Alimento: La experiencia demuestra que grupos étnicos que obtienen su proteína de los peces, están bien nutridos. Los constituyentes principales de los alimentos mar como las tilapias son: agua del 66 al 84%, proteínas del 15 al 24%, lípido del 0.1 al 22% y minerales del 0.8 al 2%.⁽⁷⁾

3.2 CARACTERISTICAS BIOLOGICAS DE LA TILAPIA

3.2.1 DISTRIBUCIÓN ⁽⁸⁾

Son organismos tropicales dulceacuícolas principalmente, originarios de África, los cuales, debido a su facilidad de adaptación se encuentran actualmente distribuidos en la mayoría de los países tropicales y subtropicales con fines de cultivo.

Las tilapias han colonizado hábitats diversos, pues es un pez de aguas cálidas, dulces, salobres o salinas que puede adaptarse a aguas con baja concentración de oxígeno, por lo que también es común que habiten en aguas de poca

corriente (lénticas), permaneciendo en zonas poco profundas y cercanas a las orillas.

La tilapia se ha introducido en todo el mundo y se cría de manera generalizada en los trópicos y las zonas subtropicales. Aunque Asia domina la producción en la actualidad, se cría cada vez más en condiciones ambientalmente controladas en climas templados.

Se encuentra naturalmente distribuida por América Central, sur del Caribe, sur de Norteamérica, el sudeste asiático, Medio Oriente y África

3.2.2 GÉNERO *Oreochromis* ⁽⁸⁾

Las características más importantes que distinguen a éste género, en comparación con otros géneros de tilapia es que son incubadoras bucales, presentan un marcado dimorfismo y dicromatismo sexual, los huevos son de menor tamaño y éstos carecen de una capa adhesiva.

Para el caso de *Oreochromis niloticus* la parte frontal del hueso faríngeo presenta un área dentada con una menor cantidad de dientes. Se puede apreciar en la parte superior la presencia de dientes bicúspides y en la parte inferior de monocúspides curvados hacia atrás.

3.2.3 HÁBITOS ALIMENTICIOS ⁽⁸⁾

La mayor parte de las tilapias, poseen tendencia para hábitos alimenticios herbívoros. Las adaptaciones estructurales a este tipo de dieta, son principalmente un largo intestino muy plegado, dientes bicúspides o

tricúspides sobre las mandíbulas y la presencia de dientes faríngeos, que utilizan para poder cortar y rasgar plantas y hojas fibrosas.

De forma general y en base a sus hábitos alimenticios predominantes, las tilapias en especial todas las del género ***O. nilóticos*** se clasifican en especies Omnívoras (que se alimentan tanto de plantas como de animales).

3.2.4 REPRODUCCIÓN ⁽⁸⁾

Las tilapias poseen sexos separados, existiendo en muchos casos una clara diferencia entre macho y hembra, que puede ser por la coloración del cuerpo o su tamaño, siendo generalmente los machos de mayor peso y talla que las hembras. Para llevar a cabo la reproducción, se toman en consideración parámetros ideales de crecimiento, es así que el peso y la talla óptima varía de entre 200 a 500 g. y de 12 a 15 cm. de longitud, cantidades que se alcanzan entre las edades de 6 a 12 meses. (Cuadro N° 1).

A diferencia de otros peces cultivados, tienen la característica de reproducirse fácilmente en cautiverio sin necesidad de intervención del hombre. De hecho, puede considerarse como uno de los principales problemas, la gran facilidad con la que se reproducen estos organismos así como la precocidad en la que comienza, pues al iniciar ésta, reducen sus tasas de crecimiento a la vez que hay una sobrepoblación en los estaqués, motivo por el cual se prefiere el cultivo monosexo, principalmente de machos.

La temporada de reproducción abarca desde finales de marzo o principios de abril hasta mayo, cuando la temperatura del agua es aproximadamente de 20 a 22° C y cuando se alcanza temperatura de 25 a 31 °C las hembras comienzan a poner e incubar huevos.

Parámetros más importantes a tomar en cuenta al momento de la reproducción⁽⁶⁾:

Temperatura:

El rango óptimo es de 20-31 °C, cuando disminuye a los 15 °C los peces dejan de comer y cuando desciende a menos de 12 °C no sobreviven mucho tiempo. Cuando la temperatura es mayor a 30 °C los peces consumen más oxígeno. Las temperaturas letales se ubican entre los 10-11 °C.

Oxígeno:

La concentración y disponibilidad de oxígeno disuelto son factores críticos para el cultivo de tilapia. Es uno de los aspectos más difíciles de entender, predecir y manejar y tiene mucho que ver con las mortandades, enfermedades, baja eficiencia en conversión de alimento y la calidad de agua. Normalmente, en los cuerpos de agua ricos en nutrientes, el oxígeno es abundante a mediados de la tarde y bastante limitado al amanecer.

Un factor que causa considerables variaciones en los niveles de oxígeno en el agua es el estado del tiempo y particularmente si el tiempo está nublado. La luz solar y el plancton, a través del proceso de fotosíntesis, son responsables de gran parte del oxígeno producido. Por lo tanto, cuando se dan condiciones de baja luminosidad y se restringe el proceso de fotosíntesis se dan problemas con niveles críticos de oxígeno.

Salinidad:

Los peces pueden tolerar diferentes salinidades pero son sensibles a los cambios bruscos de la misma. El agua de mar contiene 34 ppt (partes por mil) de salinidad, el agua dulce tiene muy poco o nada, normalmente menor o igual a 1 ppt. La *O. niloticus* puede vivir, crecer y reproducirse a una salinidad de 24 ppt.

pH:

El pH interviene determinando si un agua es dura o blanda, la tilapia crece mejor en aguas de pH neutro o levemente alcalino. Su crecimiento se reduce en aguas ácidas y toleran hasta un pH de 5; un alto valor de pH (de 10 durante las tardes) no las afecta y el límite, aparentemente, es de 11. Con valores de 6.5 a 9 se tienen condiciones para el cultivo.

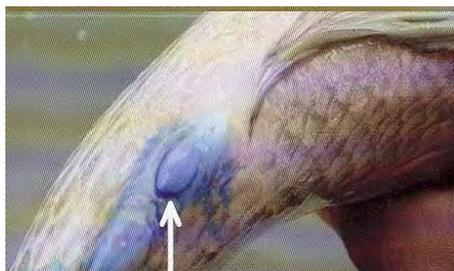
3.2.5 CARACTERES SEXUALES ⁽⁸⁾

La diferenciación externa de los sexos se basa en que el macho presenta dos orificios bajo el vientre: el ano y el orificio urogenital, mientras que la hembra posee tres: el ano, el poro genital y el orificio urinario. El ano está siempre bien visible; es un agujero redondo.

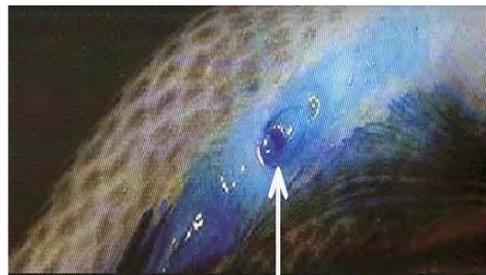
El orificio urogenital del macho es un pequeño punto. El orificio urinario de la hembra es microscópico, apenas visible a simple vista, mientras que el poro genital se encuentra en una hendidura perpendicular al eje del cuerpo (Figura N° 1 y Figura N° 2).

Cuadro N° 1. Características Reproductivas de la Tilapia ⁽⁵⁾

Parámetros de Reproducción de Tilapia	
Peso Adultos	1-3 kg
Madurez Sexual	Machos (4-6 meses), hembras (3-5meses).
Número de Desoves	5-8 veces por año
Temperatura de Desove	25-31 ° C
Número de huevos/hembra/desove	Condiciones idóneas > 100
Vida útil reproductores	2-3 años
Tipo de incubación	Bucal
Tiempo de incubación	3-6 días
Proporción de siembra de Reproductores	15-20 machos por cada 3 hembras
Tiempo de cultivo	7-8 meses, o peso comercial de 300 g



Macho

Figura N° 1: *Oreochromis niloticos*

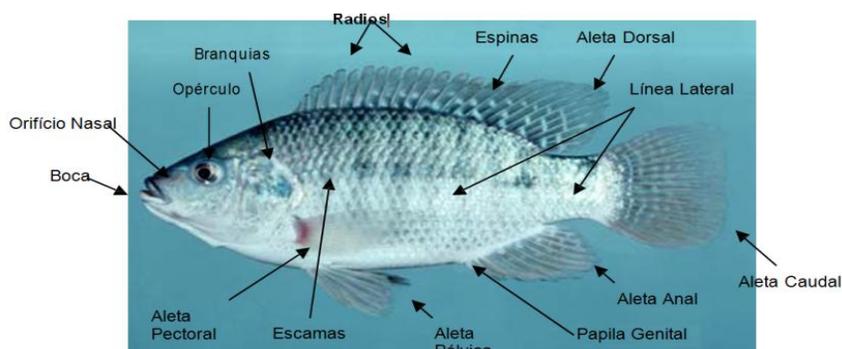
Hembra

Figura N° 2: *Oreochromis niloticos*

3.2.6 ANATOMÍA DE LA TILAPIA ⁽⁸⁾

El cuerpo de estos peces es robusto comprimido, a menudo discoidal, raramente alargado, con aleta dorsal que tiene de 23 a 31 espinas y radios; la boca es proctátil, mandíbula ancha, a menudo bordeada por labios gruesos con dientes cónicos y en algunas ocasiones incisivos, en otros casos puede presentar un puente carnoso (freno) que se encuentra en el maxilar inferior, en la parte media debajo del labio.

La línea lateral es bifurcada: la porción superior se extiende desde el opérculo hasta los últimos radios de la aleta dorsal, en la porción inferior, aparecen varias escamas por debajo de donde termina la línea lateral de la parte superior hasta la terminación de la aleta caudal; la aleta caudal truncada redondeada. (Figura N° 3) Generalmente, el macho se desarrolla más en cuanto a la talla y peso que la hembra.

Figura N° 3. Anatomía de *Oreochromis niloticus*

3.3 CALIDAD E INOCUIDAD DEL CULTIVO DE TILAPIA

Los pasos del proceso del cultivo de la tilapia que se deben de tomar en cuenta para garantizar la calidad e inocuidad de la tilapia y así ayudar en la prevención de cualquier problema que pueda surgir durante este y que pone en riesgo la inocuidad del producto final se especifican en la figura N° 4:

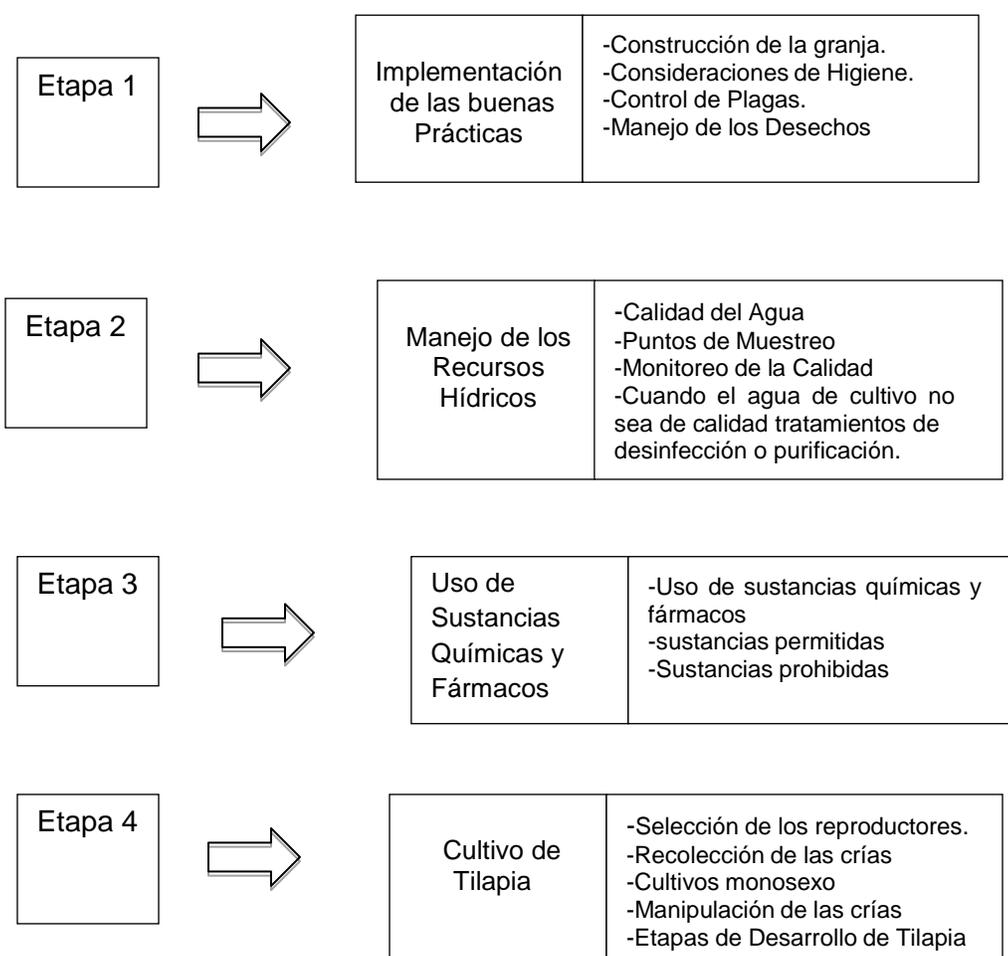


Figura N° 4.: Diagrama de Flujo General de Producción de Tilapia (8), (10)

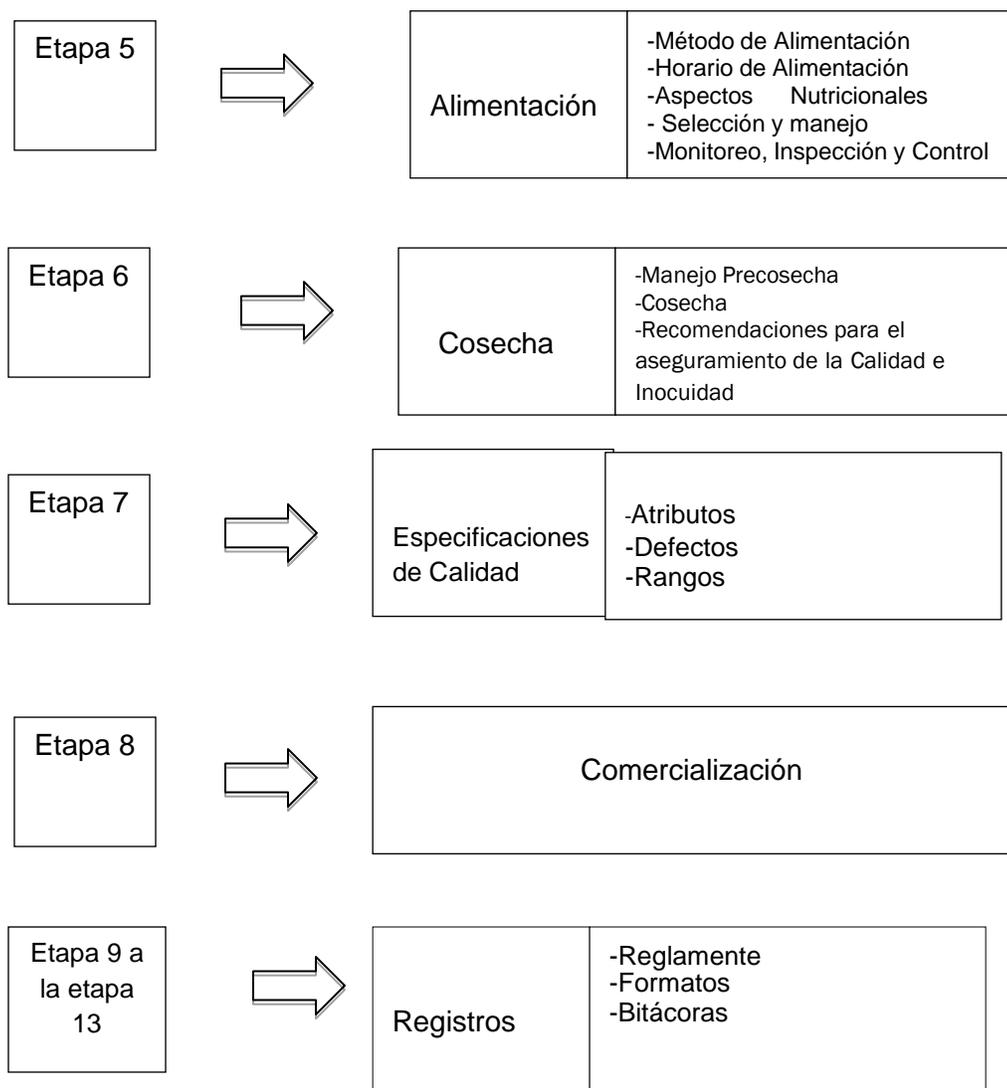


Figura N° 4.: Continuación.

Las Buenas Prácticas en la producción de la tilapia deben de considerar ciertos aspectos en cuanto a la higiene y calidad de los estanques para que la producción de dicho organismo sea realizada bajo los criterios de inocuidad alimentaria y que son descritos en el Cuadro N° 2. ⁽⁸⁾

Cuadro N° 2: Buenas Practicas Acuícolas ^{(8),(10)}

Criterio	Descripción
Selección del área de cultivo. "Historial del Lugar".	Sitio adecuado con abastecimiento de agua y sin riesgo alguno de contaminarse (contacto con animales, descarga de afluentes, industrias, plaguicidas o sustancias químicas, suelo sin uso agrícola previo).
Construcción y Diseño	La zona de producción acuícola debe estar acorde con las necesidades del cultivo, con independencia de áreas del proceso, diseño de espacios, etc.
Abastecimiento de Agua	De alta calidad, libre de contaminantes, cumplir con requerimientos físico-químicos óptimos para la especie y de acuerdo a la normatividad vigente. Se debe contar con un abastecimiento suficiente de acuerdo a la capacidad de la granja.
Higiene	De las instalaciones, materiales y utensilios de la granja. Así mismo debe de considerarse dentro de este apartado, al personal que labora en la granja.
Capacitación del Personal	Sobre la importancia de una adecuada aplicación de las Buenas Prácticas de Producción Acuícola
Alimentación	Debe cumplir con los requerimientos que establecen las normas sobre la calidad de los mismos. Se deben utilizar alimentos libres de contaminantes químicos o cualquier peligro para el consumidor y se debe asegurar esto mediante un control estricto del manejo de la alimentación de la Tilapia.
Manejo adecuado de los organismos	Se refiere a la toma de medidas preventivas dentro del proceso productivo de los peces, que permite la minimización en la aparición de enfermedades infecciosas y un consiguiente bajo uso de medicamentos y otras sustancias químicas
Manejo adecuado del ciclo productivo	Para evitar la aparición de perturbaciones biológicas o químicas.
Manejo de crías	Para evitar que estén contaminados de forma química o biológica y que dañen otros organismos.
Especificaciones de Calidad	Parámetros organolépticos, atributos y defectos
Registros	Formatos de control y bitácoras

3.4 INFRAESTRUCTURA DE LA GRANJA DE PRODUCCION

Existen ciertos puntos a considerar, estandarizados y de gran importancia para la selección del sitio ideal de construcción de la granja, de acuerdo a los principios de Buenas Prácticas: ^{(8), (10)}

- Estudio de suelo para determinar las concentraciones y magnitud de cualquier parámetro de importancia en la inocuidad del producto final. Planes de desarrollo de la zona.
- Verificar parámetros físico-químicos idóneos del agua para el cultivo de Tilapia.
- La granja no debe localizarse en sitios expuestos a descargas de plaguicidas u otros químicos agrícolas o industriales.
- La granja debe construirse en áreas donde el riesgo de contaminación (química o biológica) sea mínima y pueda ser controlable.
- El suelo donde se van a construir los estanques o canales de corriente rápida, debe estar libre de concentraciones de químicos que puedan ocasionar la presencia de sustancias tóxicas en el producto.
- No debe construirse en área de frágil equilibrio o lugares donde no se puedan corregir los problemas relacionados con el sitio.
- Debe haber separación entre entradas y salidas de agua, de manera que las fuentes y afluentes no se mezclen.
- La granja, estanques y canales deben estar protegidos con la finalidad de evitar la introducción de especies no deseadas.

3.5 TIPOS DE CULTIVO ⁽⁸⁾

El cultivo de estos peces, puede ser muy versátil ya que lo mismo crece en jaulas, como en estanques rústicos o de concreto, sin embargo es necesario determinar desde el principio qué tipo de cultivo se va a utilizar, pues cada uno

tiene recomendaciones y características propias. A continuación se describen los 3 tipos más utilizados:

3.5.1 Cultivo en Estanques Rústicos:

Un estanque rústico es aquél que es excavado en la tierra y que posee estructuras especiales para el llenado y vaciado del agua de forma individual (Figura N° 5).



Figura N° 5: Cultivo en estanques rústicos

3.5.2 Cultivo en Corrales y Jaulas Flotantes

El cultivo en jaulas se define como la engorda de los peces, desde estadios juveniles hasta tallas comerciales en un área restringida y delimitada por mallas que permiten el flujo del agua libremente. Su ventaja principal es que se pueden aprovechar mantos acuíferos en movimiento como los ríos que por su naturaleza no se pueden modificar. Este tipo de cultivo se puede efectuar tanto como nivel de subsistencia individual o familiar, hasta una escala comercial, en lugares tropicales donde la temperatura del agua sea superior a los 20 ° C.



Figura N° 6. Jaulas flotantes en estanques rústicos

3.5.3 Cultivo de Alta Densidad en Tanques

Los tanques cuentan con dispositivos que permiten la circulación continua de agua (varios recambios por hora), aireación continua, regulación de la temperatura, filtración del agua, alimentadores automáticos o de demanda, etc. Por lo tanto, se requiere de un alto costo de inversión inicial, y un gran capital de operación.



Figura N° 7: Tanques de alta densidad

3.6 SISTEMAS DE CULTIVO ⁽⁸⁾

Los sistemas de producción de tilapia varían desde sencillos a muy complejos; los sistemas de manejo sencillo se caracterizan por poco control sobre la calidad del agua, el valor nutricional del alimento y por producciones bajas. Los sistemas de cultivo tradicionales son: Extensivo, Semi-intensivo e Intensivo.

3.6.1 Cultivo Extensivo:

Este tipo de cultivo se desarrolla por lo general con muy baja inversión, en donde se espera proporcionar a la población un alimento de bajo costo tampoco es importante la talla final del pez, en tanto alcance tamaño comercial; y mucho menos el tipo de alimento utilizado en su producción. En este sistema se utilizan densidades de 0,5 a 3,0 peces/m² (Figura N° 8). Como una forma de contribuir

en la alimentación del pez, se trata de favorecer el desarrollo de la productividad primaria utilizando fertilizantes orgánicos como excreta de aves, excreta de cerdos, excreta de vacuno.

En la actualidad se están utilizando subproductos agrícolas como alimento complementario, como por ejemplo arroz o trigo, etc. La producción de este sistema suele ser de 4,000 a 10,000 kg/Ha/año.



Figura N° 8. Cultivo extensivo

3.6.2 Cultivo Semi-Intensivo⁽⁸⁾

En este sistema de producción se utilizan estanques de 0,5 a 3 hectáreas con recambios de agua del 15 al 30% diario de todo el volumen del estanque y se utilizan aireadores (Figura N° 8), dependiendo del grado de intensidad de siembra del sistema (se utilizan desde 2 HP (potencia de aire expresados en caballos de fuerza) a 12 HP por hectárea). Las densidades utilizadas son muy variables y se encuentran en el rango de 4 a 15 peces /m³ obteniendo una producción en el rango de 20 a 50 tons/año.



Figura N° 9. Aireadores

3.6.3 Cultivo Intensivo ⁽⁸⁾

En este sistema se utilizan estanques pequeños de 500 a 1000 m² con alto recambio de agua (recambios de 250 a 600 litros/seg). Las densidades de siembra de los peces se encuentran en el rango de 80–150 peces/m³, lo que equivale a cargas máximas de hasta 90 kg/m³. Para el éxito del cultivo bajo en este sistema es sumamente importante la cantidad y calidad del agua suministrada a los peces; así como el cuidado y atención que se le debe proporcionar al sistema (Figura N° 10).



Figura N° 10. Sistema intensivo

3.7 HIGIENE DEL PERSONAL

A continuación se enlistan las principales buenas prácticas a considerar durante la higiene del personal que está en contacto directo con la tilapia: ⁽⁸⁾

- El personal deberá estar capacitado en temas de higiene en todas las actividades que realice en la granja, así mismo deberá estar familiarizado con la especie, con la finalidad de prevenir cualquier tipo de contaminación del producto.
- Las instalaciones de la granja deben incluir vestidores, cuartos para artículos de limpieza, baños separados, regaderas, lavamanos, secadores y todo tipo de equipo y material que sea necesario, diseñado lo más higiénicamente posible.
- Se deberá contar con ropa de trabajo distinta a la que se utiliza cotidianamente, y que solo permanezca en la zona, con la finalidad de

evitar una contaminación cruzada o la dispersión de algún material que ponga en riesgo el cultivo, la salud del trabajador, y la seguridad fuera de la granja.

- El personal deberá contar con instrumentos y materiales limpios, así mismo una zona de aseo de los mismos que no comprometa la calidad del agua de los estanques.
- En caso de que algún trabajador padezca de enfermedad infecto-contagiosa, heridas, o infecciones en la piel, que pueda transmitirse con facilidad y mediante los alimentos, no deberá de trabajar con los productos o manipularlos hasta que se haya recuperado.
- La higiene del personal incluye también presentarse con el cabello cubierto, manos limpias, uñas cortadas, sin esmalte y en caso de ser necesario cubrir bocas y gorros, así como se debe prohibir el uso de joyas, aretes y maquillaje que puedan contaminar con facilidad a los peces.
- Debe estar prohibido fumar, beber o comer cerca de las áreas de producción, para esto el personal debe contar con un área de esparcimiento, comedores, etc. lejanos a los estanques.
- Se debe lavar las manos, antes de iniciar labores o comer, después de ir al baño y cada vez que salga de la zona de producción y vaya a regresar a ésta.
- El abastecimiento de agua en la granja para actividades de limpieza y enjuague debe ser potable, y en cantidad suficiente para realizar todas las actividades en el proceso productivo.
- Debe estar perfectamente delimitado el agua de uso por el personal y el agua utilizada en la granja, para evitar cualquier riesgo de contaminación.

Se denomina manipulador a toda persona que trabaje a cualquier título y aunque sea ocasionalmente, en un local o establecimiento o en el comercio ambulante donde se produzcan, procesen, almacenen, distribuyan, transportan o expendan alimentos o materias primas para alimentos. ⁽³⁾

Un manipulador debe cumplir con los siguientes requisitos: ⁽³⁾

1. No presentar heridas, ni afecciones cutáneas en brazos o manos.
2. No padecer enfermedades infectocontagiosas.
3. Practicar buena higiene personal.
4. Durante su trabajo debe usar uniforme y gorro, en las áreas de envasado se hace indispensable el uso de mascarilla.
5. Recibir capacitación sobre manejo higiénico de alimentos.

Muchos sitios del cuerpo humano albergan una carga microbiana normal, los sitios de importancia donde residen los microorganismos saprófitos y que se constituyen en una fuente de contaminación para manipuladores de alimentos son la piel y el tracto respiratorio (fosas nasales y faringe). El microorganismo más importante a analizar a partir de la piel, es el ***Staphylococcus aureus***, este microorganismo reside también en las fosas, tracto nasofaríngeo y la mayoría de las veces se encuentra asociado a furúnculos, heridas y lesiones de la piel. Debido a sus condiciones metabólicas, esta bacteria puede crecer y/o reproducirse en condiciones adversas; esto hace factible que contamine los alimentos y por su facilidad de aislarse en el laboratorio, ha sido utilizado como indicador de contaminación por manipuladores. ⁽³⁾

Otros microorganismos no pertenecientes a la flora normal de la piel, pueden transferirse al alimento debido a una pobre higiene corporal, un ejemplo son los **coliformes totales y fecales**, provenientes del tracto gastrointestinal,

específicamente de la región anal, la presencia de estos también se investiga en las manos dedos y uñas de los manipuladores e indican contaminación de origen fecal. ⁽³⁾

Para asegurar la calidad de los alimentos debe prestarse atención tanto a los microorganismos patógenos como a los microorganismos oportunista, que pudieran llegar a las materias primas o al alimento terminado, a partir del hombre (manipulador). ⁽³⁾

Los resultados para las muestras del manipulador (manos) se compararan con los criterios de la norma legal de Perú del ministerio de saludos para el método enjuague que aunque la normativa mencione otras determinaciones, en este estudio solamente se analizara la presencia de ***Staphylococcus aureus*** y el patógeno a estudiar será la ***E. coli*** a continuación se muestra las especificaciones de dicha norma.

Cuadro N° 3: criterios microbiológicos para el método de enjuague para el manipulador (manos) según norma del Perú. ⁽¹³⁾

Método Enjuague	Superficies vivas
Ensayo	Límite de detección del método
Coliformes totales	< 100 UFC/manos
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 100 UFC/manos
Patógeno	Ausencia/manos

3.8 PELIGROS DE ORIGEN BIOLÓGICO

Un peligro de origen biológico es aquel en el que organismos vivos y productos orgánicos son capaces de contaminar los alimentos y causar un efecto negativo en el cultivo poniendo en riesgo la calidad del producto final y la salud de los consumidores. ⁽⁸⁾

Los peligros biológicos que afectan a los peces pueden ser causados por bacterias patógenas (Cuadro N° 4). El pescado presenta una micro flora natural relativamente uniforme, compuesta por bacterias psicrófilas o psicrotóficas de las que se destacan: ***Pseudomonas, Achromobacter, Moraxella, Acinetobacter y Flavobacterium***. Las bacterias patógenas o indicadoras de contaminación raramente son encontradas en el pescado recién capturado, a no ser que sea proveniente de aguas excesivamente contaminadas con materia fecal. ⁽¹⁾

En el pescado procedente de las aguas tropicales las bacterias que se encuentran son principalmente mesófilas. En el pescado de agua dulce se encuentran la flora bacteriana propia de esta agua, que incluye representantes de la mayoría de los géneros: ***Aeromonas, Lactobacillus, Brevibacterium, Alcaligenes y Streptococcus***. ⁽⁵⁾

El número de bacterias existentes en el mucílago y en la superficie de la piel del pescado recién capturado puede oscilar desde cifras tan bajas como 100 por centímetro cuadrado, a cifras del orden de varios millones por centímetro cuadrado, mientras que en los intestinos se pueden encontrar desde 1,000 a 1 millón de bacterias. El tejido de las branquias puede albergar de 1, 000 a 1 millón de bacterias por gramo. ⁽⁵⁾

Los microorganismos se encuentran en todas las superficies externas (piel y branquias) y en los intestinos de los peces vivos recién capturados. El número total de microorganismos varía enormemente, como rango normal $10^2 - 10^7$ ufc (unidades formadoras de colonias)/ cm^2 en la superficie de la piel. Las branquias e intestinos contienen entre 10^3 y 10^9 ufc/g. ⁽¹⁵⁾

Invasión microbiana: El músculo de un pez saludable o de un pescado recién capturado es estéril, debido a que el sistema inmunológico del pez previene el

crecimiento de bacterias en el músculo. Cuando el pez muere, el sistema inmunológico colapsa y las bacterias proliferan libremente. En la superficie de la piel, las bacterias colonizan en una amplia extensión la base de las escamas. ⁽¹⁵⁾

Las bacterias contaminantes del tejido muscular del pescado pueden proceder del lodo, del agua, de los manipuladores y también del mucílago que recubre la superficie externa del pescado o de su tubo intestinal, también esta contaminación puede tener lugar en la red de captura. Las bacterias se multiplican al principio en la superficie y posteriormente penetran en la masa muscular. ⁽⁵⁾

Las principales especies de bacterias que alteran el pescado dependen de la temperatura a la que se mantiene el pescado, aunque a las temperaturas que normalmente se emplean para refrigerarlo es más probable que predominen las especies de ***Pseudomonas***, siguiéndoles en orden de mayor a menor importancia las especies de los géneros ***Acinetobacter***, ***Moraxella*** y ***Flavobacterium***. Con menor frecuencia y en caso de que las temperaturas sean más elevadas, aparecen en el pescado bacterias del género ***Escherichia***, ***Proteus***, ***Serratia***, ***Sarcina*** y ***Clostridium***. ⁽⁵⁾

Durante la alteración microbiana que se presenta en el pescado pueden aparecer coloraciones anormales en el músculo del pescado; ***Pseudomonas*** puede originar una coloración que puede variar desde el amarillo al amarillo grisáceo; las especies del género ***Sarcina***, ***Micrococcus*** y ***Bacillus*** pueden originar una coloración roja o rosada. Los microorganismos patógenos que parasitan el pescado como la ***Salmonella*** pueden ocasionar coloraciones anormales o lesiones. ⁽⁵⁾

Generalmente se admite que los músculos internos de los peces vivos y sanos son estériles aunque hay algunos trabajos en que se afirma lo contrario. Las bacterias del pescado fresco se encuentran localizadas: en el limo externo, en las agallas y en el intestino, encontrándose que las bacterias más comunes en el pescado fresco, tanto de agua salada como de agua dulce son: ***Alcaligenes, Achromobacter, Bacillus, Corynebacterium, Escherichia, Flavobacterium, Gaffkya, Micrococcus, Proteus, Pseudomonas, Photobacterium.*** ⁽⁷⁾

Los estudios bacteriológicos en peces de agua dulce son muy poco frecuentes en contraste con la voluminosa literatura existente sobre peces marinos. En estudios frecuentes realizados en el "Freshwater Institute" se llegó a resultados importantes. Estos señalan que en peces de agua dulce la ***Pseudomonas*** se encontraron en mayor número, seguida por ***Aeromonas*** y ***Micrococcus.*** ⁽⁷⁾

Con respecto a la flora microbiana de la tilapia viva, ésta depende de la flora existente en las aguas de donde proviene 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.*** 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. ⁽¹⁾

3.8.1 Microorganismos Indicadores

Son aquellas especies de microorganismos cuya presencia indica que los alimentos estuvieron expuestos a condiciones que permitieron la llegada a los mismos de estos microorganismos y permitir así la proliferación de especies patógenas o toxigenicas. ⁽⁴⁾

Los microorganismos indicadores más comunes son los siguientes:

- a) Bacterias aeróbicas mesófilas: son microorganismos que crecen a 37 °C y cuyos recuentos se obtienen en placa, los cuales, si son altos, indican la posible proliferación de organismos patógenos dentro del alimento y al mismo tiempo, indican que el alimento va a alterarse muy pronto. ⁽⁴⁾
- b) ***Escherichia coli*** y coliformes: la ***E. coli*** es una bacteria cuyo hábitat natural es el tracto digestivo del hombre, por lo tanto, su presencia en los alimentos, es un indicador de contaminación directa o indirecta de origen fecal, lo que implica la presencia simultanea de bacterias patógenas como ***Salmonella, Shigella, Vibrios y Entamoebas***. ⁽⁴⁾ Los otros coliformes son buenos indicadores de una limpieza y desinfección no adecuada o de una industrialización o tratamiento de alimentos incorrectos, favoreciendo la multiplicación de microorganismos patógenos. ⁽⁴⁾
- c) ***Staphylococcus***: la presencia de ***Staphylococcus aureus*** en alimentos se interpreta como indicativo de contaminación a partir de la piel boca y las fosas nasales de los manipuladores de alimentos, así como de material y equipos sucios y de ineficiente temperatura de conservación. ⁽⁴⁾

3.8.2 Bacterias Patógenas:

La contaminación del pescado por bacterias depende principalmente del medio ambiente donde se encuentra la zona de cultivo y de la calidad del agua utilizada. ⁽⁷⁾ Se pueden encontrar en: el entorno acuático, el entorno en general, en los seres humanos y los animales. ⁽¹⁴⁾

Las bacterias patógenas que se encuentran en los entornos acuáticos y en general pueden estar presentes en los peces tras su captura. Las bacterias patógenas de las que son portadores los seres humanos y los animales se pueden encontrar en el medio acuático y pueden contaminar los peces tras su captura debido a unas prácticas deficientes de manipulación e higiene. ⁽¹⁴⁾

A continuación se mencionan importantes bacterias patógenas autóctonas del entorno acuático: cepas patógenas de ***Vibrio sp*** que pueden estar presentes de manera natural en el pescado y plantear un posible riesgo para la inocuidad de los alimentos; bacterias patógenas autóctonas del entorno en general: ***Listeria monocytogenes*** que se asocian con enfermedades transmitidas por los alimentos ocasionadas por el pescado. ⁽¹⁴⁾

Existen ciertas características que influyen en la proliferación de bacterias patógenas, como la humedad, temperatura y salinidad del agua, calidad del alimento, métodos de cosecha, así como la proximidad de la granja a áreas urbanas o asentamientos humanos. ⁽⁷⁾

Las bacterias que normalmente se encuentran en medios acuáticos son:

- ***Pseudomonas***: son bacilos rectos o ligeramente curvados, aeróbicos que degradan compuestos orgánicos. Se encuentran en tierra y agua de donde pasan a las plantas o animales. En el hombre son oportunistas y producen un cuadro clínico diarreico. ⁽⁷⁾
- ***Enterobacterias***: (*salmonella*, *shigella*, *Escherichia coli*) causantes de cuadros agudos de infección que incluyen fiebre, diarrea, malestares estomacales, vómito, dolor de cabeza, entre otras. ⁽⁷⁾
- ***Vibrio parahemolyticus***: esta especie es autóctona del agua de mar y representa factores de riesgo para el desarrollo de diferentes síndromes clínicos en el humano; como el desarrollo de gastroenteritis aguda, septicemia primaria, infección del oído o infección de heridas.⁽⁴⁾ Es la principal causa de diarrea bacteriana asociada con el consumo de mariscos en los EE.UU. ⁽⁹⁾
- ***Staphylococcus aureus***: es una bacteria que produce una toxina que causa vómitos al poco tiempo de ser ingerida ⁽⁴⁾. Es altamente vulnerable a la destrucción por el tratamiento térmico y casi todos los agentes desinfectantes. Así, la presencia de esta bacteria o sus enterotoxinas en los alimentos es en general una indicación de la falta de saneamiento. ⁽⁹⁾
- ***E. coli***: se encuentra ampliamente distribuida en el intestino de los seres humanos y animales de sangre caliente y es el principal anaerobio facultativo en el intestino y parte de la flora intestinal esencial que mantiene la fisiología del huésped sano *E. coli* es un miembro de la familia *Enterobacteriaceae* hay cepas patógenas de *E. coli* que cuando se ingiere, causa enfermedades gastrointestinales en los seres humanos sanos. *E. coli* es un indicador de

contaminación fecal y la posible presencia de patógenos. Esto se basó en la premisa de que ***E. coli*** es abundante en las heces humanas y animales y que no suelen encontrarse en otros nichos. ⁽⁹⁾

- ***Salmonella***: es una de los principales agentes de intoxicación alimentaria por lo que se considera como la segunda causa más común de enfermedades transmitidas por alimentos. ⁽⁴⁾

Las bacterias que se estudiarán tanto en músculo (carne) como en vísceras serán analizadas en base a las especificaciones del Reglamento Técnico Centro Americano 67.04.50:08 para la inocuidad de alimentos, productos de la pesca, pescados frescos-refrigerados (ver anexo N° 13) que se detallan a continuación:

Cuadro N° 4: Límites máximos de contaminantes microbiológicos permitidos al pescado fresco ⁽¹¹⁾

ESPECIFICACIÓN	LÍMITE MÁXIMO
<i>Escherichia coli</i>	10 ² UFC/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	10 ³ UFC/g
<i>Salmonella sp/25 g.</i>	Ausencia
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausencia
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Ausencia

Cuadro N° 5: Factores que limitan la proliferación de bacterias patógenas ⁽¹⁴⁾

Bacterias patógenas	Temperatura (°C)		pH	NaCl (%)
	Mínimo	Optimo	Mínimo	Máximo
<i>Vibrio spp.</i> <i>V. cholerae</i>	10	37	5	8
<i>V. parahaemolyticus</i>	5	37	4	8-10
<i>Listeria monocytogenes</i>	0-2	30-37	4	10
<i>Salmonella spp.</i>	5 ²	35-40	3	6
<i>Escherichia coli</i>	7	35-40	4	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	34	4	20-25 ³

3.9 CALIDAD DEL AGUA

La calidad del agua está determinada por sus propiedades físico-químicas y microbiológicas, entre las más importantes destacan: temperatura, oxígeno, pH y transparencia para las fisicoquímicas y en cuanto a lo microbiológico permite cierto número de bacterias coliformes totales y coliformes fecales.

Estas propiedades influyen en los aspectos productivos y reproductivos de los peces, por lo que, los parámetros del agua deben mantenerse dentro de los rangos óptimos para el desarrollo de la tilapia (ver anexo N° 1) ⁽⁶⁾.

El agua del estanque será analizada bajo las especificaciones de la norma internacional OMS (Organización Mundial para la Salud) para Aguas Recreacionales donde especifica determinarle Coliformes Totales y Fecales como se muestra a continuación:

Cuadro N° 6: Análisis de Aguas recreacionales ⁽¹²⁾

DETERMINACIONES	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE EXPRESADO EN NMP
Coliformes Totales	2000 NMP/100 ml
Coliformes Fecales	1000 NMP./100 ml.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 Tipo de estudio: Transversal, Experimental y de Campo.

- Estudio transversal: la investigación se realizó en el periodo comprendido entre los meses de mayo a junio del año 2012.
- Estudio experimental: se realizaron determinaciones bacteriológicas por medio del análisis de laboratorio a la tilapia fresca (músculo y vísceras), a su respectiva agua de estanque y a las manos de los manipuladores directos de la tilapia.
- Estudio de campo: se visitaron los estanques del cantón Atiocoyo, municipio de San Pablo Tacachico, La Libertad para verificar el cumplimiento de las Buenas Prácticas Acuícolas y para desarrollar el muestreo.

4.2 Investigación Bibliográfica

Se realizó en:

Biblioteca Dr. Benjamín Orozco, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.

Biblioteca Central Universidad de El Salvador.

Biblioteca de la Facultad de Ciencias Naturales Universidad de El Salvador.

Biblioteca de la Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Universidad de El Salvador.

Internet.

4.3 Investigación de campo

4.3.1 Universo: las 95 granjas de cultivo de tilapia existentes en total hasta el mes de abril del 2012 en el cantón Atiococho, municipio de San Pablo Tacachico, La Libertad.

4.3.2 Muestra: en el siguiente cuadro resumen se detalla el tamaño de muestra (numero de granjas, estanques, tilapias y manipuladores) utilizado durante la investigación.

Cuadro N° 7: Resumen del tamaño de muestra

N° de granja	Estanques	Tilapias	Agua del estanque	Manipuladores
1	1	9	1	1
2	1	9	1	1
3	1	9	1	1
4	1	9	1	1
5	1	9	1	1
6	1	9	1	1
7	1	9	1	1
8	1	9	1	1
9	1	9	1	1
10	1	9	1	1
TOTAL	10	90	10	10

Ver en Anexo N° 2 el esquema de los análisis realizado a las muestras de manipuladores (manos), agua del estanque y tilapias (músculo y vísceras) en estudio.

4.3.3 Muestreo: El muestreo se realizo de la siguiente manera

El número de granjas muestreadas se determino por medio del software Win Episcopo (ver anexo N° 3) Para calcularlo se introdujo en el programa los siguientes datos: con un Tamaño de población (N) 95 granjas, el número de peces enfermos (D) o porcentaje de mortalidad por cosecha 25 y nivel de confianza (a) 95 % y se obtuvo el tamaño de muestra de 10 granjas y la prevalencia del 30 %. La prevalencia es la probabilidad de diagnosticar al menos un pez como realmente positivo de una contaminación microbiológica con esta prevalencia la probabilidad es del 97 % (ver anexo N° 4).

El número de estanques en una granja oscila entre uno y quince estanques por lo que se selecciono por un muestreo aleatorio simple un estanque de cada granja teniendo que muestrear 10 estanques en total y de cada estanque se recolecto la muestra de agua del estanque haciendo un total de 10 muestras de agua de estanque.

El número de tilapias recolectadas de cada estanque se determino por el uso de la tabla N° 1 que con la prevalencia obtenida del programa software Win Episcopo (ver anexo N° 3) del 30 % y con un tamaño de la población (numero de tilapias por estanque) mayor a 10,000 en donde se indica tomar como muestra 9 tilapias por estanque haciendo un total de 90 tilapias.

El número de manipuladores (manos) muestreados se selecciono aleatoriamente teniendo que muestrear 1 manipulador por granja muestreada haciendo un total de 10 manipuladores.

4.3.4 Modelo matemático para el muestreo

Para determinar el tamaño de la muestra (# de granjas) nos auxiliamos de un programa de computadora (software) denominado Win Episcopa, esta metodología de muestreo fue diseñada para detectar si más de un número específico o porcentaje mayor que cero de tilapias están contaminadas por microorganismos. Dicho programa se basa mediante la siguiente fórmula matemática:

$$n = \frac{1/D}{1 - (1 - a)^{N - (D - 1) / 2}}$$

Donde:

n = Tamaño de la muestra

N = Tamaño de la población

D = Número de tilapias enfermas (% mortalidad)

a = Nivel de confianza

p= Prevalencia estimada proporcionada por tablas

Conversión de la fórmula:

n = 10 granjas

N = 95 granjas

D = 25 %

a = 95 %

p = 30 %

Para determinar cuántas tilapias se tomaran de cada estanque se hará uso de la siguiente tabla cabe mencionar que esta es utilizada por la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) para el muestreo acuícola.

Tabla N° 1: Tamaño de muestra (numero de tilapias) a diferentes prevalencias. ⁽²⁾

Tamaño de la población	Tamaño de la muestra necesaria para obtener el porcentaje de prevalencia ^{***}						
	2%	5%	10%	20%	30%	40%	50%
50	50	35	20	10	7	5	2
100	75	45	23	11	9	7	6
250	110	50	25	10	9	8	7
500	130	55	26	10	9	8	7
1,000	140	55	27	10	9	9	8
1,500	140	55	27	10	9	9	8
2,000	145	60	27	10	9	9	8
4,000	145	60	27	10	9	9	8
10,000	145	60	27	10	9	9	8
>=10,000	150	60	30	10	9	9	8

*** Prevalencia: porcentaje de incidencia en que una tilapia se encuentre contaminada por las bacterias en estudio.

4.3.5 Instrumentos de recolección

Se utilizo una Guía de inspección (ver anexo N° 5) para determinar el cumplimiento de las buenas prácticas acuícolas en las granjas en estudio, esta guía incluyo aspectos como: el sitio de cultivo, riesgo en la granja, medidas de bioseguridad, instalaciones de producción, abastecimiento de agua, manejo de desechos, manejo del agua de cultivo, manejo del alimento, diseño y construcción de la granja, sanidad entre otros.

4.4 Parte experimental

4.4.1 Recolección de muestras: tilapias, agua del estanque y manipuladores.

Para capturar las tilapias se usó el método de “cuadricular” cada estanque muestreado, se seleccionaron cuatro puntos de recolección como se señala en la figura N° 11 se incluyó el uso de redes (atarrayas) para capturarlas una vez fuera del estanque, las tilapias se colocaron en baldes con su respectiva agua de estanque (figura N° 12) y luego se depositaron en bolsas de polietileno transparentes con un tamaño de poro de 0.5 y medidas de 25 x 30 cm incorporándole oxígeno por medio de un compresor para garantizar que durante el transporte no se estresen y mueran las tilapias (figura N° 13).

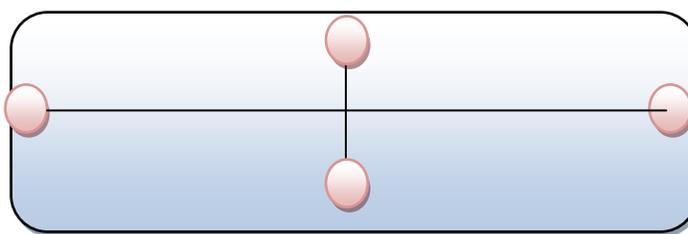


Figura N° 11: Método de “cuadricular” el estanque



Figura N° 12: Utensilios (redes, atarrayas, baldes) utilizados para recolectar las tilapias.



Figura N° 13: Transporte de las tilapias recolectadas

Para recolectar las muestras de agua del estanque se utilizó un frasco de vidrio estéril, el cual se sumergió a cierta profundidad del estanque en muestreo y se colocó en una hielera (ver figura N° 14) para su transporte al laboratorio.



Figura N° 14: Recolección de muestra de agua del estanque

Para tomar la muestra de las manos del manipulador se llevaron frascos de dilución que contienen 225 mL de Agua Peptonada Buferada (APB) estéril y al momento de tomar la muestra se pasó el APB a bolsas de stomacher estériles (figura N° 15), al manipulador se le pidió que realizara lo siguiente: Introducir las manos (una por una), dentro de una bolsa con diluyente lavarse las manos dentro de ella, por espacio de 3 minutos y retirar las manos. Se transportó la muestra en hielera hasta el laboratorio para realizar el respectivo análisis (figura N° 16).



Figura N° 15: Material utilizado para la toma de muestra del manipulador (manos)



Figura N° 16: Procedimiento de la toma de muestra del manipulador y transporte de la muestra

4.4.2 Guía de Inspección

Luego de tomar las muestras de tilapias, agua del estanque y manipulador se realizaron las preguntas de la guía de inspección (ver anexo N° 5) al encargado de la granja o al dueño (figura N° 17) a fin de evaluar los aspectos que incluyen las Buenas Prácticas Acuícolas (BPA).



Figura N° 17: Recolección de datos con la Guía de Inspección.

4.5 Preparación de las muestras: tilapias, agua del estanque y manipuladores.

Tilapias: de las 9 tilapias tomadas se hizo una muestra compuesta (mx_1 y mx_2) para que fuera más representativo, una muestra en la que se unieron 5 tilapias y otra en la que se unieron 4 tilapias. Con un cuchillo estéril se disecciono y se extrajo las vísceras y músculo (carne) de cada tilapia (figura N° 18), por separado (las vísceras y el músculo) se colocaron en bolsas plásticas estériles.

Luego se peso un equivalente a 25.0 g de cada uno seguidamente se agrego un volumen de agua peptonada buferada (APB) o medio de enriquecimiento (según sea la determinación) igual a su peso aproximadamente 225 mL esta era la dilución 1:10 (10^{-1}), se homogenizo por 2 minutos a velocidad alta (260 rpm) en el Stomacher (figura N° 19) y se siguieron los diferentes procedimientos para cada una de las determinaciones.



Figura N° 18: Extracción de vísceras y carne de las tilapias en estudio

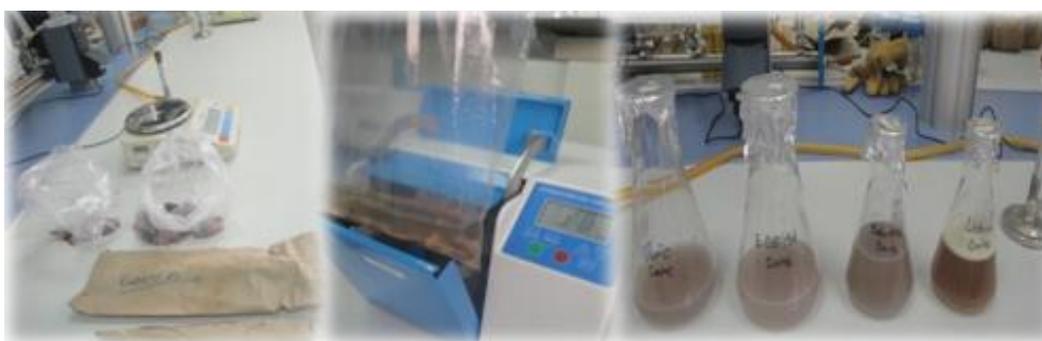


Figura N° 19: Preparación de la muestra (dilución 10^{-1})

El agua del estanque se analizó a partir del frasco en que se recolectó la muestra y a partir de este se realizaron los diferentes procedimientos y las muestras de manos de los manipuladores no requieren tratamiento previo, ya que a partir de la bolsa que contiene el APB se le realizaron las diferentes determinaciones (ver figura N° 20).



Figura N° 20: Muestra de las manos del manipulador

4.6 ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO DEL MÚSCULO (CARNE) Y VÍSCERAS DE LA TILAPIA FRESCA.

4.6.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *Escherichia coli* ⁽⁹⁾ (Ver anexo N° 6)

4.6.1.1 Prueba presuntiva para *E. coli*

- Pesar 25.0 g de muestra (carne o vísceras) en una bolsa plástica estéril.
- Agregar 225 mL de Agua peptonada buferada (APB) y homogenizar por 2 minutos en el Stomacher. Esta será la dilución 1:10 (10^{-1}).
- Preparar diluciones decimales de 1:100 (10^{-2}) y 1:1000 (10^{-3}) con APB.
- Sembrar 1 mL de cada dilución en la placas de Petri estériles. Por duplicado.
- Cubrir con 12 a 15 mL de agar Chromocult COLIFORMES.
- Mezclar con rotación en forma de ocho el contenido de las placas con el agar. Dejar solidificar.
- Cubrir con 3 a 4 mL del mismo agar la superficie de la placa para inhibir el crecimiento en la superficie.
- Incubar las placas a 35-37 °C por 24 horas.
- Contar las colonias utilizando cuenta colonias
- El resultado positivo para Coliformes totales: colonias rosadas y para *E. coli*: colonias moradas.

4.6.1.2 Prueba confirmativa para *E. coli*: Siembra en agar EMB

- De las colonias positivas en cromocult tomar una azada y estriar en placas con agar EMB.
- Incubar a 37 °C por 24-48 horas.

- El desarrollo de colonias planas con centro oscuro con o sin brillo metálico confirma la presencia de ***Escherichia coli***.
- Realizar la tinción al Gram. y observar la morfología microscópica: bacilos cortos gran negativos.

4.6.2 AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE ***Staphylococcus aureus*** ⁽⁹⁾ (Ver anexo N° 7)

4.6.2.1 Preparación de dilución 10^{-1}

- Pesar 25.0 g de muestra (vísceras o carne) en una bolsa plástica estéril.
- Agregar 225 mL de Agua peptonada buferada y homogenizar por 2 minutos en el Stomacher. Esta será la dilución 1:10 (10^{-1}).

4.6.2.2 Aislamiento y Cuantificación

- Transferir 1 mL de la dilución (10^{-1}) a 3 placas con medio Baird Parker, distribuyendo el volumen tomado de la forma siguiente 0.4 mL, 0.3 mL y 0.3 mL.
- Extender el inóculo sobre la superficie del medio con un rastrillo estéril.
- Dejar en reposo 10 minutos para que penetre el inóculo en el agar, en caso de no hacerlo, colocar durante 1 hora las placas; dentro de la incubadora.
- Invertir las placas e incubar a 35 °C por 45 a 48 horas.
- Transcurrido el tiempo, examinar las placas, principalmente, aquellas que tengan 20 a 200 colonias. Las colonias típicas de ***St. aureus*** son circulares, lisas, convexas, húmedas, de 2 a 3 mm de diámetro grises a negro azabache, con un margen coloreado, rodeado por una zona opaca

y frecuentemente con una zona externa clara; las colonias tienen consistencia cremosa a gomosa cuando se toca con la aguja de inoculación.

- Contar y reportar el dato de las colonias positivas como número de ***St. aureus*** / g de carne o vísceras.

4.6.2.3 Prueba de la Coagulasa

- Seleccionar colonias típicas o sospechosas y transferirlas a un tubo conteniendo 5 mL de Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) y agitar.
- Incubar el BHI a 35 °C por 18 a 24 horas.
- Añadir aproximadamente 5 mL de plasma de conejo a un tubo estéril y tomar de 1 a 2 asadas del cultivo de BHI y mezclar.
- Incubar a 35 °C y examinar cada 6 horas para observar la formación del coagulo.
- Solo si se observa un coagulo firme y completo que permanece en su lugar cuando el tubo es inclinado o invertido, se considera positiva la prueba para ***Staphylococcus aureus***.
- Realizar la tinción al Gram y observar la morfología microscópica.

4.6.2.4 Prueba de la Catalasa

- Con el crecimiento positivo en agar Baird Parker, para la prueba de la catalasa, colocar una gota de peróxido de hidrogeno en un porta objetos y con el asa bacteriológica, se toma una colonia de la placa y se coloca en la gota de peroxido. La producción de burbujas de gas corresponde a una prueba positiva para ***St. aureus***.

4.6.3 AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *Salmonella sp* ⁽⁹⁾ (Ver anexo N° 8)

4.6.3.1 Enriquecimiento

- Asépticamente pesar 25.0 g de muestra (vísceras o carne) en una bolsa plástica estéril.
- Añadir 225 mL de caldo lactosado y mezclar en el stomacher por 2 minutos.
- Transferir la mezcla homogenizada a un erlenmeyer de 250 mL y dejar incubando a 35 °C por 24 horas.

4.6.3.2 Aislamiento e Identificación de *Salmonella sp*

- Transferir 0.1 mL de la mezcla a 10 mL de medio Rappaport –vasiliadis y 1 mL a 10 mL de medio Tetrionato.
- Incubar el medio Rappaport –vasiliadis por 24 ± 2 horas a 42 ± 0.2 °C (en baño de agua con controlador termostático) y el medio Tetrionato en incubadora a 35 °C por 24 horas.
- Mezclar y estriar con asa bacteriológica del caldo Rappaport –vasiliadis y Tetrionato, en Agar Bismuto Sulfito (BSA), agar Xilosa Lisina Desoxycolato (XLD) y agar Enterico de Hektoen (HE).
- Incubar las cajas 24 ± 2 horas a 35 °C.
- Examinar las placas buscando colonias sospechosas de *Salmonella sp*, en HE las colonias son azul verdosas o azul sin centro negro, en BSA las colonias pueden ser cafés grises o negras algunas veces tienen brillo metálico, en XLD colonias rosadas con o sin centro negro.

- De las anteriores colonias sospechosas positivas realizar las pruebas bioquímicas: TSI, Indol, Citrato, Movilidad, Voges-Proskauer y Rojo de Metilo (ver anexo N° 9).

4.6.4 AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *Listeria monocytogenes* ⁽⁹⁾ (Ver Anexo N° 10)

4.6.4.1 Enriquecimiento selectivo

- Pesar asépticamente 25.0 g de la muestra (vísceras o musculo).
- Agregar 225 mL de caldo de enriquecimiento LEB en bolsas estériles.
- Homogenizar durante 2 minutos en el Stomacher.
- Incubar a 35 °C durante 24 horas.

4.6.4.2 Siembra en medios selectivos e identificación

- Después de 24 horas de incubación, estriar del cultivo LEB en forma duplicada en placas de agar Oxford (OXA) y en agar Palcam.
- Incubar las placas Oxford y Palcam a temperatura ambiente o a 37 °C durante 48 horas.
- Después de incubadas las placas de Oxford y Palcam por 48 horas, se refrigeran las placas a 4 °C por otras 48 horas.
- En agar Palcam y Oxford las colonias son negras grisáceas umbilicadas.
- Transferir 5 o más colonias típicas del agar Palcam en forma duplicada en placas de TSA + EY (Agar Soya Tripticasa + Extracto de Levadura).
- Incubar las placas de TSA + EY a 35 °C por 24-48 horas.
- Las placas de TSA + EY que presenten colonias de color azul-gris son Positivas.
- Realizar pruebas bioquímicas: TSI, Voges-Proscauer, Indol, Rojo de Metilo, Citrato, Movilidad (ver anexo N° 9).

4.6.4.3 Pruebas presuntivas: Catalasa

- Se escoge una colonia típica de una placa de TSA + EY con asa en punta y se coloca sobre un porta objeto conteniendo una gota de Peróxido de hidrogeno, un burbujeo en los primeros segundos indica reacción positiva.

4.6.4.4 Prueba de CAMP

- En placas que contengan agar sangre de oveja desfibrinada estriar un cultivo de ***Staphylococcus aureus*** β hemolítico y otro de ***Rhodococcus equi*** en paralelo y diametralmente opuesto el uno del otro. Luego estriar el inóculo en prueba en forma vertical (recto) y paralela al estriado anterior de ***Staphylococcus aureus*** y ***Rhodococcus equi***.
- Incubar las placas a 35 °C por 24 horas.
- Examinar las placas y observar la hemólisis si la estría vertical (inóculo en prueba) da un halo en forma de flecha con respecto a la estría del ***Staphylococcus aureus*** es prueba positiva.

4.6.5 AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE ***Vibrio parahaemolyticus***. ⁽⁹⁾

(Ver Anexo N° 11)

4.6.5.1 Enriquecimiento

- Pesar 25.0 g de la muestra agregándolos en 225 mL de APB y colocar al stomacher por 2 minutos, luego pasar a erlenmeyer de 250 mL esta será la dilución 1:10 (10^{-1}).
- Transferir 10 mL de la Dilución 1:10 a un frasco de dilución que contiene 90 mL de APB, para formar la dilución 1:100.

- Pipetear 10 mL de la Dilución 1:100 a un frasco de dilución que contiene 90 mL de APB, para formar la dilución 1:1000.
- Incubar las diluciones a 35-37 °C por 12-16 horas.

4.6.5.2 Aislamiento e Identificación

- No agitar los frascos con las diluciones después de la incubación.
- Estriar en agar TCBS de cada dilución tomando una asada 1 cm. Debajo de la superficie del medio.
- Incubar a 35-37 °C por 18-24 horas
- Examinar las placas con agar TCBS e identificar las colonias típicas de **Vibrio**. Colonias típicas de **Vibrio parahemolyticus** en TCBS: colonias redondas, de 2-3 mm de diámetro, de color verde a azul verdoso, algunas son más grandes y amarillas (ácido producido por la fermentación de la sucrosa).
- Picar tres o más colonias típicas o sospechosas de cada medio e inocular por el método de estrías en agar TSA + 8 % NaCl.
- Incubar a 35-37 °C por 14-18 horas.
- la formación de colonias color crema es crecimiento positivo.

4.6.5.3 Prueba de oxidasa:

- Colocar 2 o 3 gotas de reactivo de la prueba de oxidasa sobre el crecimiento bacteriano positivo del medio agar TSA + 8 % NaCl un cambio en la coloración de la colonia a azul es reacción positiva.
- También se puede transferir una pequeña cantidad del crecimiento bacteriano positivo del medio agar TSA + 8% NaCl. con un palillo estéril a un papel filtro humedecido con reactivo oxidasa. Un color azul oscuro se desarrollará rápidamente para reacción positiva.

4.6.5.4 Pruebas Bioquímicas: Realizar TSI, Voges-Proscauer, Indol, Rojo de Metilo, Movilidad (ver anexo N° 9).

4.7 ANALISIS BACTERIOLOGICO DEL AGUA DEL ESTANQUE ⁽⁹⁾

(Ver Anexo N° 12)

Método de los tubos múltiples, método corto ⁽⁹⁾

4.7.1 Determinación de Coliformes Totales ⁽⁹⁾

- Adicionar 10 mL de agua del estanque en cada uno de 5 tubos con 10 mL de caldo Fluorocult LMX de doble concentración.
- Colocar 1.0 mL de agua del estanque en cada uno de 5 tubos con 10 mL de caldo Fluorocult LMX de concentración simple.
- Después se coloca 0.1 mL de agua en cada uno de 5 tubos con 10 mL de caldo Fluorocult LMX de concentración simple.
- Luego se agita cada uno de los tubos e incuba la gradilla conteniendo los 15 tubos de 35 a 37 °C durante 24-48 horas.
- Al finalizar el periodo de incubación se procede a la lectura. La presencia de Coliformes totales se observa por una coloración azul verdosa, en el medio del cultivo.

4.7.2 Determinación de Coliformes Fecales ⁽⁹⁾

- De los tubos con reacción positiva de coliformes totales: Con asa estéril Transferir tres asadas de cada tubo que contiene 10 mL de caldo EC con campana de Durhman.
- colocar los tubos en Baño María a temperatura de 44 °C durante 24-48 horas.

- Finalizando el periodo de incubación observar los tubos, la presencia de gas en las campanas de Durham determina la presencia de coliformes fecales en la muestra.

4.8 ANALISIS BACTERIOLOGICO DE MUESTRAS DE MANOS DE LOS MANIPULADORES⁽⁹⁾ (Ver Anexo N° 13)

4.8.1 Recuento de *Staphylococcus aureus*:⁽⁹⁾

Recuento en placa⁽¹³⁾

- Agitar la muestra fuertemente.
- Pipetear 0.3, 0.3 y 0.4 mL de la muestra y colocarlas en 3 placas conteniendo Agar Baird Parker.
- Esparcir con rastrillo de vidrio.
- Incubar las placas a 35-37 °C por 24-48 horas.
- Observar el desarrollo de colonias sospechosas de *S. aureus*: colonias de aspecto negro, brillante, o gris oscuro, con formación de halo alrededor de la colonia.
- Confirmar las colonias sospechosas; seleccionando 5 colonias sospechosas y sembrar en BHI e incubar, a las 24 horas sembrar en tubos con plasma e incubar, observar la formación de un coágulo, que no se deshace al invertir el tubo esto indica prueba positiva.

4.8.3 Determinación de *Escherichia coli*⁽⁹⁾

- Agitar la muestra fuertemente
- Pipetear 1.0 mL de la muestra y colocarlo en 1 tubo conteniendo caldo fluorocult LMX.
- Incubar a 35-37 °C por 24-48 horas.

- Observar si hay cambio de color en el medio (coloración azul-verdoso es positivo).
- Agregar 5 gotas de reactivo de Kovac por las paredes del tubo si hay formación de un anillo rojizo en la interface es prueba positiva.
- De los tubos positivos tomar una asada y sembrar en placas con agar EMB.
- Incubar a 37 °C por 24-48 horas.
- El desarrollo de colonias con brillo metálico confirma la presencia de ***Escherichia coli***.

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

Durante la realización de la investigación de campo se observaron las instalaciones de los estanques del cantón Atiocoyo y por medio de una guía de inspección basada en las Buenas Prácticas Acuícolas (BPA) se diagnostico si se da el cumplimiento o no de las BPA en las granjas de cultivo de tilapia del cantón Atiocoyo.

Se recolectaron las muestras del manipulador (manos), agua del estanque y tilapia y se realizaron los análisis bacteriologicos de laboratorio donde se determino la presencia de las siguientes bacterias: a las manos del manipulador ***Staphylococcus aureus*** y ***Escherichia coli***, al agua del estanque Coliformes Totales y Coliformes fecales, al músculo y vísceras de la tilapia ***Escherichia coli***, ***Staphylococcus aureus***, ***Salmonella sp***, ***Listeria monocytogenes*** y ***Vibrio parahaemolyticus***. Cada una de estas determinaciones se realizo con muestras que fueron seleccionadas representativamente con la probabilidad de diagnosticar al menos una tilapia como realmente positivo del 97.6 %, con el fin de determinar el perfil bacteriológico de las tilapias cultivadas en el cantón Atiocoyo.

Los resultados obtenidos fueron comparados con las respectivas normativas para el caso de los manipuladores con la normativa de Perú del Ministerio de Salud para superficies vivas (manos), para el agua del estanque con la normativa de aguas recreacionales OMS (Organización Mundial para la Salud) y para la tilapia con la normativa del RTCA Microbiológico (Reglamento Técnico Centroamericano) 67.04.50:08.

Estos resultados se proporcionaron a las autoridades del MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería) quienes como institución oficial dieron a conocer al

productor en que cumple y en que no, para así comenzar a someterse al proceso de certificación de su granja mejorando los aspectos en que ha fallado y poder exportar en un futuro la tilapia que cultiva.

Para la investigación se tomo en cuenta el estudio de bacterias indicadoras de contaminación como: ***Escherichia coli***, Coliformes Totales, Coliformes Fecales, ***Staphylococcus aureus*** y bacterias patógenas como: ***Salmonella sp***, ***Listeria monocytogenes*** y ***Vibrio parahaemolyticus***.

En el que la presencia de ***Escherichia coli*** , Coliformes Totales y Coliformes Fecales es un indicador de contaminación directa o indirecta de origen fecal cuyo hábitat natural es el tracto digestivo del hombre y animales , por lo tanto, su presencia nos informa una baja calidad higiénica y una limpieza y desinfección nula o no adecuada. La presencia de ***Staphylococcus aureus*** se interpreta como indicativo de contaminación a partir de la piel, boca y las fosas nasales de los manipuladores directos, así como de material, equipos y utensilios sucios dando indicios que han existido malos hábitos de higiene personal.

La contaminación de la tilapia por bacterias patógenas como: ***Salmonella sp***, ***Listeria monocytogenes*** y ***Vibrio parahaemolyticus*** representan un potencial peligro para la salud de los consumidores y su presencia depende principalmente del medio ambiente donde se encuentra la zona de cultivo y de la calidad del agua utilizada.

Cuadro N° 8: Resultados de la Guía de Inspección realizada a las granjas de cultivo de tilapia del cantón Atiococho

N°	REQUISITO EVALUADO	Granja N° 1		Granja N° 2		Granja N° 3		Granja N° 4		Granja N° 5		Granja N° 6		Granja N° 7		Granja N° 8		Granja N° 9		Granja N° 10	
		C	NC	C	NC																
1	Selección del sitio de cultivo: diseño, construcción e instalaciones (Incluye del aspecto N° 1 al 3).	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	3	0
2	Riesgo de la granja (Incluye el aspecto N° 4).	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0
3	Medidas de bioseguridad (Incluye del aspecto N° 5 al 10).	3	3	2	4	1	5	2	4	2	4	3	3	3	3	1	5	3	3	5	1
4	Manejo de equipo y utensilios (Incluye del aspecto N° 11 al 12).	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	2	0
5	Sistema de control de plagas (Incluye del aspecto N° 13 al 14).	1	1	1	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	2	1	1	2	0
6	Manejo del agua de cultivo (Incluye del aspecto N° 15 al 17).	2	1	1	2	1	2	1	2	1	2	2	1	2	1	1	2	2	1	3	0
7	Medidas de sanidad del personal y las tilapias (Incluye del aspecto N° 18 al 23).	2	4	2	4	1	5	1	5	1	5	2	4	2	4	1	5	2	4	2	4
8	Manejo del alimento para la tilapia (Incluye del aspecto N° 24 al 27).	3	1	2	2	1	3	2	2	2	2	3	1	3	1	1	3	3	1	3	1
9	Manejo de desechos: basura orgánica e inorgánica (Incluye del aspecto N° 28 al 29).	2	0	2	0	1	1	2	0	2	0	2	0	2	0	1	1	2	0	2	0
10	Manual de Buenas Prácticas Acuícolas (Incluye el aspecto N° 30).	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0

En el cuadro N° 8 se resumen los resultados de los aspectos evaluados en la guía de inspección (ver anexo N° 5) que se pasó durante el muestreo realizado a las 10 granjas en estudio, se detallan los requisitos que manda a cumplir las Buenas Prácticas Acuícolas (BPA) para una granja de cultivo de tilapia en cuanto a infraestructura, instalaciones, diseño y construcción del sitio de cultivo, riesgo de la granja, medidas higiénicas, equipo y utensilios entre otros, cabe mencionar que estos requisitos fueron tomados de un Manual de Buenas Prácticas Acuícolas Mexicano ⁽⁸⁾.

Los números que se observan en el cuadro representan el número de aspectos Conformes y No Conformes por requisito evaluado por ejemplo para la Granja N° 1 en el requisito N° 1: Selección del sitio de cultivo, se incluye la evaluación de 3 aspectos de la Guía de inspección (ver anexo N° 5) y de estos se obtuvo el resultado de 1 Conforme (C) y 2 No Conforme (NC) haciendo el total de los tres aspectos evaluados en este requisito; este mismo procedimiento se siguió para las demás granjas y para el resto de requisitos evaluados obteniéndose así todos estos datos, con el fin de diagnosticar los aspectos Conformes, es decir los que si cumplen con los requerimientos y poder con este resultado (numero de conformes) decir en porcentaje el cumplimiento de las Buenas Prácticas Acuícolas (BPA) en las granjas del cantón Atiocoyo.

En general las granjas en estudio dieron resultados que indican que están deficientes en el cumplimiento de los requisitos de las BPA, ya que solo la granja N° 10 obtuvo el mayor número de aspectos conformes en total 24 Conformes de los 30 aspectos evaluados, mientras que las granjas N° 3 y 8 son las que obtuvieron el menor número de aspectos conformes 6 aspectos Conformes de los 30 evaluados, por ende se espera que estas sean las granjas con menor porcentaje de cumplimiento.

Cuadro N° 9: Porcentaje de Cumplimiento de las Buenas Prácticas Acuícolas (BPA) por Granja de cultivo.

N° DE LA GRANJA	PORCENTAJE DE CUMPLIMIENTO (%)
1	50
2	36
3	20
4	33
5	33
6	46
7	50
8	20
9	50
10	80

El cuadro N° 9 muestra en porcentaje el cumplimiento de las BPA por granja, cuyo porcentaje se obtuvo de realizar una regla de tres en el que se incluía el número de aspectos conformes (cumplía con los requerimientos) y obtener así el porcentaje, en general las granjas de cultivo de tilapia se sitúan de mal a regular ya que en su mayoría (6 granjas) cumplen abajo del 50 % y solo cuatro cumplen igual o mayor del 50 %, el orden de menor a mayor cumplimiento es el siguiente: la granja N° 3 y N° 8 fueron las que menor porcentaje de cumplimiento obtuvieron del 20 %, seguidas de la granja N° 4 y 5 que obtuvieron un 33 %, luego la granja N° 2 que obtuvo un 36 % y la granja N° 6 que obtuvo un 46 % , las que tienen el 50 % de cumplimiento son la granja N° 1, 7 y 9 la que mejor porcentaje obtuvo fue la granja N° 10 quien obtuvo un 80 % siendo la única granja (de las 10) que si cumple los requerimientos de las BPA.

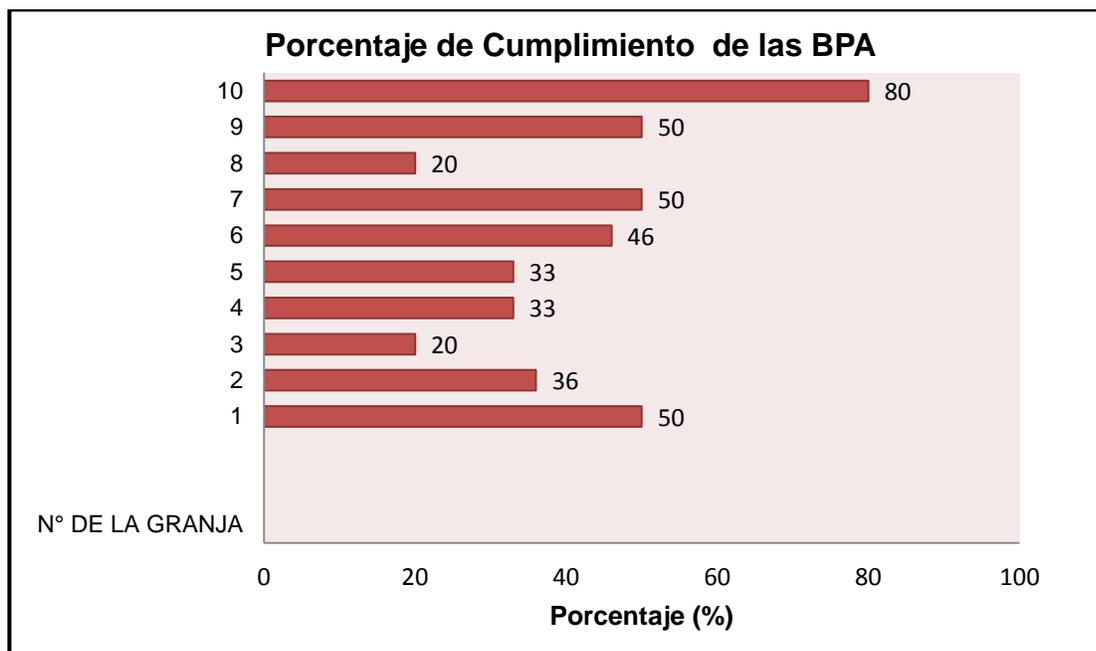


Figura N° 21: Grafico de las granjas de cultivo de tilapia con su respectivo porcentaje de cumplimiento de las BPA.

En la figura N° 21 se reflejan los resultados del cuadro N° 9, donde la granja N° 10 tiene un porcentaje del 80 % del grafico siendo la más alta reflejando que es la que cuenta con infraestructura, medidas de higiene, diseño y construcción adecuada para el cultivo de tilapia sin riesgo alguno mientras que la granja N° 3 y 8 son las que tienen menor porcentaje del 20 % en el grafico debido a que son deficientes en todos los aspectos antes mencionados. En el grafico se puede ver como en su mayoría las granjas están en el mismo porcentaje las más aceptables son la granja N° 1, 7 y 9 y la 10 que es la única que cumple. Por lo que se diagnostico que en general las granjas de cultivo de tilapia del cantón Atiocoyo, San Pablo Tacachico, La Libertad están deficientes en el cumplimiento de las buenas prácticas acuícolas y necesitan mejorar en aspectos importantes para tener un menor riesgo de contaminación bacteriana y que su producto (tilapias) sean aptos para el consumo humano.



Figura N° 22: Infraestructura, Diseño y construcción de las granjas

En cuanto a la infraestructura de las granjas de cultivo podemos decir que no hay una separación de áreas todo está junto el alimento de la tilapia (concentrado), los utensilios: redes, atarrayas, baldes, compresor de oxígeno, canastas, hieleras, botas entre otras cosas como se muestra en la figura N° 22 esto implica un riesgo de contaminación cruzada por lo que no cumplen con los requisitos de las BPA de tener un manejo adecuado del alimento, un diseño y construcción adecuado a las necesidades y un equipo, utensilios desinfectados siendo no aptos para el uso directo con la tilapia.

En general las condiciones no son las adecuadas por lo que en su mayoría (8 granjas) no cumplen con estos requisitos a excepción de la granja N° 10 y 9 que si cumple con ellos.



Figura N° 23: Presencia de Animales domésticos, vacas, caballos y aves.

Del personal (manipuladores) podemos decir que no poseían la indumentaria requerida para el trabajo de cultivo de tilapia como el portar botas y ropa diferente a la de uso diario, entre otros además hay presencia de mascotas domesticas como perros, gatos y demás animales de crianza como caballos, vacas, gallinas cercanos a los estanques como se muestra en la figura N° 23, por lo cual hace que no cumplan con los requisitos de Medidas de bioseguridad,

sistema de control de plagas y medidas de sanidad que especifican las BPA 9 de las 10 granjas no cumplen con dichos requerimientos la única que cumple con estos aspectos es la granja N° 10.



Figura N° 24: Tecnología (aireadores) y Manejo del agua de cultivo

Algunas de las granjas poseen un tipo de tecnología que ayuda a un óptimo crecimiento de la tilapia como lo son los aireadores (ve figura N° 24) que proporcionan oxígeno necesario para la población de peces de sus estanques, las granjas que poseen este sistema son la N° 6, 7, 9 y 10. Con respecto al manejo del agua de cultivo esta es proveniente del río Sucio y los estanques que se abastecen de este para cultivar la tilapia son la gran mayoría (de la granja N° 1 a la 8) y solo dos de ellas (la granja N° 9 y 10) se abastecen de agua de pozo que poseen en su granja (ver figura N° 24).

Los estanques que utilizan el agua del río no poseen sistema de filtro solo tienen una tipo malla o zaranda en el canal de entrada del agua, también la zona posee un sistema arquitectónico en donde hay un canal a las orillas de cada calle por la cual entra y sale el agua del río sucio y abastece cada una de las granjas como se observa en la figura N° 11 y sobre las granjas que poseen agua de pozo estas si tienen un sistema de tuberías que sirve de filtro para esta agua.

Cuadro N° 10: Resultados de las determinaciones del Manipulador

Granja Especificación	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<1 NMP/100mL	< 100 UFC/manos
N°1	1.8 NMP/100mL	<1 UFC/manos
N°2	21 NMP/100mL	<1 UFC/manos
N°3	78 NMP/100mL	<1 UFC/manos
N°4	13 NMP/100mL	<1 UFC/manos
N°5	24 NMP/100mL	<1 UFC/manos
N°6	21 NMP/100mL	<1 UFC/manos
N°7	17 NMP/100mL	<1 UFC/manos
N°8	17 NMP/100mL	<1 UFC/manos
N°9	25 NMP/100mL	<1 UFC/manos
N°10	< 1 NMP/100mL	<1 UFC/manos

Los resultados de los análisis realizados a los manipuladores presentados en el cuadro N° 10 se puede observar que los manipuladores no estaban contaminados con *Staphylococcus aureus*, se logro identificar *Staphylococcus epidermidis* como se muestran en las figura N° 25 en donde se aprecia el crecimiento de colonias negras en agar Baird Parker características de *Staphylococcus aureus* al realizarles las pruebas

confirmativas dio negativo a la formación de coagulo y la catalasa y estos resultados confirmaron que la bacteria presente era el ***Staphylococcus epidermidis***, lo cual no representa un peligro de contaminación debido a que es de la flora normal en la piel de los humanos y es muy difícil que provoque contaminación cruzada en los alimentos para el caso las tilapias.

En la figura N° 26 se muestran las pruebas de confirmación: fluorescencia con la lámpara de luz UV y la tinción Gram que revelo bacilos cortos Gram- por lo cual se logro identificar ***Escherichia coli*** que significa que hay una contaminación de origen fecal ya que esta bacteria no es de la flora normal de la piel si no de los intestinos esto nos indica que hay una deficiente higiene por parte de los manipuladores.

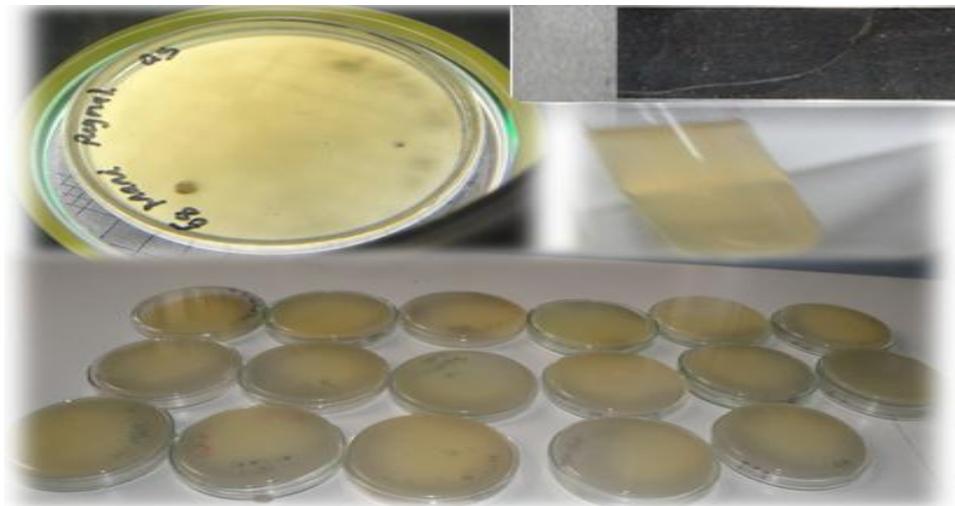


Figura N° 25: pruebas para confirmar presencia de ***Staphylococcus aureus***.

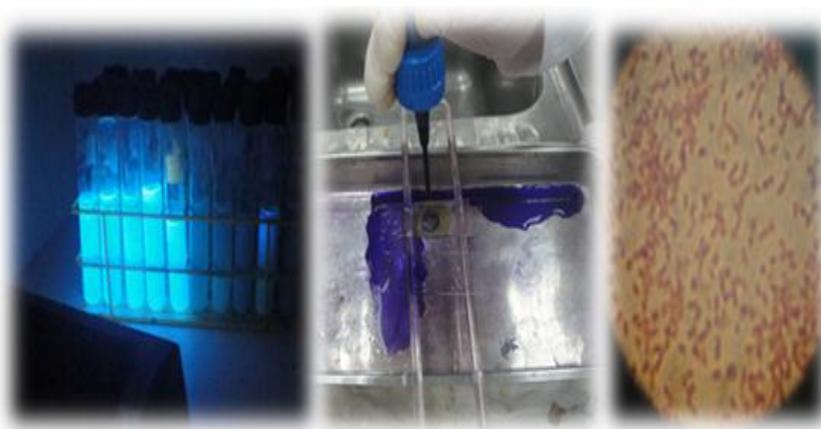


Figura N° 26: pruebas de confirmación para *Escherichia coli*



Figura N° 27: Toma de muestra del manipulador

En la figura N° 27 se muestra el momento en que se tomaban las muestras a los manipuladores en lo cuales se observó que en algunos casos presentaban uñas largas y sucias, otros tenían pulseras de plástico y la gran mayoría no usaban la ropa adecuada como gorros y botas solo en la granja 10 los manipuladores contaban con la indumentaria adecuada para trabajar dentro de las instalaciones de la granja por lo que en este caso no se encontró contaminación por *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Las malas prácticas higiénicas de tener uñas largas y sucias, pulseras de plástico pudieron haber sido factores determinantes en la contaminación por *Escherichia coli* debido a que estos suelen ser por lo general reservorios para la *Escherichia coli* y de esta manera el manipulador puede contaminar a las tilapias, con lo que se demuestra la falta de higiene y los malos procedimientos al momento de lavarse las manos lo que nos lleva a que un procedimiento adecuado de lavado de manos evita la contaminación cruzada en las tilapias con las que se están en contacto directo.

Cuadro N° 11 Resultados de las determinaciones del Agua del Estanque

Granja Especificación	COLIFORMES TOTALES	COLIFORMES FECALES
	Agua de estanque 2000 NMP/100mL	Agua de estanque 1000 NMP/100mL
N°1	140 NMP/100mL	84 NMP/100mL
N°2	920 NMP/100mL	540 NMP/100mL
N°3	> 1,600 NMP/100mL	920 NMP/100mL
N°4	240 NMP/100mL	110 NMP/100mL
N°5	350 NMP/100mL	70 NMP/100mL
N°6	140 NMP/100mL	49 NMP/100mL
N°7	920 NMP/100mL	350 NMP/100mL
N°8	280 NMP/100mL	110 NMP/100mL
N°9	150 NMP/100mL	31 NMP/100mL
N°10	47 NMP/100mL	23 NMP/100mL

Los resultados bacteriológicos obtenidos de los análisis del agua de estanque de las 10 granjas fueron aceptables para las granjas N°1, N°2, N°4, N°5, N°6, N°7, N°8 y N°9 para los límites de Coliformes totales y Coliformes fecales que establece la normativa de la Organización Mundial para la Salud (OMS) porque como se puede ver en el cuadro N° 11 están dentro de los límites máximos permisibles por lo que las aguas analizadas desde el punto de vista bacteriológico son aceptables al igual que la granja N°10 en donde la fuente del agua es de pozo además posee los valores de Coliformes totales y fecales mas bajos, no así para el caso de la granja N° 3 ya que esta sobrepasa los límites máximos permisibles de Coliformes totales y aunque si este dentro de los límites los Coliformes fecales pero para que cumpla con la normativa ambos parámetros (Coliformes totales y Coliformes fecales) tienen que cumplirse; por lo que desde el punto de vista bacteriológico esta agua no es apta para la crianza de tilapias.



Figura N° 28: Estanques del Cantón Atacocayo

Como se puede observar en la figura N° 28 los estanques del agua se encuentran en áreas en donde no hay peligro de contaminación en cuanto a Coliformes totales y Coliformes fecales ya que alrededor no hay fosas o letrinas, la causa por la cual hay presencia de Coliformes totales y Coliformes fecales,

es porque la fuente del agua es del río sucio pero el hecho de que estos no sobrepasen los límites máximos permisibles que establece la normativa de la Organización Mundial para la Salud (OMS), pueda deberse a que antes de llenar los estanques con agua son previamente desinfectados con cal y hay recambios continuos de agua en el estanque.

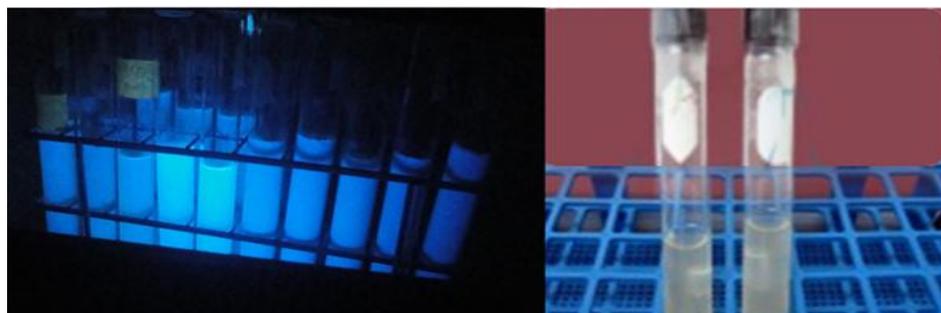


Figura N° 29: Prueba positiva para *E. coli* en muestras de agua

Pero estas condiciones no se pudieron observar en la granja N°3 en donde los estanques de dicha granja si se encontraban cerca de fuentes de contaminación como perros que se bañaban dentro de los estanques, ganado a los alrededores, falta de higiene por parte de los manipuladores y el concentrado con el cual alimentan a los peces se encontraba almacenado en un área que no es la adecuada ya que en el lugar habitan perros y gatos, también se logro ver que en el lugar tenían plagas de ratas, todo esto contribuyo a la contaminación del estanque de la granja N° 3 por Coliformes totales y Coliformes fecales.

En la figura N° 29 se muestran los resultados de las coloraciones para confirmar Coliformes totales y Coliformes fecales los cuales dieron coloración verde en el medio LMX y de estos tubos positivos se pasaron a caldo EC en este medio se observó formación de gas lo cual indicó prueba positiva para *Coliformes fecales* y para el caso de Coliformes totales se identificaron porque estas bacterias en caldo EC no forman gas.

Cuadro N° 12: Resultados de las determinaciones realizadas al músculo y vísceras de la tilapia.

Granja Especificación	<i>Escherichia coli</i>		<i>Salmonella sp</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Listeria monocitogenes</i>		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	
	Carne 10 ² UFC/g	Viscera 10 ² UFC/g	Carne	Viscera	Carne 10 ³ UFC/g	Viscera 10 ³ UFC/g	Carne	Viscera	Carne	Viscera
N°1	133x10 ²	69 x10 ²	A	A	0	0	A	A	A	A
	145 x10 ²	75 x10 ²	A	A	0	0	A	A	A	A
N°2	140 x10 ²	72 x10 ²	A	A	0	0	A	A	A	A
	136 x10 ²	81 x10 ²	A	A	0	0	A	A	A	A
N°3	502 x10 ²	108 x10 ²	A	A	0	0	A	A	A	A
	487 x10 ²	111 x10 ²	A	A	0	0	A	A	A	A
N°4	242 x10 ²	406x10 ²	A	A	0	0	A	A	A	A
	231 x10 ²	392 x10 ²	A	A	0	0	A	A	A	A
N°5	250 x10 ²	119 x10 ²	A	A	0	0	A	A	A	A
	258 x10 ²	121 x10 ²	A	A	0	0	A	A	A	A
N°6	195 x10 ²	83 x10 ²	A	A	0	0	A	A	A	A
	208 x10 ²	90 x10 ²	A	A	0	0	A	A	A	A
N°7	230 x10 ²	60 x10 ²	A	A	0	0	A	A	A	A
	229 x10 ²	70 x10 ²	A	A	0	0	A	A	A	A
N°8	453 x10 ²	310 x10 ²	A	A	0	0	A	A	A	A
	458 x10 ²	306 x10 ²	A	A	0	0	A	A	A	A
N°9	200 x10 ²	361 x10 ²	A	A	0	0	A	A	A	A
	212 x10 ²	354 x10 ²	A	A	0	0	A	A	A	A
N°10	707 x10 ²	161 x10 ²	A	A	0	0	A	A	A	A
	711 x10 ²	173 x10 ²	A	A	0	0	A	A	A	A

*A = Ausencia 0= Ningún crecimiento de colonia (UFC)

El tipo de bacteria predominante tanto en muestras de carne y vísceras fue la ***Escherichia coli*** que formo colonias características de color morado en agar cromocult coliforms como se muestra en la figura N° 30 esta bacteria se identifico en todas las muestras analizadas y sobrepasando los limites máximos permisibles establecidos por la normativa del RTCA (Reglamento Técnico Centroamericano) 67.04.50:08. La presencia de ***Escherichia coli*** se atribuye a las descargas fecales provenientes del rio sucio debido que aunque no se analizo la presencia de ***Escherichia coli*** en el agua pero si la presencia de coliformes ya que estos tipos de bacterias están presente en la flora del intestino por lo que ellas en conjunto son un indicador de contaminación fecal, y la presencia de ***Escherichia coli*** también se le atribuye a los desechos del fileteado que arrojan los pescadores en los alrededores de los estanques.

La carga bacteriana de ***Escherichia coli*** fue mayor en carne que en vísceras esto puede deberse a que la carne es la que esta en contacto directo con el agua que se presume tiene la presencia de ***Escherichia coli*** y las tilapias constantemente están recirculando y al mismo tiempo eliminando las bacterias que no son de su flora normal.

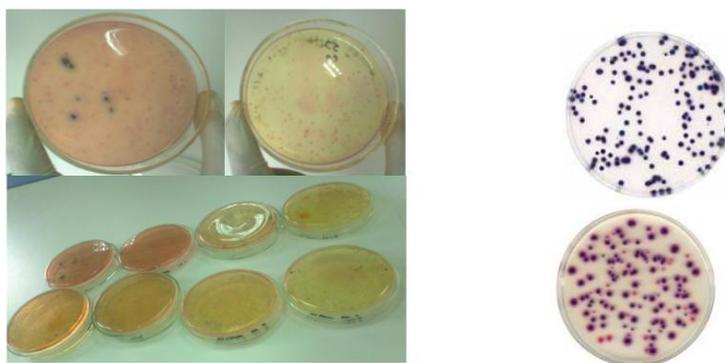


Figura N° 30: Prueba positiva en médio Cromocult para ***E. coli***

Para el caso de los análisis en los cuales se quería aislar, identificar y confirmar: ***Staphylococcus aureus***, ***Listeria monocytogenes***, ***Vibrium parahaemolyticus*** y ***Salmonella sp*** no se encontró presencia de dichas bacterias patógenas en todas las granjas salvo el caso de la granja N° 3 en la cual se logro identificar ***Listeria sp*** y ***Vibrium sp*** no se logro tipificar debido a que en medios selectivos como agar Oxford y palcam para ***Listeria*** figura N° 31 se presumía la presencia de ***Listeria monocytogenes*** pero al realizar las pruebas confirmativas de Camp y las bioquímicas Figura N° 32 resultaron negativas para su confirmación por lo cual solamente se identifico que había presencia de ***Listeria sp*** .

Así mismo para la identificación de ***Vibrium parahaemolyticus*** que en medio selectivo agar TCBS Figura N° 33 crecieron colonia sospechosas tanto de ***Vibrium parahaemolyticus*** como de ***Vibrium cholerae*** que pero dichas colonias al realizarles la prueba de oxidasa resultaron positivas pero en las pruebas bioquímicas se logro identificar solo ***Vibrium sp.***

Para ambos casos de la granja N° 3 se puede afirmar que la fuente de contaminación es proveniente de las heces de animales como vacas, perros, gatos y palomas y al observar las condiciones de la granja se pudo ver que presentaban un alto grado de mortalidad en las tilapias, por otro el ganado de vacas estaba a las orillas de los estanques, también llegaban depredadores de tilapias como palomas a los estanques. Todos estos factores contribuyeron a que en la granja N° 3 hubiera presencia de ***Listeria sp*** y ***Vibrium sp.***

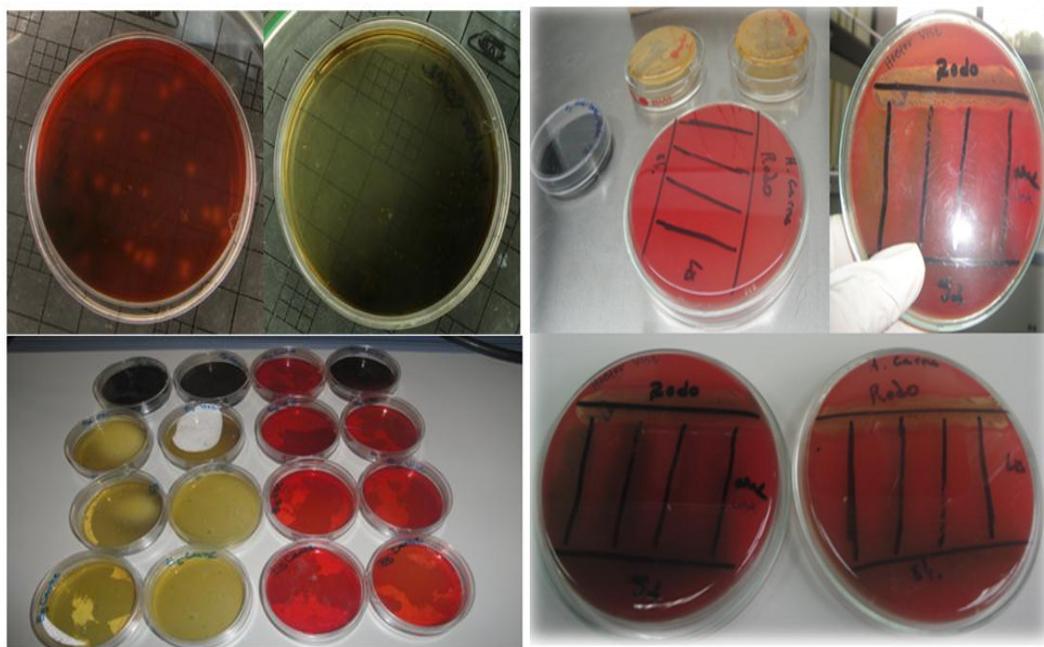


Figura N° 31: Medios selectivos Oxford y palcam y Prueba de CAMP para *Listeria monocytogenes*.



Figura N° 32: pruebas bioquímicas para *Listeria monocytogenes*

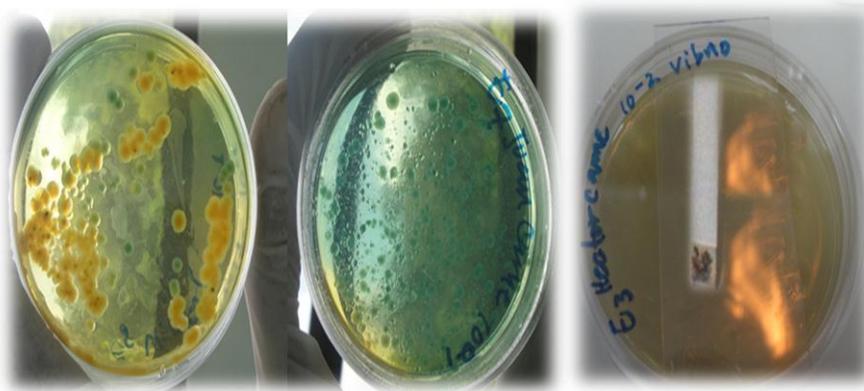


Figura N° 33: Medios selectivo TCBS y prueba de oxidasa para *Vibrium parahaemolyticus*

A este caso de mortalidad se le dio seguimiento y se hicieron acciones correctivas como el recambio de agua, remoción de todo el lodo el cual podía ser el nicho de las bacterias identificadas; la desinfección de los estanques con cal y la aplicación de antibiótico en el agua de estanque.

Cuando se realizo la posterior visita para ver en que condiciones seguía el estanque se verifico que los índices de mortalidad habían disminuido casi en un 100% debido las acciones correctivas que se realizaron.

Los resultados obtenidos fueron entregados a las autoridades del Ministerio de Agricultura y Ganadería (ver anexo N° 16) específicamente a la división de servicios veterinarios sanidad acuícola quien se los daría a conocer a los productores que se sometieron al muestreo para brindarle en que está cumpliendo y en que esta deficiente para que lo mejore y este apto para que su granja se someta al proceso de certificación y pueda exportar la tilapia que cultiva.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. La granja que mejor evaluación obtuvo en cuanto a las buenas practicas acuícolas fue la granja N^o 10 con un porcentaje de cumplimiento del 80%, por otra parte las granjas con menor porcentaje en el cumplimiento de las buenas practicas acuícolas fueron las granjas N^o 3 y N^o 8 con un 20% y en general la mayoría de las granjas no cumplen con los requisitos de infraestructura en especial en el aspecto de evaluar los puntos de riesgos que pueden significar fuentes de contaminación.
2. La bacteria que se identifico en todas las muestras de manos de los manipuladores de las granjas en estudio excepto en la granja N^o10 fue ***Escherichia coli*** sobrepasando los límites establecidos por la Guía Técnica para el Análisis Microbiológico de Superficies en contacto con Alimentos y Bebidas, proveniente de las Normas Legales de Perú. Lo que indica una contaminación de origen fecal por malas practicas higiénicas de parte del personal relacionados con el correcto lavados de manos.
3. El género ***Escherichia coli*** es un indicativo de contaminación fecal y fue identificada en todas las muestras de tilapia tanto en carne como en vísceras su presencia se atribuye a la carga bacteriana del agua del rio sucio como también a la contaminación aportada por el manipulador y los utensilios que no son desinfectados antes de su utilización.
4. En la granja N^o 3 se identificaron bacterias del genero ***Listeria sp*** y ***Vibrium sp*** las causas predominantes de este tipo de contaminación es el mal manejo de los desechos que se originan en la granja y

hacinamiento en el lugar ya que a parte del cultivo de tilapias hay ganado y crianza de gallinas las cuales son portadores de este tipo de bacterias.

5. La mortalidad de las tilapias de la granja N° 3 es causada probablemente por la presencia de ***Listeria sp***, ***Vibrium sp***, a la alta carga bacteriana de ***Escherichia coli***, Coliformes totales y Coliformes fecales.
6. En general comparando los resultados con la normativa del RTCA (Reglamento Técnico Centroamericano) 67.04.50:08 la bacterias que se encontraron en la mayoría de muestras fueron ***Escherichia coli***, Coliformes totales y Coliformes fecales que son indicadores de contaminación fecal originados por malas practicas higiénicas.
7. Los limites de Coliformes totales y Coliformes fecales del agua de los estanques están dentro de lo que especifica la normativa de la Organización Mundial para la Salud (OMS) para aguas recreacionales por lo que esta agua desde del punto de vista bacteriológico es aceptable aunque la presencia de estas (Coliformes) se le atribuye al hecho de que la fuente de agua de cultivo proviene del rio Sucio el cual está contaminado.
8. Todas las muestras tanto de la carne como de vísceras dieron negativo a la presencia de ***Staphylococcus aureus***, ***Listeria monocytogenes***, ***Vibrium parahaemolyticus*** y ***Salmonella sp.***

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Mejorar la infraestructura de las granjas de cultivo de tilapia tomando medidas como separar las áreas de cultivo y cosecha dentro de la granja, evitar el contacto de los animales domésticos y de crianza con los estanques y ubicarlos a una distancia considerable para prevenir que se dé una contaminación cruzada.
2. Cumplir con La buenas practicas acuícolas de contar con baños, vestidores, regaderas y lavamanos para la higiene del personal, poseer una bodega en la que se almacene el alimento de las tilapias, equipo y utensilio de cosecha.
3. Capacitar en las buenas prácticas de higiene y salud a los manipuladores que están en contacto directo con la tilapia y proporcionarles la indumentaria adecuada.
4. Cambiar la fuente de abastecimiento de agua para el cultivo de tilapia y luego de una cosecha (3 meses) realizar correctamente un reposo sanitario en el estanque (desinfectar con cal el estanque) en el estanque por lo menos de unos 15 días de duración además colocar filtros en la entrada del agua que proviene del río sucio y a futuro construir un pozo para tener una agua de cultivo de mejor calidad.
5. Llevar a cabo una limpieza y desinfección semanal de los utensilios que se utilizan para la cosecha: redes, baldes, atarrayas entre otros para eliminar residuos y suciedad que puedan generar el crecimiento de microorganismos y una contaminación a la tilapia.
6. Cocinar adecuadamente el pescado al punto de freírlo y no ingerirlo crudo en forma de cebiche o sushi. Ya que la mayor parte de las

bacterias que se investigaron en la tilapia no resisten temperaturas elevadas por lo que este es un método de prevención de infección por contaminación biológica

7. Realizar frecuentemente estudios microbiológicos del agua de cultivo y de la tilapia que están cosechando para tener un parámetro de cómo está la calidad de su producto y ver si son aptas para consumirlas.
8. Incluir en una investigación futura el estudio de los parámetros fisicoquímicos del agua de cultivo de tilapia ya que no existen estudios previos que indiquen valores de pH, Oxígeno disuelto, temperatura, dureza, nitritos entre otros parámetros de las granjas de Atiocoyo.
9. Gestionar la creación de una ley acuícola que obligue a los productores de tilapia a cumplir con requerimientos básicos para garantizar la inocuidad y calidad de su producto.
10. Cumplir con todas las recomendaciones para que los productores de tilapias del cantón Atiocoyo de San Pablo Tacachico La Libertad puedan someterse al proceso de certificación y poder exportar las tilapias que cultivan.

BIBLIOGRAFIA

1. Arias M. L., Blanco L., Chávez C., Morales G. Evaluación de la calidad bacteriológica de tilapia fresca (*Oreochromis niloticus*) proveniente de la Zona Norte de Costa Rica. Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. 2004. Disponible en: <<http://www.scielo.org.ve/scielo>> [Consultado el 18.01.2012].
2. Cuellar-Anjel J., Morales Q. V. Guía técnica: Patología e Inmunología de camarones penaeidos. Panamá. 2008.
3. Durango Villadiego A. M., Simanca Sotelo M. M. Microbiología de Alimentos Guía de laboratorio. Universidad de Córdoba, Facultad de Ciencias Agrícolas, Programa de Ingeniería de Alimentos. 2004. Pag: 7. Disponible en: <<http://http://www.slideshare.net/100act/guas-microbiologa-de-alimentos>> [Consultado el 30.01.2012].
4. Flores Hernández A. de M., Hernández Rosales E. L., Hinds Orellana F. P. Propuesta de un manual de procedimientos normalizados de microbiológico de alimentos para un laboratorio de microbiología. Para optar al grado de Licenciatura en Química y Farmacia. Marzo 2005. San salvador, El Salvador C. A.
5. Frazier W.C, Westhoff D.C. Microbiología de los alimentos, e acribia, S.A. 4ta edición. España. 2003.

6. Saavedra Martínez M. A. Manejo del cultivo de tilapia. Managua Nicaragua. 2006. Disponible en: <http://pdf.usaid.gov/pdf_docs> [Consultado 20.01.2012]
7. Soto Rodríguez S. Investigación en presas de Sinaloa, Calidad del agua y bacterias presentes en tilapia cultivada. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., Unidad Mazatlán, México. 2009. Disponible en: <<http://www.fps.org.mx>> [Consultado el 20.01.2012].
8. <<http://www.funprover.org>> [Consultado 18.01.2012] .Manual de Producción de Tilapia con Especificaciones de Calidad e Inocuidad.
9. <<http://www.fda.gov/BacteriologicalAnalyticalManual>> [Consultado el 28.01.2012].Manual de Análisis Bacteriológico (BAM).
10. <<http://www.conxemar.com/trazabilidad.htm>> [Consultado en 23.01.2012] Guía de Trazabilidad de la Industria de Transformación de Productos de la Pesca y la Acuicultura.
11. <<http://members.wto.org/crnattachments/2008.pdf>> [Consultado el 15.01.2012] RTCA 67.04.50:08 criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos. Productos de la Pesca. Pescados frescos-refrigerados y congelados.
12. <<http://www.who.int/es./pdf>> [Consultado 28.03.2012] Norma internacional OMS para aguas recreacionales.

13. <<http://www.speas.biz/downloads/rm4612007sa.pdf>> [Consultado 29.03.2012] Guía Técnica para el análisis microbiológico de superficies en contacto con alimentos. Perú del Ministerio de Salud.
14. <<http://www.fao.org/docrep/012/i0468s/i0468s00.htm>> [Consultado 4.04.2012] Directrices para la inspección del pescado basada en los riesgos.
15. <<http://www.fao.org/DOCREP/V7180S/V7180S00.HTM>> [Consultado 4.04.2012] El Pescado Fresco: Su Calidad y Cambios de su Calidad.

ANEXOS

ANEXO Nº 1:
PARÁMETROS QUE DETERMINAN LA CALIDAD DEL
AGUA DEL ESTANQUE.

Cuadro Nº 13: Parámetros que determinan la Calidad del Agua del Estanque⁽⁶⁾

PARÁMETROS	RANGOS
Temperatura	25.0 - 32.0 °C
Oxígeno Disuelto	5.0 - 9.0 mg/l
pH	6.0 - 9.0
Alcalinidad Total	50 - 150 mg/l
Dureza Total	80 - 110 mg/l
Calcio	60 - 120 mg/l
Nitritos	0.1 mg/l
Nitratos	1.5 - 2.0 mg/l
Amonio Total	0.1 mg/l
Hierro	0.05 - 0.2 mg/l
Fosfatos	0.15 - 0.2 mg/l
Dióxido de Carbono	5.0 -. 10 mg/l
Sulfuro de Hidrógeno	0.01 mg/l

ANEXO N° 2

Tabla N° 2: Análisis bacteriológico realizado a cada muestra en estudio

Análisis Bacteriológico	Muestras de tilapia				Muestras del manipulador (manos)	Muestras de Agua del Estanque
	Musculo(carne)		Vísceras			
	Mx ₁	Mx ₂	Mx ₁	Mx ₂		
Recuento de <i>E. coli</i> (UFC/g)	✓	✓	✓	✓		
Recuento de <i>St. Aureus</i> (UFC/g)	✓	✓	✓	✓	✓	
Presencia de <i>Salmonella</i>	✓	✓	✓	✓		
Presencia de <i>Listeria monocytogenes.</i>	✓	✓	✓	✓		
Presencia de <i>Vibrio parahaemolyticus.</i>	✓	✓	✓	✓		
Presencia de <i>E. coli.</i>					✓	
Determinación de Coliformes Totales (NMP/100 mL)						✓
Determinación de Coliformes Fecales (NMP /100 mL)						✓

ANEXO N° 3

CALCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA A PARTIR DEL SOFTWARE WIN EPISCOPE

Tabla N° 3: Calculo del tamaño de muestra (n) y de la prevalencia (p).

Introduzca los DATOS:

Tamaño de la Población: 95

Nº de Animales Enfermos: 25

Nivel de Confianza (%): 95 %

RESULTADOS:

Prevalencia (%): 26.32

Tamaño de muestra necesario: 10

Fracción de muestreo (%): 10.53

Nº Enfermos	% Enfermos	Tamaño Muestra	Nº Enfermos	% Enfermos	Tamaño Muestra
1	1.05	90.25	11	11.58	21.46
2	2.11	73.37	12	12.63	19.77
3	3.16	59.37	13	13.68	18.32
4	4.21	49.29	14	14.74	17.05
5	5.26	41.92	15	15.79	15.93
6	6.32	36.36	16	16.84	14.94
7	7.37	32.03	17	17.89	14.06
8	8.42	28.58	18	18.95	13.26
9	9.47	25.76	19	20.00	12.54
10	10.53	23.43	20	21.05	11.89

Donde:

n = Tamaño de la muestra: 10 granjas

N = Tamaño de la población: 95 granjas

D = Número de tilapias enfermas (% mortalidad): 25 %

a = Nivel de confianza: 95 %

p= Prevalencia estimada: 30 %

ANEXO N° 4

PROBABILIDAD DE DIAGNOSTICAR AL MENOS UN ANIMAL COMO REALMENTE POSITIVO CON PREVALENCIA DEL 30 %

Tabla N° 4: Probabilidad de diagnosticar un animal como positivo calculada con el software Win Episcopo.

The screenshot shows the 'Tamaño de Muestra: Detección de Enfermedad #1' window. It has three tabs: 'Tamaño de Muestra', 'Máximo n° positivos', and 'Nivel de Confianza'. The 'Tamaño de Muestra' tab is active, showing input fields for 'Tamaño de la Población' (95), 'Tamaño de muestra' (10), and 'Prevalencia estimada (%)' (30). Below these is the 'RESULTADOS' section, which displays 'Nivel de Confianza (%)' as 97.63 and a text box explaining the result: 'Si tomas 10 muestras de una población de 95 individuos y la prevalencia estimada es 30%, entonces la probabilidad de diagnosticar al menos un animal como realmente positivo es del 97.63%'. A red arrow points to this text box. To the right is a table with 6 columns: '% Prevale', 'N° Enfermos', 'Nivel Confianz', '% Prevale', 'N° Enfermos', and 'Nivel Confianz'. The table contains 10 rows of data corresponding to sample sizes from 1 to 10.

% Prevale	N° Enfermos	Nivel Confianz	% Prevale	N° Enfermos	Nivel Confianz
1	0.95	10.02	11	10.45	70.68
2	1.90	19.14	12	11.40	73.97
3	2.85	27.41	13	12.35	76.92
4	3.80	34.91	14	13.30	79.57
5	4.75	41.70	15	14.25	81.94
6	5.70	47.85	16	15.20	84.05
7	6.65	53.40	17	16.15	85.94
8	7.60	58.42	18	17.10	87.62
9	8.55	62.94	19	18.05	89.12
10	9.50	67.02	20	19.00	90.45

ANEXO N° 5
GUIA DE INSPECCION PARA VERIFICAR EL CUMPLIMIENTO
DE LAS BUENAS PRACTICAS ACUICOLAS

GUIA DE INSPECCION



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



Objetivo: Realizar un diagnostico de las instalaciones del estanque por medio de la siguiente guía de inspección para productos acuícolas.

Nombre de la Granja: _____

Nombre del propietario del estanque: _____

Nombre y Firma de la persona responsable de la inspección: _____

Fecha de Inspección: _____

- CAPACIDAD DE LA GRANJA:

Número de estanques		Dimensiones de los estanques:	
Población total de tilapias por estanque		Largo (m)	
		Ancho (m)	
Fuente de agua			

LISTA DE CHEQUEO

No.	Aspectos a Evaluar	C	NC	Comentarios
SELECCIÓN DEL SITIO DE CULTIVO				
1	Sitio adecuado con abastecimiento de agua.			
2	Registro de los parámetros microbiológicos del agua.			

3	La granja se encuentra localizada a más de 3 Km. De otras granjas.			
N°	Aspectos a Evaluar	C	NC	Comentarios
RIESGO DE LA GRANJA				
4	Sitio sin riesgo alguno de contaminarse (contacto con animales, descarga de afluentes, industrias, plaguicidas o sustancias químicas, suelo sin uso agrícola previo).			
MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD				
5	Control de salud del personal.			
6	El personal esta capacitado en medidas de bioseguridad, manejo, limpieza y desinfección.			
7	Vestimenta limpia del personal de trabajo al iniciar labores.			
8	El personal usa equipo de protección (gorra, sombrero, ropa, botas), sin joyas.			
9	Presenta uñas largas el manipulador directo de la tilapia.			
10	Existen vestidores y servicios sanitarios.			
MANEJO DE EQUIPO Y UTENSILIOS				
11	Área de trabajo y almacenes separada para evitar la contaminación cruzada.			
12	Equipo y utensilios limpios y desinfectados.			
SISTEMA DE CONTROL DE PLAGAS				
13	Áreas específicas y limpias para almacenar por separado alimento, sustancias químicas, equipo y utensilios, para evitar la contaminación cruzada.			
14	Ausencia o confinamiento adecuado de animales domésticos en la granja (perros, gatos, caballos, vacas).			
MANEJO DEL AGUA DE CULTIVO				

15	Frecuencia de recambios de agua.			
No.	Aspectos a Evaluar	C	NC	Comentarios
16	Realiza desinfección de estanques.			
17	Existen filtros en los estanques.			
MEDIDAS DE SANIDAD DEL PERSONAL Y LAS TILAPIAS				
18	Uso y control de medicamentos veterinarios de uso acuícola.			
19	Procedimiento de higiene del personal antes y durante la cosecha.			
20	Procedimiento de limpieza y desinfección del equipo y utensilios antes durante y después de la cosecha.			
21	Presenta mortalidad de las tilapia.			
22	Hay control en las enfermedades de las tilapias.			
23	Están separadas las tilapias enfermas de las sanas.			
MANEJO DEL ALIMENTO PARA LA TILAPIA				
24	El alimento es producido en la granja.			
25	Compra el alimento de lotes garantizados.			
26	Hay control en la alimentación de las tilapias (horarios de alimentación).			
27	El origen del alimento es comercial.			
MANEJO DE DESECHOS				
28	Manipulación adecuada de los desechos orgánicos e inorgánicos que se generan.			
29	Los alrededores de los estanques están limpios y despejados			
MANUAL DE BUENAS PRACTICAS ACUICOLAS				
30	Existe un manual de buenas prácticas acuícolas.			

Observaciones:

SISTEMA DE CALIFICACION

C	CONFORME	CUMPLE CON LOS REQUERIMIENTOS
NC	NO CONFORME	NO CUMPLE CON LOS REQUERIMIENTOS

ANEXO N° 6
PROCEDIMIENTO DEL AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE
Escherichia coli.

A. Equipo y Materiales:

Balanza semianalítica

Bolsa plástica estéril

Erlenmeyer de 250 mL

Frascos de dilución

Incubadora

Stomacher

Pipetas graduadas estériles de 10 y 1 mL

Placas petri

Espátulas

B. Medios de cultivo y Reactivos:

Agar EMB

Agua Peptonada Buferada (APB)

Cromocult COLIFORMES

Reactivos para la tinción de Gram

a. Prueba presuntiva *Escherichia coli*

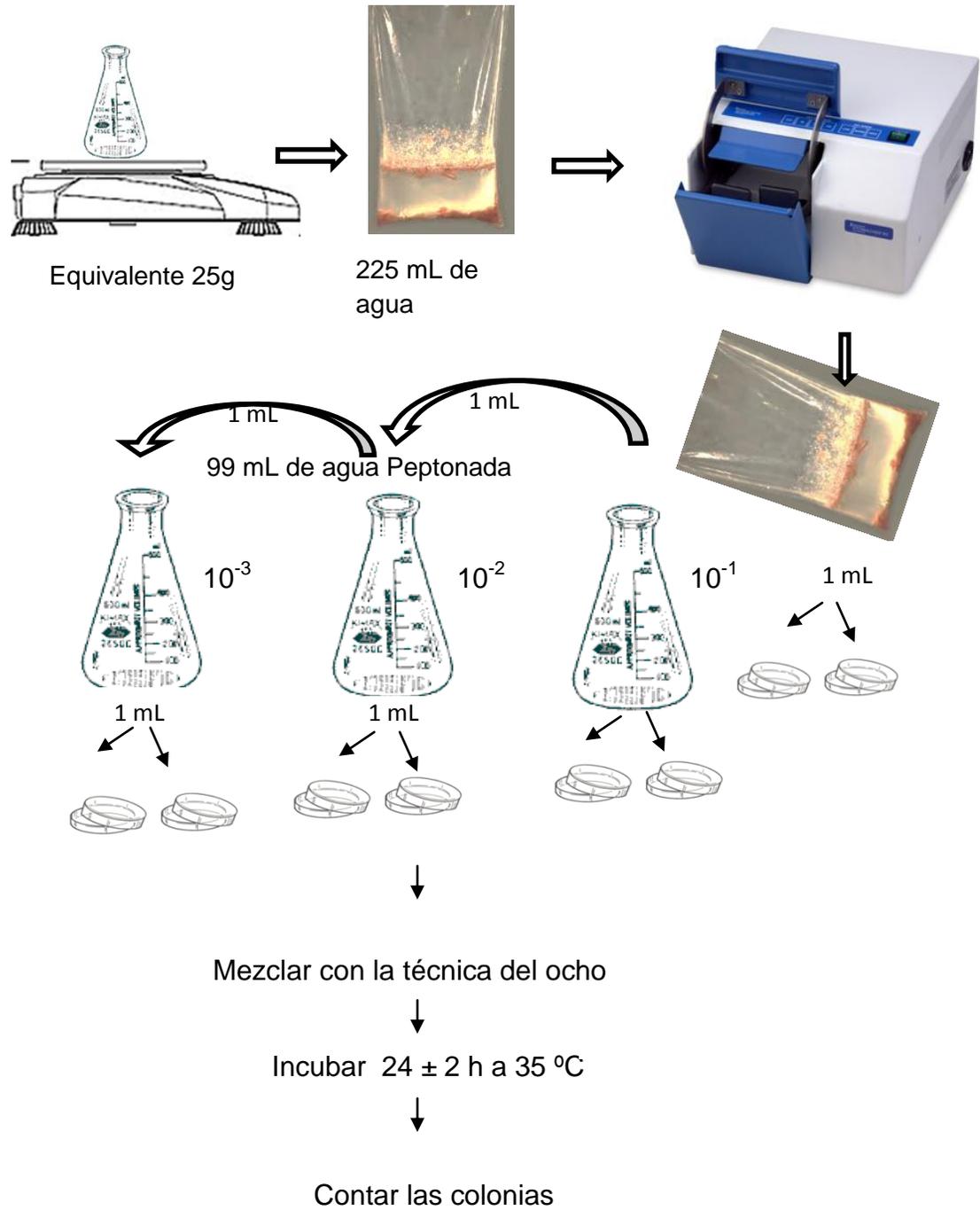


Figura N° 34: Prueba presuntiva de *E. coli*

b. Prueba Confirmativa

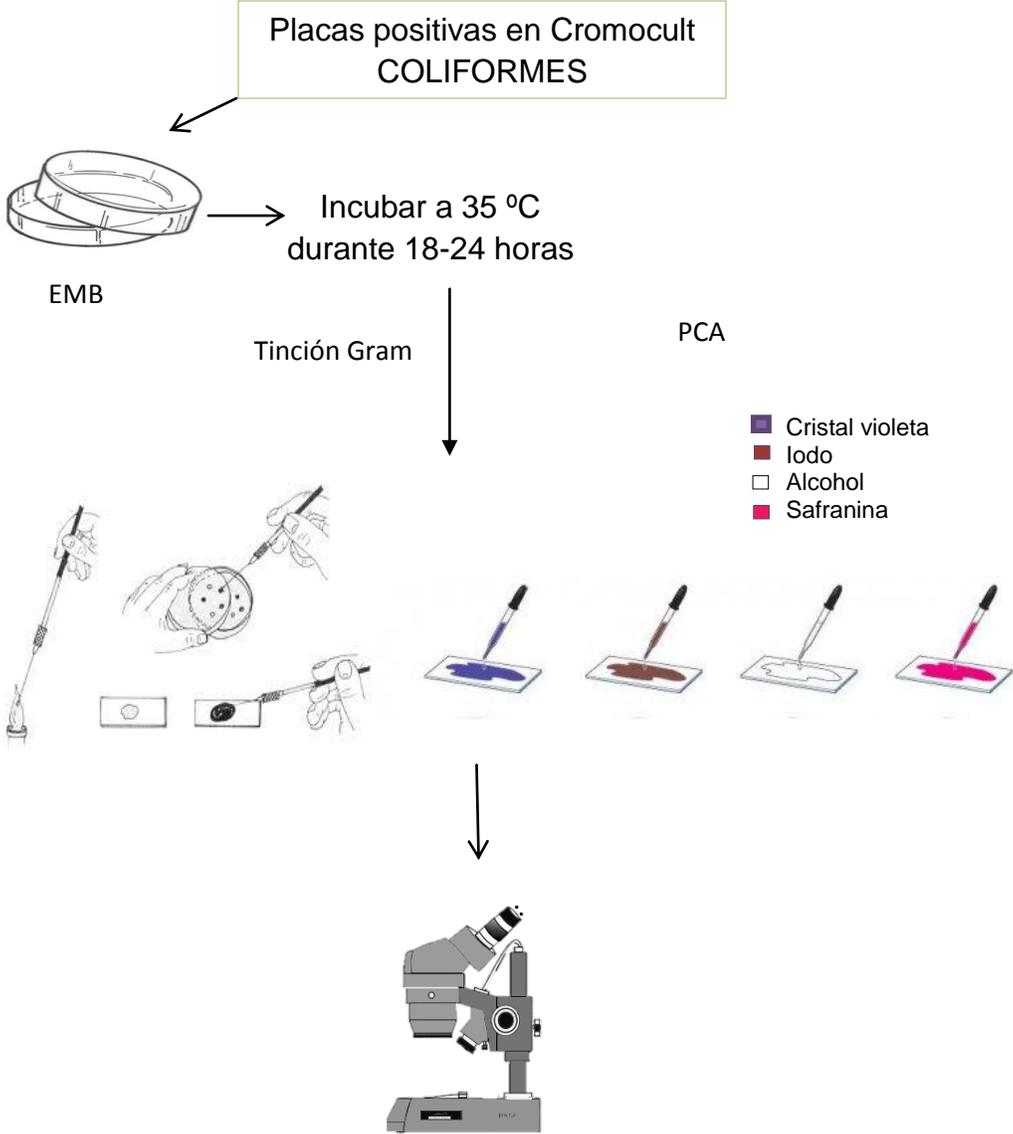


Figura N° 35: Confirmación de *E. coli*

ANEXO N° 7

**PROCEDIMIENTO DEL AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE
*Staphylococcus aureus***

A. Equipo y Materiales:

Asas bacteriológicas

Balanza semianalítica

Bolsa plástica estéril

Placas de petri

Cuenta colonias Quebec

Erlenmeyer 250 mL

Rastrillos de vidrio

Incubadora

Stomacher

Pipetas graduadas estériles de 1 mL

Tubos de ensayo con rosca

Porta objetos

Gradilla para tubos de ensayo

B. Medios y Reactivos:

Agua peptonada buferada

Medio Baird Parker

Caldo infusión cerebro corazón (BHI)

Peroxido de Hidrógeno 3 %

Plasma de conejo

Reactivos de la coloración al Gram

a. Preparación de la muestra para el aislamiento *Staphylococcus aureus*

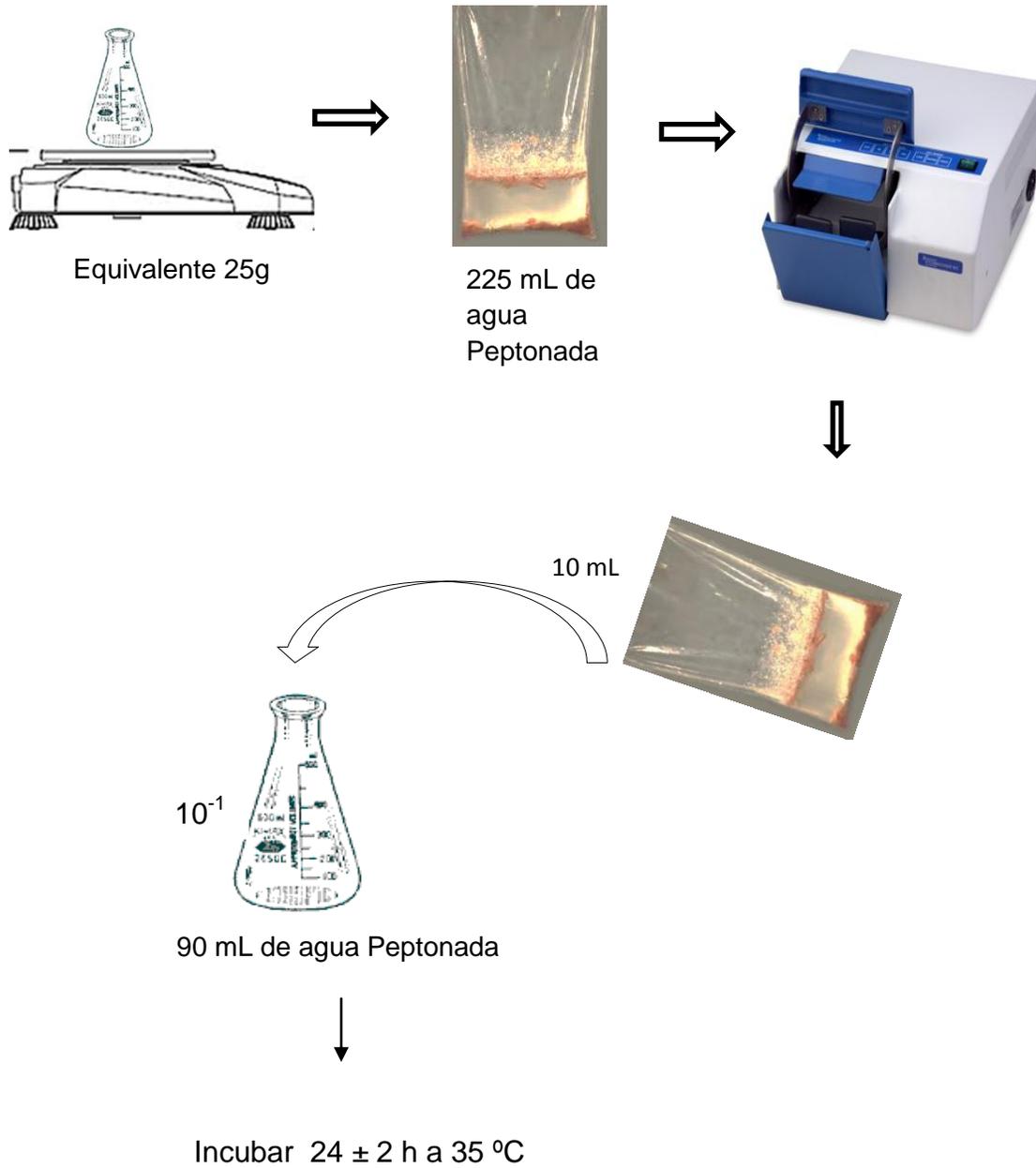


Figura N° 36: preparación de la muestra *Staphylococcus aureus*

b. Aislamiento y cuantificación de *Staphylococcus aureus*

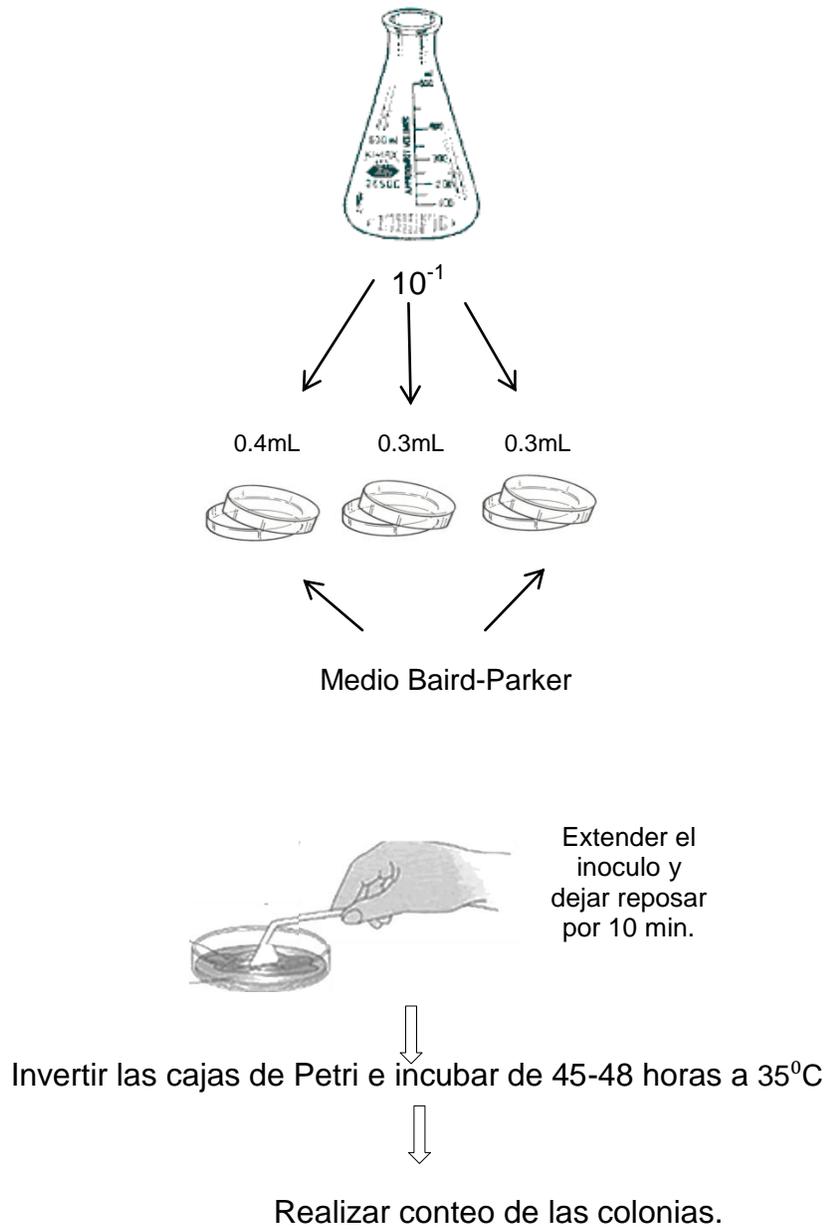
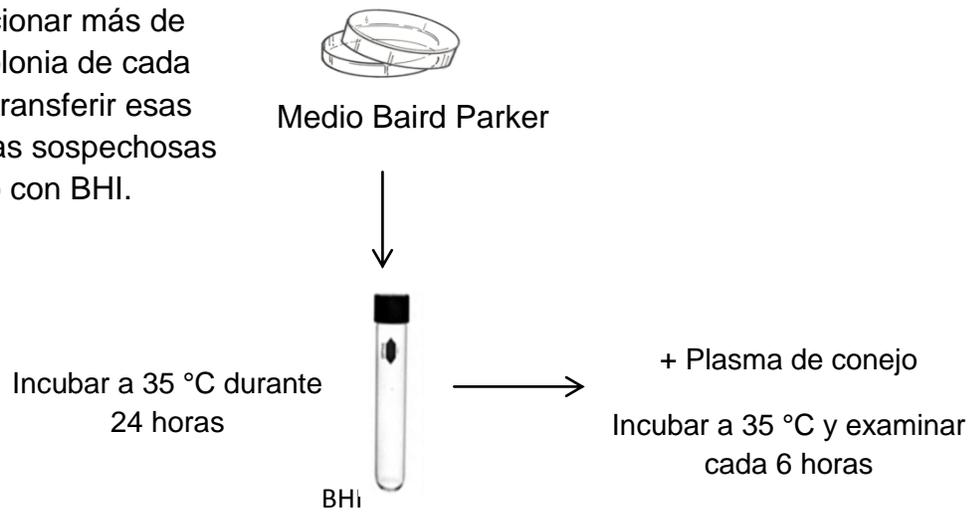


Figura N° 37: Aislamiento y cuantificación de *Staphylococcus aureus*

Prueba de coagulasa

Seleccionar más de una colonia de cada tipo y transferir esas colonias sospechosas al tubo con BHI.



Prueba de Catalasa

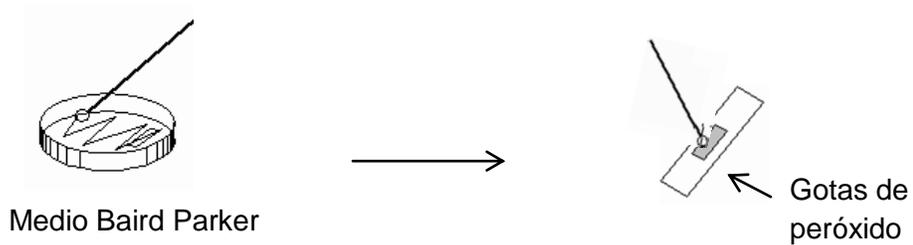


Figura N° 38: Aislamiento y cuantificación de *Staphylococcus aureus*

ANEXO Nº 8
PROCEDIMIENTO DEL AISLAMIENTO E IDENTIFICACION
DE *Salmonella sp*

A. Equipos y Materiales:

Bolsa plástica estéril

Balanza semianalítica

Baño de agua con controlador termostático (Baño María)

Cajas de petri estériles

Erlenmeyer 250 mL

Pipetas de 1 mL

Tubo de ensayo con rosca

Incubadora

Asa bacteriológica

Stomacher

B. Medios de cultivo y Reactivos

Caldo Lactosado

Caldo 123acterio de soya (TSI)

Medio rappaport-vassiliadis

Agar bismuto sulfito (BS)

Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)

Agar 123acterio de Hektoen (HE).

a. Preparación y enriquecimiento de la muestra

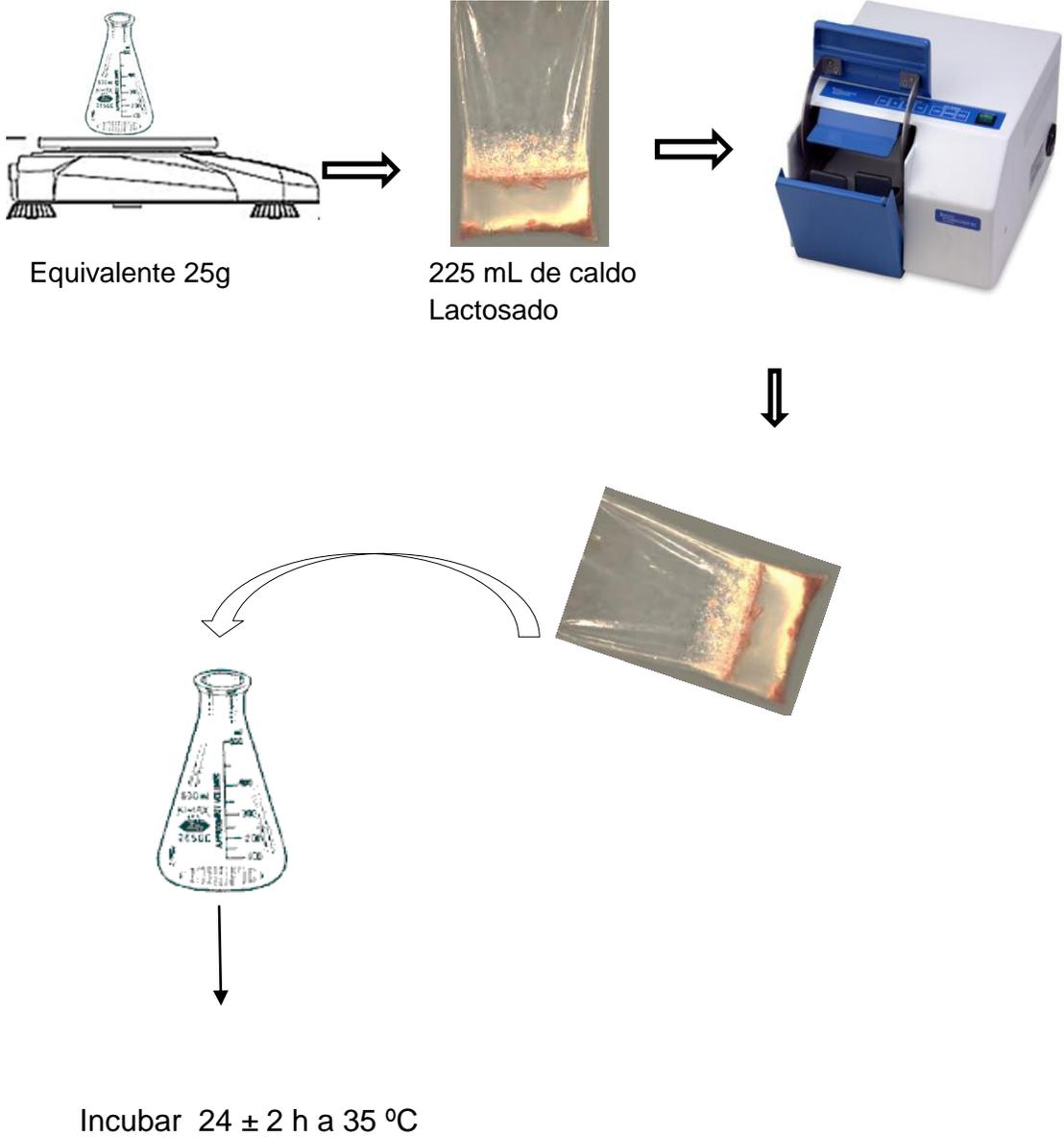


Figura N° 39: Preparación y enriquecimiento de la muestra

b. Aislamiento e Identificación de *Salmonella sp*

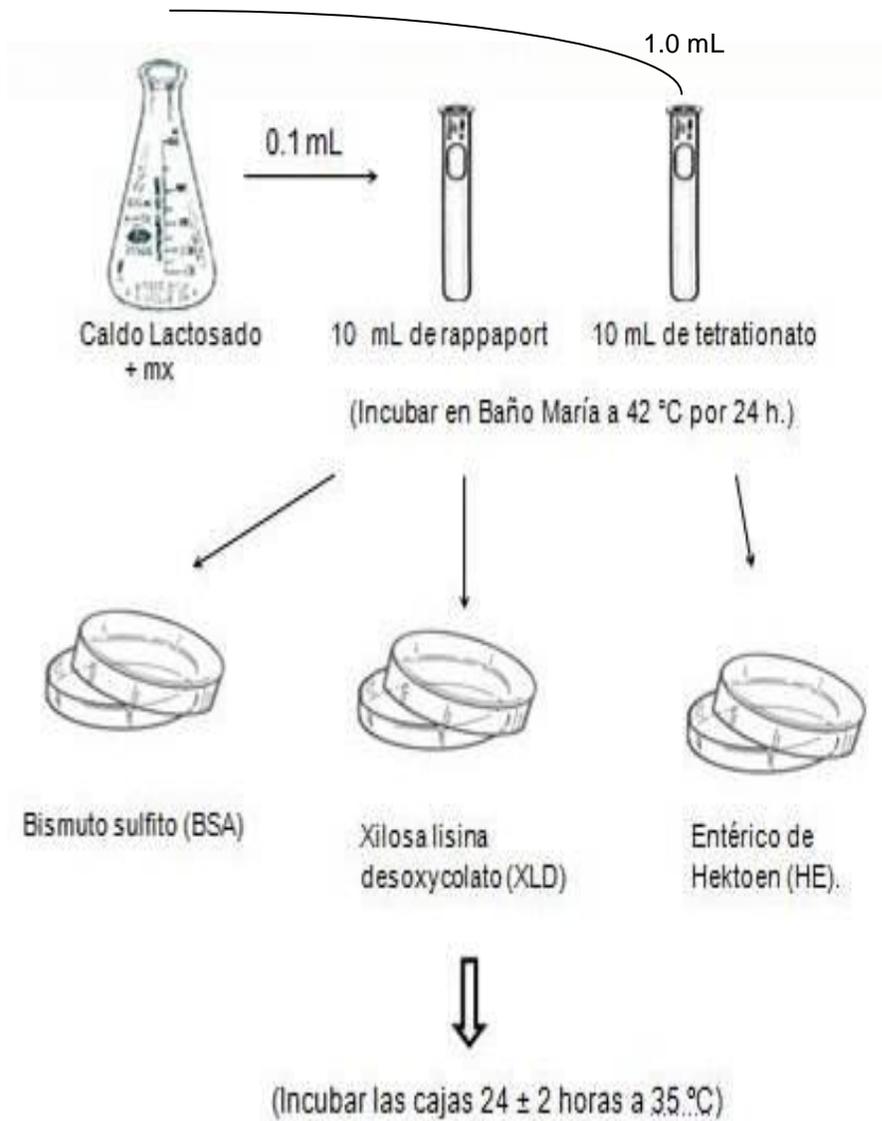


Figura N° 40: Aislamiento e identificación de *Salmonella sp*

c. Pruebas bioquímicas para *Salmonella sp*

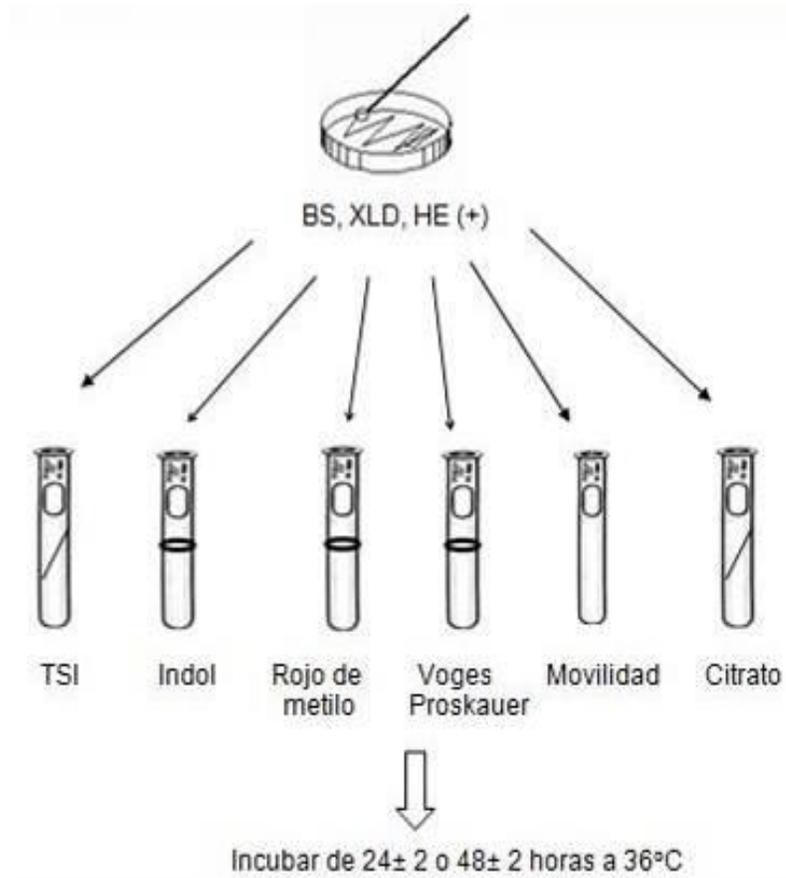


Figura N° 41: Pruebas bioquímicas para *Salmonella sp*

ANEXO N° 9

PROCEDIMIENTO Y RESULTADOS DE PRUEBAS BIOQUIMICAS

PROCEDIMIENTO:

- TSI:

Tocar ligeramente el centro de la colonia sospechosa con la aguja de inoculación e inocular en TSI en bisel, extendiendo sobre el bisel y puncionando el fondo. Incubar los tubos de TSI a 35 °C por 24 ± 2 horas.

- Indol:

Con un asa bacteriológica tomar 1 o 2 colonias sospechosas e inocular en el medio, Incubar a 35 °C por 24 ± 2 horas. Luego de incubar agregar 5 gotas del reactivo de Kovac agitar levente.

- Citrato:

Con un asa en punta tomar 1 o 2 colonias sospechosas e inocular extendiendo sobre el bisel y puncionando el fondo. Incubar los tubos de TSI a 35 °C por 24 ± 2 horas.

- Movilidad:

Con un asa en punta tomar 1 o 2 colonias sospechosas y picar en el centro del medio a 2/3 de profundidad. Incubar a 35 °C por 24 horas.

- Voges-Proskauer:

Con un asa bacteriológica circular tomar 1 o 2 colonias sospechosas e inocular en el medio, Incubar a 35 °C por 24 ± 2 horas. Después de la incubación, se agrega al tubo 3 gotas de solución alcohólica de alfa naftol y luego 2 gotas de la solución de hidróxido de potasio; se agita luego de la adición de cada reactivo dejar reposar por 15 minutos.

- Rojo de Metilo:

Con un asa bacteriológica circular tomar 1 o 2 colonias sospechosas e inocular en el medio, Incubar a 35 °C por 24 ± 2 horas. Luego de incubar agregar 3 gotas de reactivo de rojo de metilo.

RESULTADOS:

Cuadro N° 14: Resultados Pruebas Bioquímicas de las bacterias en estudio.

Prueba Bacteria	<i>Salmonella sp</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
TSI	A/K ± H ₂ S	A/A – H ₂ S	K/A ± H ₂ S
Indol	-	-	+
Citrato	+	-	No se realizo
Movilidad	+	+ en forma de paraguas	+
Voges Proskauer	-	+	-
Rojo de Metilo	+	+	+

Para que sea un resultado positivo la prueba debe de dar de la siguiente manera:

- TSI: bisel/fondo, A: acido color amarillo, K: alcalino color rojo, H₂S: producción de sulfuro de hidrogeno (ennegrecimiento del medio).
- Indol: formación de un anillo color rojo.
- Citrato: El medio cambia a azul.
- Movilidad: una difusión circular de crecimiento desde La línea de punzada.
- Voges Proskauer: color rosado o color rojo brillante
- Rojo de Metilo: coloracion roja o rosada.

ANEXO Nº 10
PROCEDIMIENTO DEL AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE
Listeria monocytogenes.

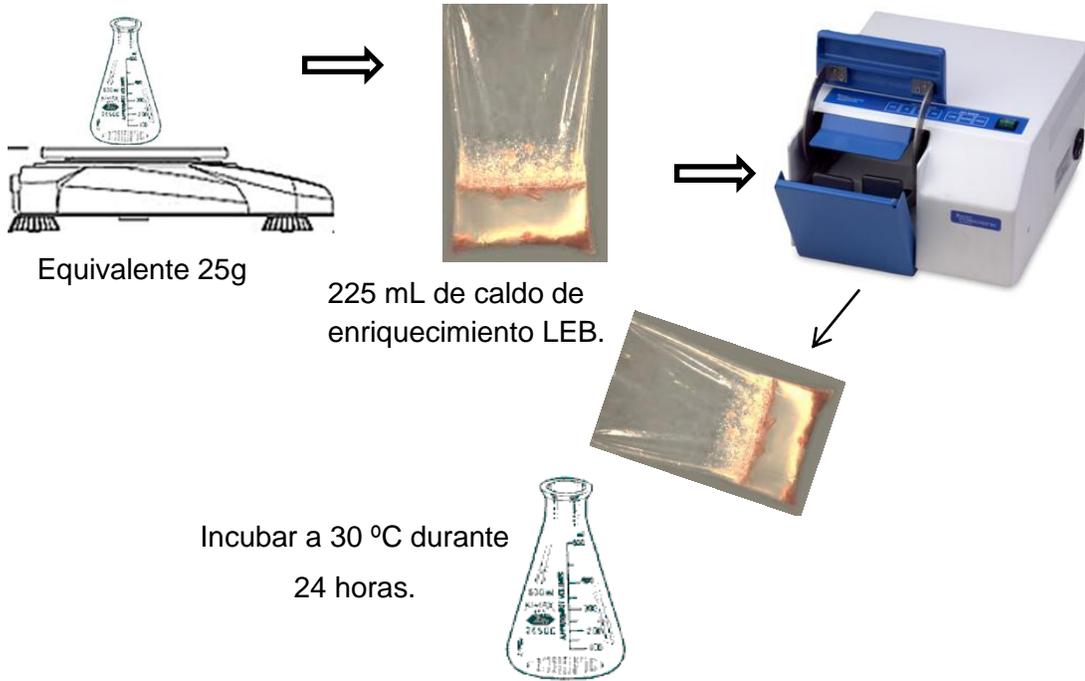
A. Equipo y Materiales:

Balanzas semianalíticas
Erlenmeyer de 250 mL
Incubadora
Asas 131 bacteriológica
Bolsa plástica estéril
Placas de petri
Pipetas de 10 y 1 ml
Tubos con tapón de rosca
Stomacher
Porta objeto
Refrigeradora

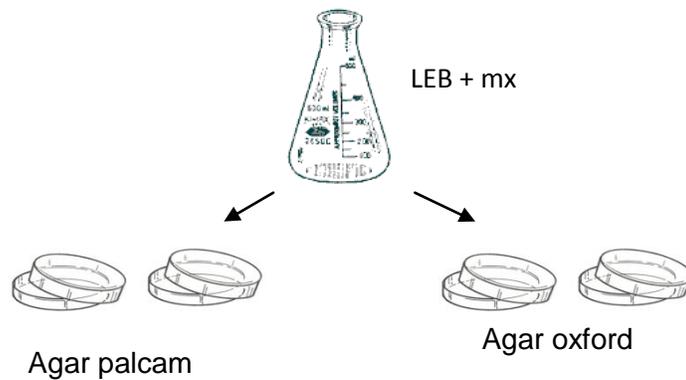
B. Medios y Reactivos:

Kit. De Coloración de Gram.
Caldo de enriquecimiento LEB
Agar Palcam
Agar Oxford
Agar TSA + EY
Peróxido de hidrógeno
Caldo soya tripticasa
Agar TSI
Rojo de metilo
Caldo MR-VP
Reactivo de Erlich
Solución de alfa naftol
Solución de Hidróxido de Potasio

Enriquecimiento selectivo de la muestra



b. Aislamiento de *Listeria monocytogenes*

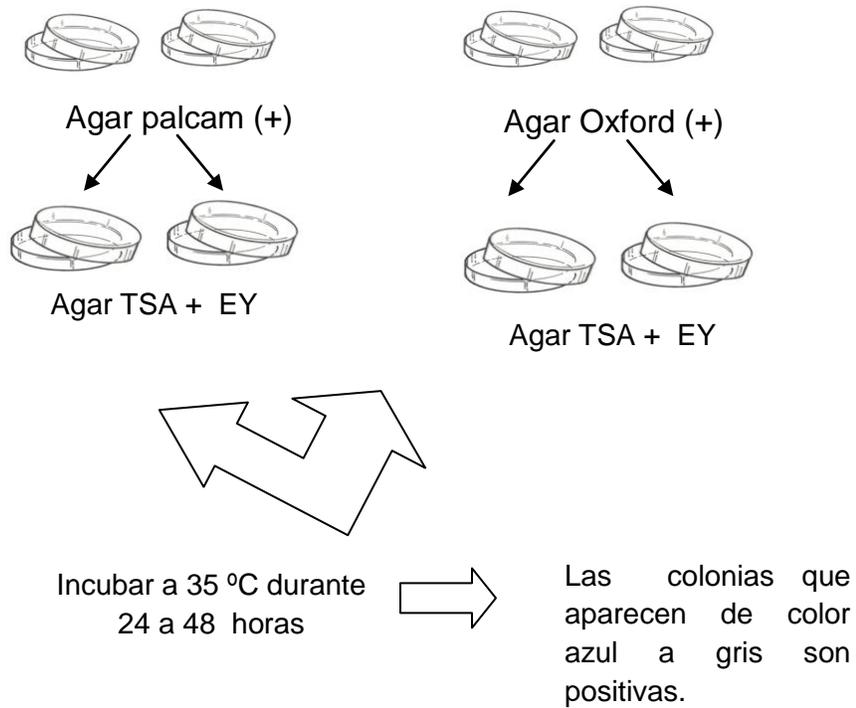


Incubar a 35 °C durante 24 a 48 horas luego de 24 horas refrigerar a 4 °C por 24 a 48 horas para un óptimo crecimiento

Figura N° 42: Enriquecimiento selectivo de la muestra y aislamiento de

Listeria monocytogenes

c. Identificación de *Listeria monocytogenes*



d. Pruebas presuntivas

Prueba de Catalasa

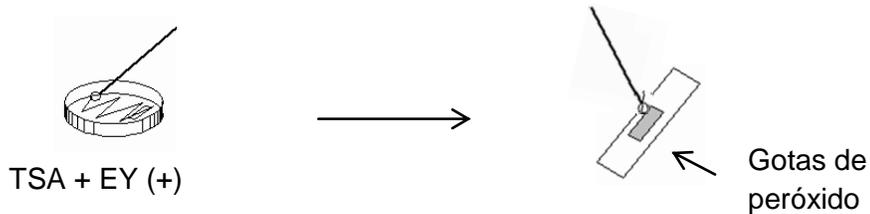
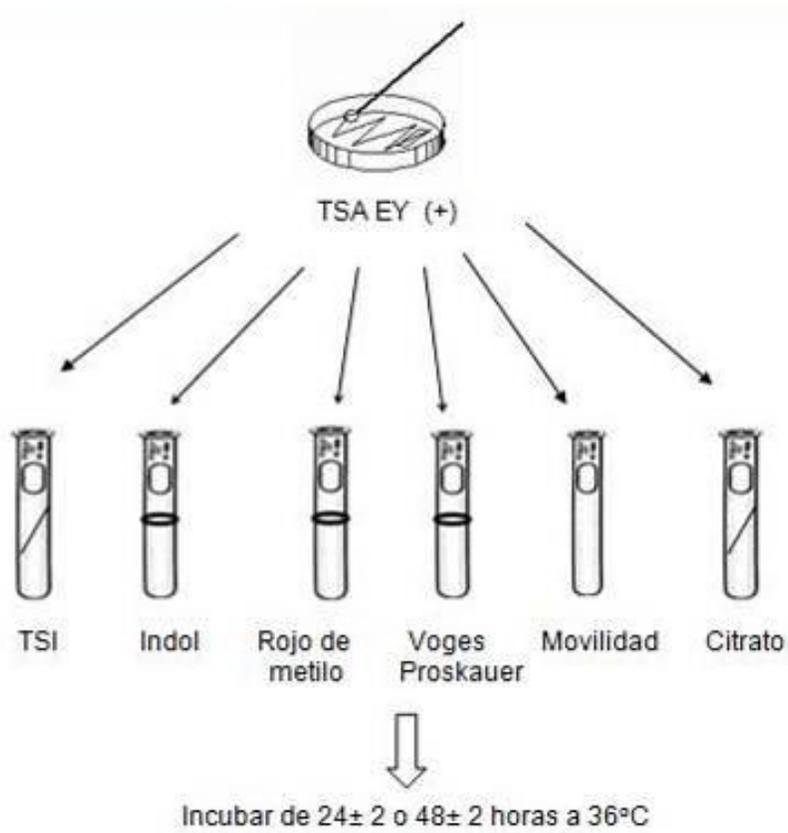


Figura N° 43: Identificación de *Listeria monocytogenes* y pruebas presuntivas

e. Pruebas bioquímicas de *Listeria monocytogenes*



f. Prueba de CAMP

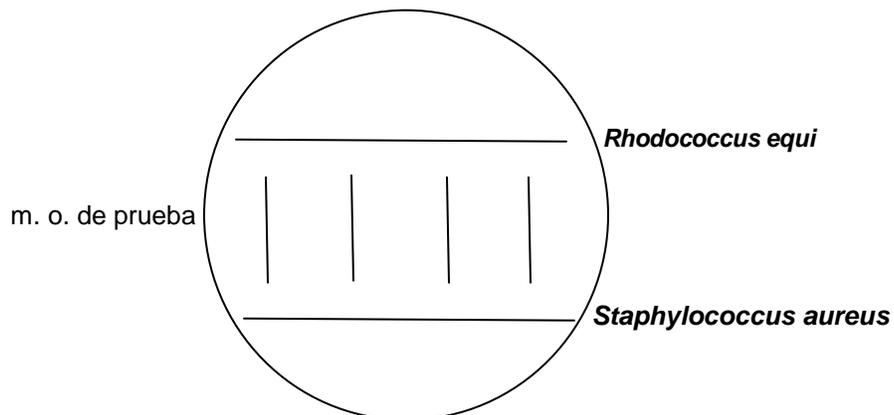


Figura N° 44: Pruebas bioquímicas y prueba de CAMP para ***Listeria monocytogenes***

ANEXO Nº 11
PROCEDIMIENTO DEL AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE
Vibrio parahemolyticus

Equipo y Materiales:

Asas bacteriológicas

Erlenmeyer de 250 mL

Bolsa plástica estéril

Incubadora

Stomacher

Palillos estériles

Pipetas estériles de 10 mL

Papel filtro

Frasco de dilución

Medios de cultivo y Reactivos:

Agar tiosulfato-citrato-bilis-sal-sucrosa (TCBS)

Agua peptonada buferada (APB)

Reactivo de prueba de oxidasa

Medio para la prueba de movilidad semisólido

Triple azúcar hierro (TSI)

Medio inclinado arginina glucosa (AGS)

Agar TSA + 6 % NaCl

a. Enriquecimiento

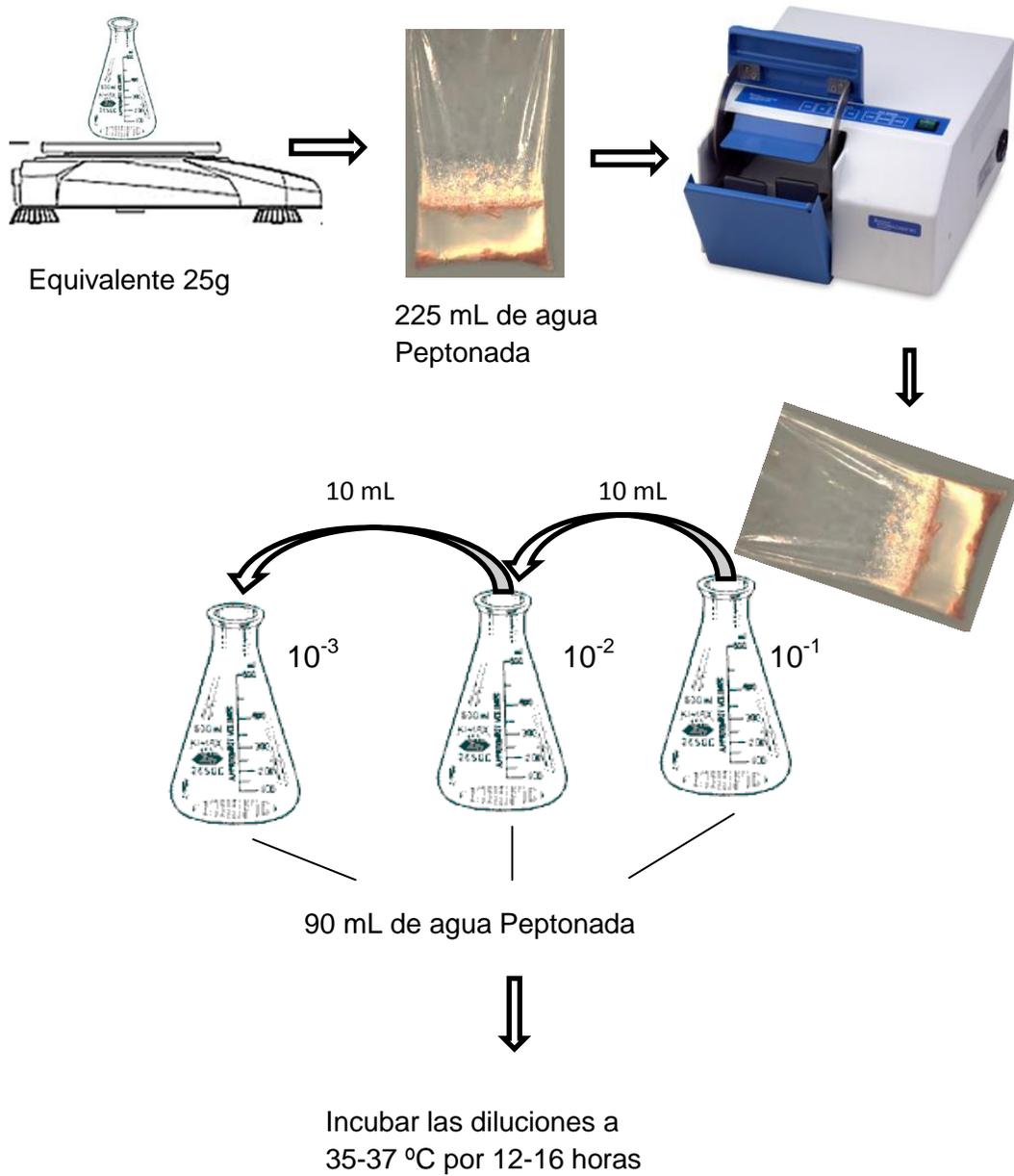


Figura N° 45: Enriquecimiento para *Vibrio parahaemolyticus*

b. Aislamiento e Identificación

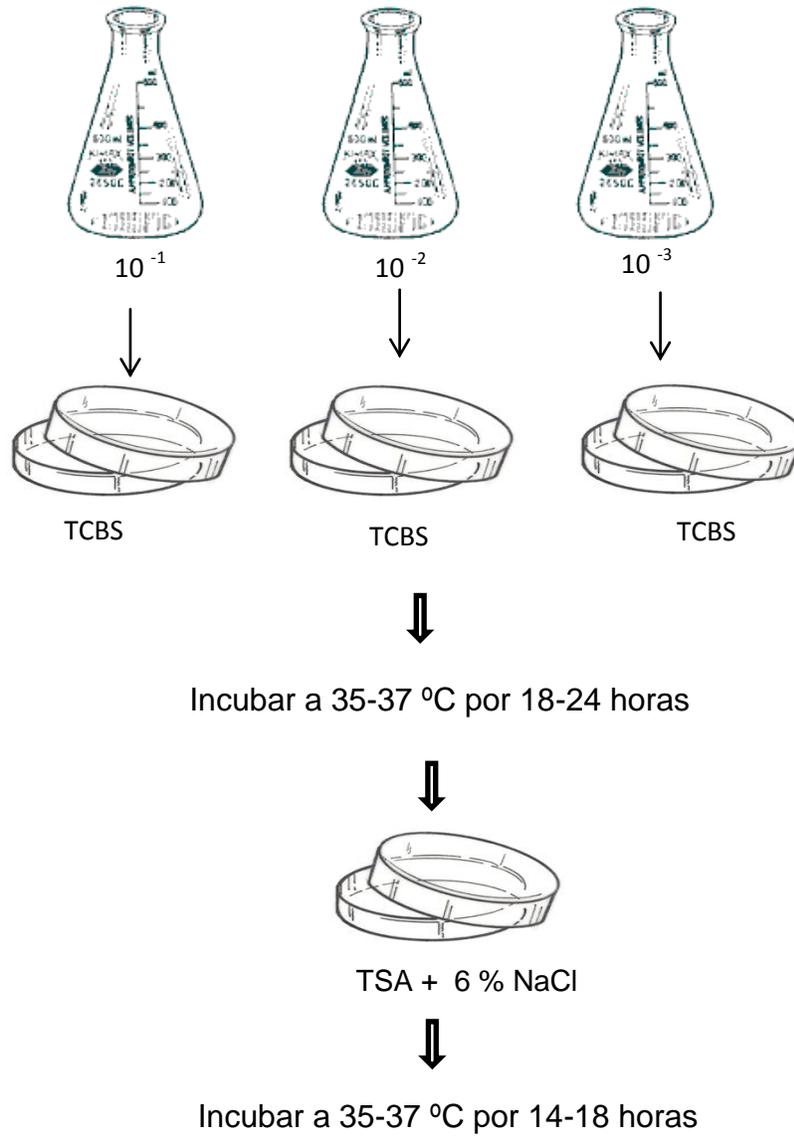
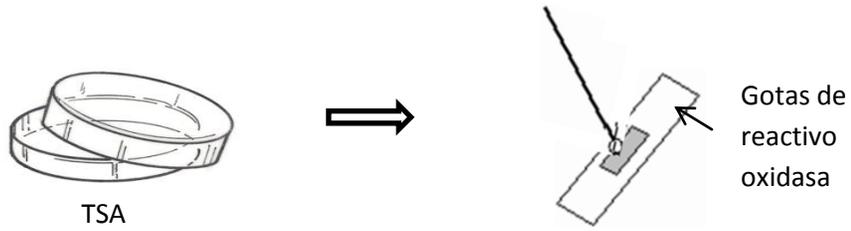


Figura N° 46: Aislamiento e Identificación para *Vibrio parahaemolyticus*

c. Prueba de oxidasa



d. Pruebas bioquímicas

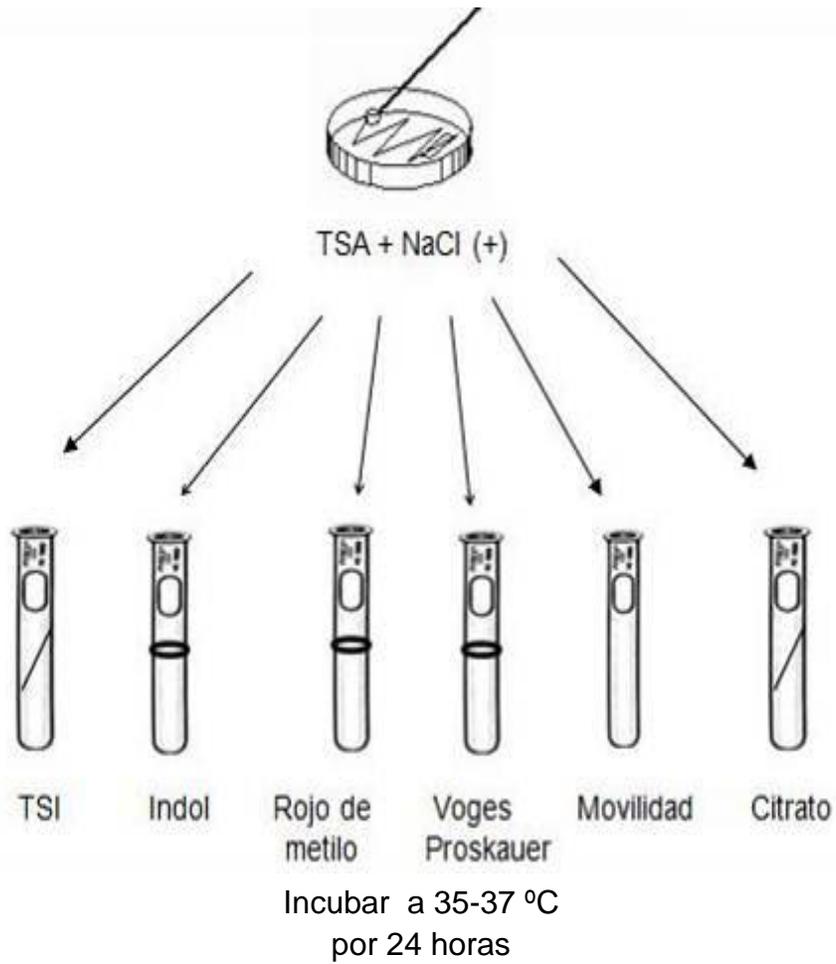


Figura N° 47: Pruebas bioquímicas para *Vibrio parahemolyticus*

ANEXO Nº 12
PROCEDIMIENTO DEL ANALISIS BACTERIOLOGICO DEL
AGUA DEL ESTANQUE

Materiales, Equipo, Medios y Reactivos:

Caldo fluorocult LMX

Caldo EC

Campanas de Durham

Tubos de fermentación

Pipetas de 1 y 10 mL

Incubadora

Lámpara de luz Ultra Violeta

a. Coliformes totales

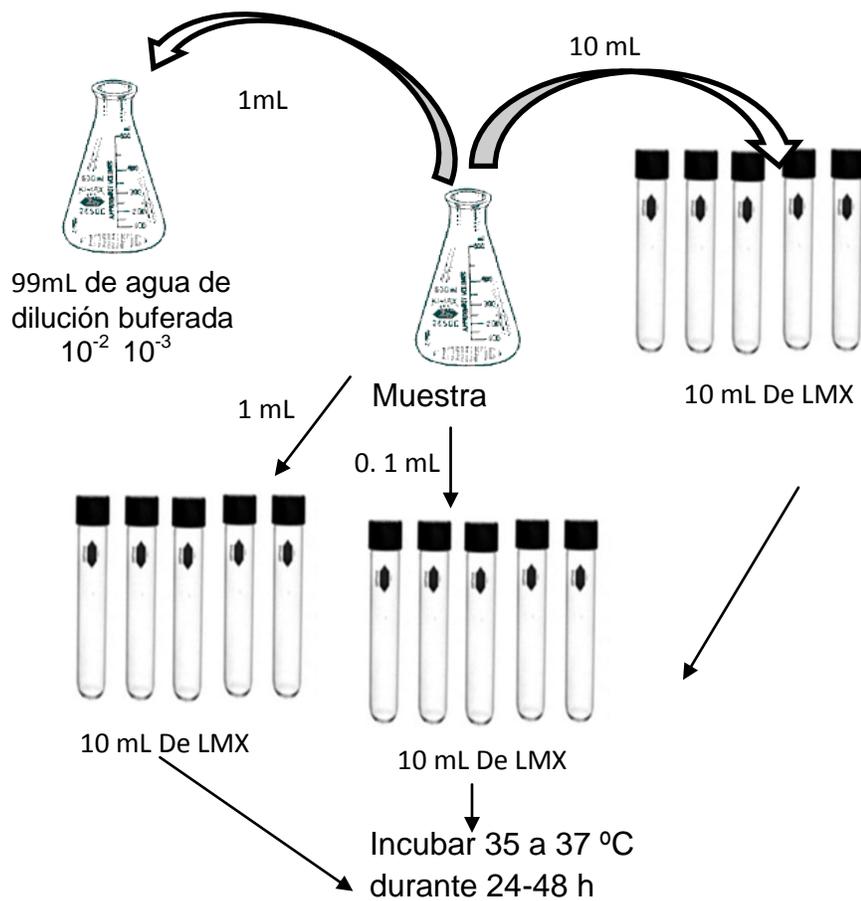
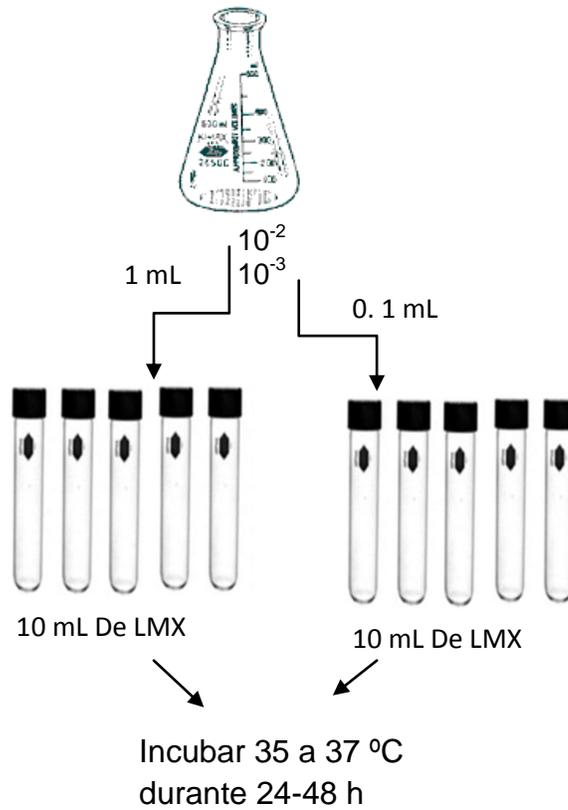


Figura N° 48: Identificación de **Coliformes totales**



b. Coliformes fecales

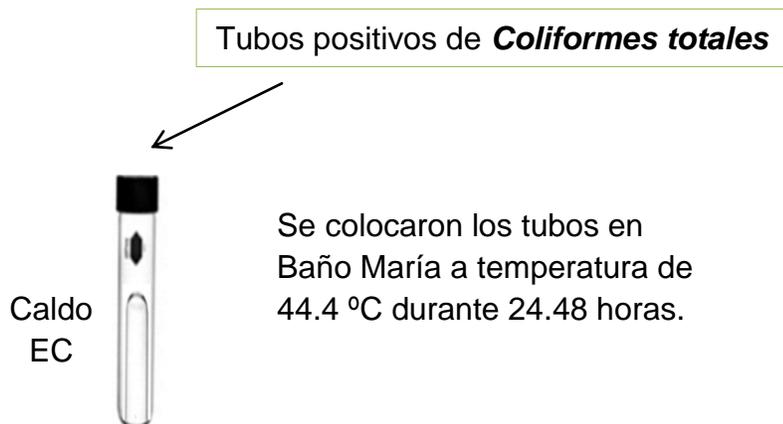


Figura N° 49: Identificación de Coliformes fecales

ANEXO Nº 13

PROCEDIMIENTO DE LA TOMA DE MUESTRA, AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* EN MANOS DE MANIPULADORES.

Materiales, Equipo, Medios y Reactivos:

Caldo fluorocult LMX

Caldo BHI

Frascos con diluyente (agua peptonada buferada)

Agar Bair Parker

Agar EMB

Tubos de ensayo con rosca

Bolsas de polietileno estériles

Rastrillos de vidrio

Lámpara UV

Asa Bacteriológica

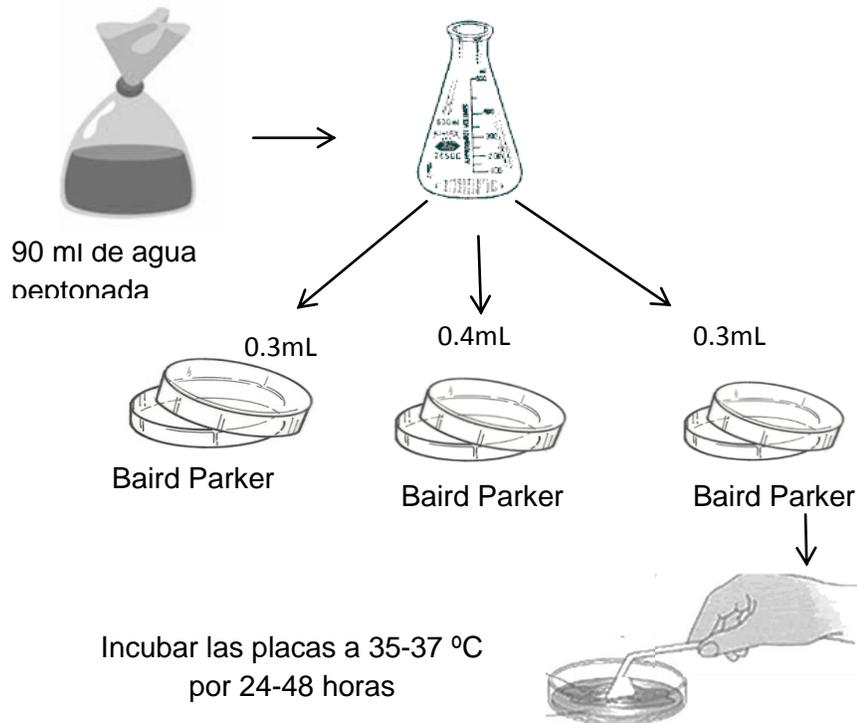
Placas de petri

a. Toma de muestra



Figura N° 50: Toma de muestra en manipuladores

b. Siembra para *Staphylococcus aureus*



c. Prueba de coagulasa

Seleccionar más de una colonia de cada tipo y transferir esas colonias sospechosas al tubo con BHI.

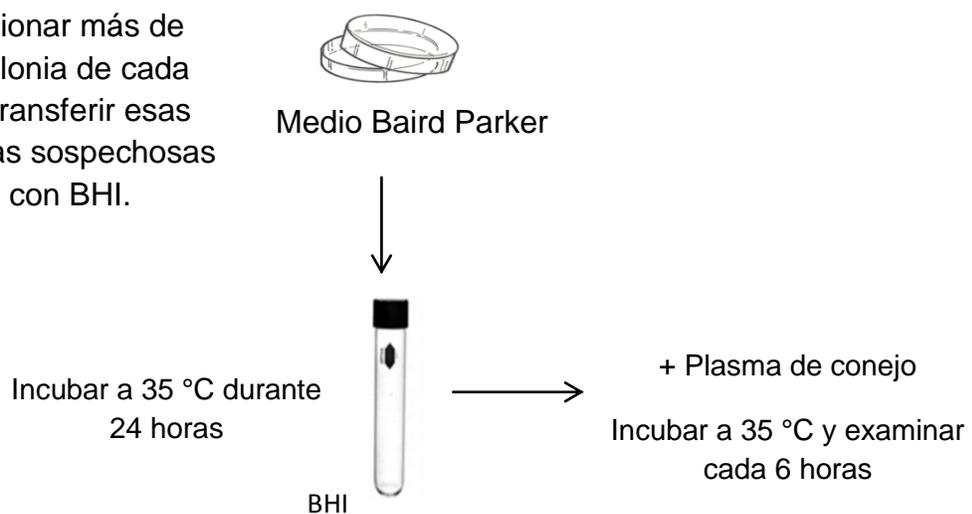
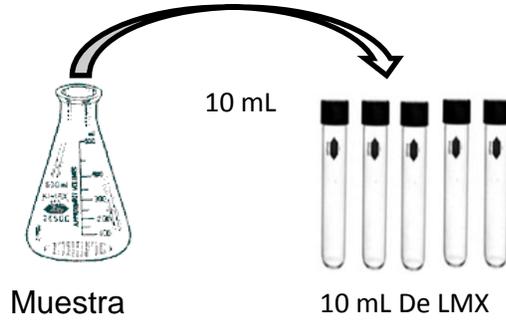


Figura N° 51: Siembra e identificación de *Staphylococcus aureus*

Siembra para *Escherichia coli*



Confirmativa

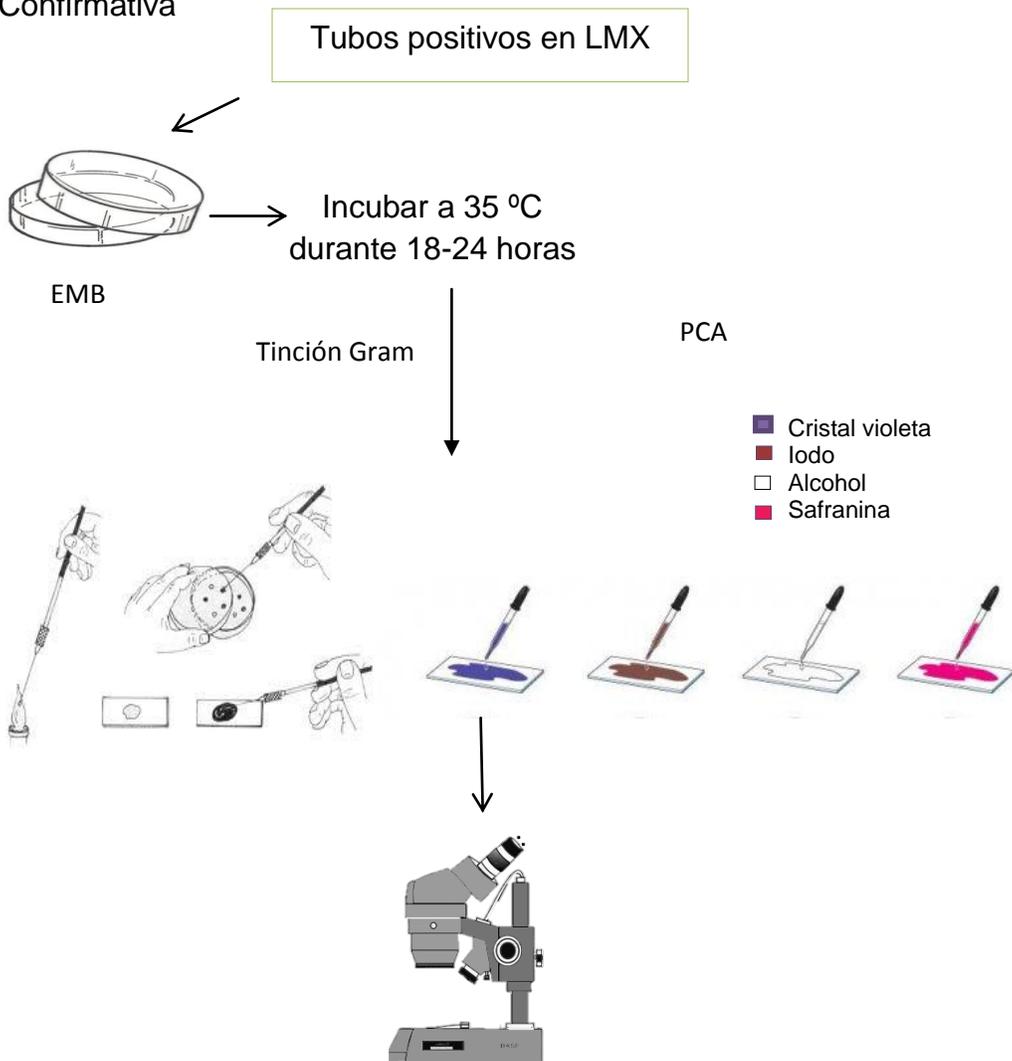


Figura Nº 52: Siembra y confirmación de *Escherichia coli*

ANEXO Nº 14

**TABLAS DE VALORES MAXIMOS ADMISIBLES SEGÚN
NORMATIVAS INTERNACIONALES PARA LOS
PARAMETROS ANALIZADOS**

**Tabla N° 5: Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos.
Productos de la Pesca. Pescados frescos-refrigerados y congelados
(RTCA 67.04.50:08). ⁽¹¹⁾**

9.0 Grupo de Alimento: Pescado, derivados y productos marinos. Esta amplia categoría se subdivide en categorías para el pescado fresco y para diversos productos marinos elaborados. Se incluyen en ella los vertebrados acuáticos y mamíferos acuáticos (p. ej., ballenas), los invertebrados acuáticos (p. ej., medusas), los moluscos (p. ej., almejas y caracoles), los crustáceos (p. ej., camarones cangrejos, langostas). Los productos marinos se pueden recubrir, p. ej., con glaseados o especias, antes de su comercialización para el consumo (p. ej., filetes de pescado congelados y glaseados). En el SCA esto se indica con una anotación relativa al “uso como glaseado o recubrimiento (tratamiento de superficie)”			
9.1 Subgrupo del alimento: Pescado y productos marinos frescos, congelados, incluidos moluscos, crustáceo y equinodermos, empacados.			
Parámetro	Categoría	Tipo de riesgo	Límite máximo permitido
<i>Escherichia coli</i>	4	A	10 ² UFC/g
<i>Staphylococcus aureus</i> (solo para pescados)	7		10 ³ UFC/g
<i>Salmonella ssp/25 g</i>	10		Ausencia
<i>Listeria monocytogenes/25 g</i> (solo para producto crudo listo para consumo, ejemplo sushi y ceviche)	10		Ausencia
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (solo para moluscos bivalvos)	8		10 ³ UFC/g

Tabla N° 6: Norma Internacional OMS (Organización Mundial de la Salud para Aguas Recreacionales. ⁽¹²⁾

Criterios de calidad admisibles para la destinación del recurso hídrico para **uso recreacional. Mediante contacto primario**

Coliformes Totales	expresado en NMP	2000 NMP./100 ml
Coliformes Fecales	expresado en NMP	1.000 NMP/100 ml
Compuestos Fenólicos	expresado en mg/l de Fenol	0,002
Oxígeno Disuelto	%	70 % de la concentración de saturación a la temperatura media
pH	unidades	5,0 – 9,0
Tensoactivos	expresado en mg/l de Sustancias activas al azul de metileno	0,5

Notas:

No se acepta en el recurso película visible de grasas y aceites flotantes, presencia de material flotante proveniente de actividad humana; sustancias tóxicas o irritantes cuya acción por contacto, ingestión o inhalación, produzcan reacciones adversas sobre la salud humana.

El nitrógeno y el fósforo deberán estar en proporciones que no ocasionen eutroficación.

Tabla N° 7: Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos. Según Guía Técnica para el Análisis Microbiológico de superficies en contacto con alimentos, proveniente de las normas legales de Perú del ministerio de salud. ⁽¹³⁾

Método del Enjuague de manos:

Método Enjuague	Superficies vivas
Ensayo	Límite de detección del método
Coliformes totales	< 100 UFC/manos
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 100 UFC/manos
Patógeno	Ausencia/manos

Aunque la normativa mencione otras determinaciones, en este estudio solamente se analizara la presencia de ***Staphylococcus aureus*** y como patógeno ***E. coli***.

ANEXO N° 15:

TABLA PARA CALCULAR EL NUMERO MAS PROBABLE (NMP)

TABLE 9221:IV. MPN INDEX AND 95% CONFIDENCE LIMITS FOR VARIOUS COMBINATIONS OF POSITIVE RESULTS WHEN FIVE TUBES ARE USED PER DILUTION (10 mL, 1.0 mL, 0.1 mL)*

Combination of Positives	MPN Index/ 100 mL	Confidence Limits		Combination of Positives	MPN Index/ 100 mL	Confidence Limits	
		Low	High			Low	High
0-0-0	<1.1	—	6.8	4-0-3	25	9.8	70
0-0-1	1.8	0.090	6.8	4-1-0	17	6.0	40
0-1-0	1.8	0.090	6.9	4-1-1	21	6.8	42
0-1-1	3.6	0.70	10	4-1-2	26	9.8	70
0-2-0	3.7	0.70	10	4-1-3	31	10	70
0-2-1	5.5	1.8	15	4-2-0	22	6.8	50
0-3-0	5.6	1.8	15	4-2-1	26	9.8	70
1-0-0	2.0	0.10	10	4-2-2	32	10	70
1-0-1	4.0	0.70	10	4-2-3	38	14	100
1-0-2	6.0	1.8	15	4-3-0	27	9.9	70
1-1-0	4.0	0.71	12	4-3-1	33	10	70
1-1-1	6.1	1.8	15	4-3-2	39	14	100
1-1-2	8.1	3.4	22	4-4-0	34	14	100
1-2-0	6.1	1.8	15	4-4-1	40	14	100
1-2-1	8.2	3.4	22	4-4-2	47	15	120
1-3-0	8.3	3.4	22	4-5-0	41	14	100
1-3-1	10	3.5	22	4-5-1	48	15	120
1-4-0	10	3.5	22	5-0-0	23	6.8	70
2-0-0	4.5	0.79	15	5-0-1	31	10	70
2-0-1	6.8	1.8	15	5-0-2	43	14	100
2-0-2	9.1	3.4	22	5-0-3	58	22	150
2-1-0	6.8	1.8	17	5-1-0	33	10	100
2-1-1	9.2	3.4	22	5-1-1	46	14	120
2-1-2	12	4.1	26	5-1-2	63	22	150
2-2-0	9.3	3.4	22	5-1-3	84	34	220
2-2-1	12	4.1	26	5-2-0	49	15	150
2-2-2	14	5.9	36	5-2-1	70	22	170
2-3-0	12	4.1	26	5-2-2	94	34	230
2-3-1	14	5.9	36	5-2-3	120	36	250
2-4-0	15	5.9	36	5-2-4	150	58	400
3-0-0	7.8	2.1	22	5-3-0	79	22	220
3-0-1	11	3.5	23	5-3-1	110	34	250
3-0-2	13	5.6	35	5-3-2	140	52	400
3-1-0	11	3.5	26	5-3-3	170	70	400
3-1-1	14	5.6	36	5-3-4	210	70	400
3-1-2	17	6.0	36	5-4-0	130	36	400
3-2-0	14	5.7	36	5-4-1	170	58	400
3-2-1	17	6.8	40	5-4-2	220	70	440
3-2-2	20	6.8	40	5-4-3	280	100	710
3-3-0	17	6.8	40	5-4-4	350	100	710
3-3-1	21	6.8	40	5-4-5	430	150	1100
3-3-2	24	9.8	70	5-5-0	240	70	710
3-4-0	21	6.8	40	5-5-1	350	100	
3-4-1	24	9.8	70	5-5-2	540	150	
3-5-0	25	9.8	70	5-5-3	920	220	2600
4-0-0	13	4.1	35	5-5-4	1600	400	4600
4-0-1	17	5.9	36	5-5-5	>1600	700	—
4-0-2	21	6.8	40				

* Results to two significant figures.

ANEXO N° 16

**INFORME BRINDADO A LAS AUTORIDADES DEL MINISTERIO DE
AGRICULTURA Y GANADERIA (MAG).**

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



TEMA:

DETERMINACIÓN DEL PERFIL BACTERIOLÓGICO DE *Oreochromis niloticus* (TILAPIA) FRESCA Y SU RESPECTIVA AGUA DE ESTANQUE PROVENIENTE DEL CANTÓN ATIOCOYO, MUNICIPIO DE SAN PABLO TACACHICO, LA LIBERTAD.

RESULTADOS A PRESENTAR A LA DIVISIÓN DE SERVICIOS VETERINARIOS (SANIDAD ACUÍCOLA) DEL MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA (MAG).

REALIZADOS POR:

MARLIN YANETH ROMERO MONGE

MARIO HERBERT ROMERO RIVERA

RESUMEN

En el último tiempo el cultivo de tilapia a incrementado considerablemente en especial en el canton Atiocoyo, San Pablo Tacachico, La Libertad cuyos habitantes ven como ingreso económico el cultivo y cosecha de esta, con la dificultad que a nivel nacional no existe un estudio que brinde información acerca de cómo se encuentran microbiológicamente hablando las tilapias que ahí se cultivan considerando la fuente de agua que utilizan para el cultivo y como se encuentra el sitio de cultivo si es el optimo o no.

Para dar respuesta a todas estas interrogantes se realizaron visitas a los estanques de Atiocoyo inspeccionando las instalaciones por medio de una guía de inspección basada en el cumplimiento de las Buenas Prácticas Acuicolas, así como también se evaluó la calidad del agua de los estanques para lo cual se tomaran 10 muestras y se aislo, identifico y confirmo la presencia de Coliformes totales y fecales que respectivamente se comparo con la normativa de aguas recreacionales OMS (Organización Mundial para la Salud), se analizaron 9 tilapias por estanque lo cual da un total de 90 tilapias frescas en donde se aislo, identifico y confirmo la presencia de ***Escherichia coli***, ***Staphylococcus aureus***, ***Listeria monocytogenes***, ***Vibrium parahaemolyticus*** y ***Salmonella sp*** en el musculo y visceras comparando los resultados con la normativa del RTCA (Reglamento Técnico Centroamericano) 67.04.50:08. Y como último análisis se evaluó a 10 manipuladores directos de la tilapia fresca en los que se aisló, identifico y confirmo la presencia de ***Escherichia coli*** y ***Staphylococcus aureus*** comprando los resultados con la normativa de Perú del Ministerio de Salud para superficies vivas.

Dichos análisis se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud CENSALUD en el periodo de Mayo a Junio del año 2012.

Luego de los resultados se concluye que el perfil bacteriológico de la tilapia que se cultiva en Atiocoyo es que la bacteria que predomina en musculo y vísceras es ***Escherichia coli*** debido a la fuente de agua que utilizan para cultivarla el rio Sucio que está altamente contaminado por Coliformes Totales y Fecales. La infraestructura de las granjas de cultivo no es la adecuada ya que no cumplen la gran mayoría con las especificaciones de las Buenas Prácticas Acuícolas y en los manipuladores se identifico ***Escherichia coli*** lo que indica una contaminación de origen fecal por malas prácticas higiénicas de parte del personal en cuanto al correcto lavados de manos.

Por lo que se recomienda que las granjas de cultivo de tilapia implementen las Buenas Prácticas Acuícolas lo que los llevara a cumplir con los demás aspectos evaluados durante la investigación como lo son tener una adecuada infraestructura de las instalaciones libres de peligro de contaminación, que el agua de los estanques sea de buena calidad, que los manipuladores cumplan con las buenas prácticas higiénicas y que las tilapias estén libres de contaminantes microbiológicas y sean aptas para el consumo.

RESULTADOS

Tabla N° 1: Resumen de las bacterias en estudio

MICROORGANISMOS	HÁBITAT	MEDIO DE TRANSMISIÓN	SIGNIFICADO DE SU PRESENCIA
<i>Escherichia coli</i>	Intestino grueso	Heces fecales, humanas y animales	Aguas contaminadas y/o falta de higiene del personal
<i>Staphylococcus aureus</i>	Nariz, boca, piel de la cara.	Secreciones nasales y bucales.	Malos hábitos de la higiene personal
<i>Salmonella spp</i>	Intestino grueso	Heces fecales, humanas y animales	Contaminación cruzada y carencia de higiene
Coliformes totales	Intestino grueso	Heces fecales	Aguas contaminadas y/o falta de higiene personal.
Coliformes fecales	Intestino grueso	Heces fecales, humanas y animales	Aguas contaminadas y/o falta de higiene del personal
<i>Listeria monocytogenes</i>	Suelo y agua	Heces de animales como vacas, palomas, gallinas, perros, gatos etc.	Contaminación del agua y suelo por heces de animales domésticos y malas prácticas de higiene
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Agua	Aguas contaminadas por heces con el <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Contaminación del agua y malas prácticas higiénicas.

INFORME DE ANÁLISIS

Tabla N° 2: Resultados Granja N° 1 **CENDEPESCA**
AGUA DEL ESTANQUE

DETERMINACIÓN	RESULTADOS	ESPECIFICACIONES
Bacterias coliformes totales	47 NMP/100mL	2000 NMP/100mL
Bacterias coliformes fecales	31 NMP/100mL	1000 NMP/100mL
NMP Número más Probable		
OBSERVACIONES: Especificaciones basadas en la Norma Internacional OMS (Organización Mundial de la Salud) para Aguas Recreacionales apta para crianza de peces.		

MANIPULADOR (MANOS)

DETERMINACIÓN	RESULTADOS	ESPECIFICACIONES
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 1UFC	< 100 UFC/manos
<i>Escherichia coli</i>	1.8 NMP/100mL	< 1.1 NMP / 100 mL
UFC Unidad Formadora de Colonia NMP Número más Probable		
OBSERVACIONES: Especificaciones basadas en la normas legales de Perú del ministerio de salud, manipuladores no aptos para manipular alimentos.		

TILAPIA

DETERMINACIÓN	RESULTADOS		ESPECIFICACIONES
	Visceras	Carne	
<i>Escherichia coli</i>	7,200	13,900	10 ² UFC/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 1UFC	< 1UFC	10 ³ UFC/g
<i>Salmonella sp</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>
UFC Unidad Formadora de Colonia			
OBSERVACIONES: Especificaciones basadas en la normativa del Reglamento Técnico Centroamericano 67.04.50:08. Alimento apto para consumo humano bien cocinado no crudo			

INFORME DE ANÁLISIS

Tabla N° 3: Resultados Granja N° 2 **Ángel Sarmiento**
AGUA DEL ESTANQUE

DETERMINACIÓN	RESULTADOS	ESPECIFICACIONES
Bacterias coliformes totales	47 NMP/100mL	2000 NMP/100mL
Bacterias coliformes fecales	31 NMP/100mL	1000 NMP/100mL
NMP Número más Probable		
OBSERVACIONES: Especificaciones basadas en la Norma Internacional OMS (Organización Mundial de la Salud) para Aguas Recreacionales apta para crianza de peces.		

MANIPULADOR (MANOS)

DETERMINACIÓN	RESULTADOS	ESPECIFICACIONES
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 1UFC	< 100 UFC/manos
<i>Escherichia coli</i>	21 NMP/100mL	< 1.1 NMP / 100 mL
UFC Unidad Formadora de Colonia NMP Número más Probable		
OBSERVACIONES: Especificaciones basadas en la normas legales de Perú del ministerio de salud, manipuladores no aptos para manipular alimentos.		

TILAPIA

DETERMINACIÓN	RESULTADOS		ESPECIFICACIONES
	Visceras	Carne	
<i>Escherichia coli</i>	7,700 UFC/g	13,800 UFC/g	10 ² UFC/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 1UFC	< 1UFC	10 ³ UFC/g
<i>Salmonella sp</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>
UFC Unidad Formadora de Colonia			
OBSERVACIONES: Especificaciones basadas en la normativa del Reglamento Técnico Centroamericano 67.04.50:08. Alimento apto para consumo humano bien cocinado no crudo			

INFORME DE ANÁLISIS

Tabla N° 4: Resultados Granja N° 3 **Héctor Francis Guardado**
AGUA DEL ESTANQUE

DETERMINACIÓN	RESULTADOS	ESPECIFICACIONES
Bacterias coliformes totales	280 NMP/100mL	2000 NMP/100mL
Bacterias coliformes fecales	46 NMP/100mL	1000 NMP/100mL
NMP Número más Probable		
OBSERVACIONES: Especificaciones basadas en la Norma Internacional OMS (Organización Mundial de la Salud) para Aguas Recreacionales apta para crianza de peces.		

MANIPULADOR (MANOS)

DETERMINACIÓN	RESULTADOS	ESPECIFICACIONES
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 1UFC	< 100 UFC/manos
<i>Escherichia coli</i>	17 NMP/100mL	< 1.1 NMP / 100 mL
UFC Unidad Formadora de Colonia NMP Número más Probable		
OBSERVACIONES: Especificaciones basadas en la normas legales de Perú del ministerio de salud, manipuladores no aptos para manipular alimentos.		

TILAPIA

DETERMINACIÓN	RESULTADOS		ESPECIFICACIONES
	Visceras	Carne	
<i>Escherichia coli</i>	35,800 UFC/g	49,500 UFC/g	10 ² UFC/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 1UFC	< 1UFC	10 ³ UFC/g
<i>Salmonella sp</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>
UFC Unidad Formadora de Colonia			
OBSERVACIONES: Especificaciones basadas en la normativa del Reglamento Técnico Centroamericano 67.04.50:08. Alimento apto para consumo humano bien cocinado no crudo			

INFORME DE ANÁLISIS

Tabla N° 5: Resultados Granja N° 4 **Lorenzo Payes**
AGUA DEL ESTANQUE

DETERMINACIÓN	RESULTADOS	ESPECIFICACIONES
Bacterias coliformes totales	240 NMP/100mL	2000 NMP/100mL
Bacterias coliformes fecales	110 NMP/100mL	1000 NMP/100mL
NMP Número más Probable		
OBSERVACIONES: Especificaciones basadas en la Norma Internacional OMS (Organización Mundial de la Salud) para Aguas Recreacionales apta para crianza de peces.		

MANIPULADOR (MANOS)

DETERMINACIÓN	RESULTADOS	ESPECIFICACIONES
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 1UFC	< 100 UFC/manos
<i>Escherichia coli</i>	13 NMP/100mL	< 1.1 NMP / 100 mL
UFC Unidad Formadora de Colonia NMP Número más Probable		
OBSERVACIONES: Especificaciones basadas en la normas legales de Perú del ministerio de salud, manipuladores no aptos para manipular alimentos.		

TILAPIA

DETERMINACIÓN	RESULTADOS		ESPECIFICACIONES
	Visceras	Carne	
<i>Escherichia coli</i>	16,700 UFC/g	23,700 UFC/g	10 ² UFC/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 1UFC	< 1UFC	10 ³ UFC/g
<i>Salmonella sp</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>
UFC Unidad Formadora de Colonia			
OBSERVACIONES: Especificaciones basadas en la normativa del Reglamento Técnico Centroamericano 67.04.50:08. Alimento apto para consumo humano bien cocinado no crudo.			

INFORME DE ANÁLISIS

Tabla N° 6: Resultados Granja N° 5 Jorge Rivas
AGUA DEL ESTANQUE

DETERMINACIÓN	RESULTADOS	ESPECIFICACIONES
Bacterias coliformes totales	70 NMP/100mL	2000 NMP/100mL
Bacterias coliformes fecales	23 NMP/100mL	1000 NMP/100mL
NMP Número más Probable		
OBSERVACIONES: Especificaciones basadas en la Norma Internacional OMS (Organización Mundial de la Salud) para Aguas Recreacionales apta para crianza de peces.		

MANIPULADOR (MANOS)

DETERMINACIÓN	RESULTADOS	ESPECIFICACIONES
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 1UFC	< 100 UFC/manos
<i>Escherichia coli</i>	24 NMP/100mL	< 1.1 NMP / 100 mL
UFC Unidad Formadora de Colonia NMP Número más Probable		
OBSERVACIONES: Especificaciones basadas en la normas legales de Perú del ministerio de salud, manipuladores no aptos para manipular alimentos.		

TILAPIA

DETERMINACIÓN	RESULTADOS		ESPECIFICACIONES
	Visceras	Carne	
<i>Escherichia coli</i>	12,200 UFC/g	25,400 UFC/g	10 ² UFC/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 1UFC	< 1UFC	10 ³ UFC/g
<i>Salmonella sp</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>
UFC Unidad Formadora de Colonia			
OBSERVACIONES: Especificaciones basadas en la normativa del Reglamento Técnico Centroamericano 67.04.50:08. Alimento apto para consumo humano bien cocinado no crudo.			

INFORME DE ANÁLISIS

Tabla N° 7: Resultados Granja N° 6 **Sifrido Tejada**

AGUA DEL ESTANQUE

DETERMINACIÓN	RESULTADOS	ESPECIFICACIONES
Bacterias coliformes totales	920 NMP/100mL	2000 NMP/100mL
Bacterias coliformes fecales	350 NMP/100mL	1000 NMP/100mL
NMP Número más Probable		
OBSERVACIONES: Especificaciones basadas en la Norma Internacional OMS (Organización Mundial de la Salud) para Aguas Recreacionales apta para crianza de peces.		

MANIPULADOR (MANOS)

DETERMINACIÓN	RESULTADOS	ESPECIFICACIONES
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 1UFC	< 100 UFC/manos
<i>Escherichia coli</i>	21 NMP/100mL	< 1.1 NMP / 100 mL
UFC Unidad Formadora de Colonia NMP Número más Probable		
OBSERVACIONES: Especificaciones basadas en la normas legales de Perú del ministerio de salud, manipuladores no aptos para manipular alimentos.		

TILAPIA

DETERMINACIÓN	RESULTADOS		ESPECIFICACIONES
	Visceras	Carne	
<i>Escherichia coli</i>	8,700 UFC/g	20,200 UFC/g	10 ² UFC/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 1UFC	< 1UFC	10 ³ UFC/g
<i>Salmonella sp</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>
UFC Unidad Formadora de Colonia			
OBSERVACIONES: Especificaciones basadas en la normativa del Reglamento Técnico Centroamericano 67.04.50:08. Alimento apto para consumo humano bien cocinado no crudo.			

INFORME DE ANÁLISIS

Tabla N° 8: Resultados Granja N° 7 **Juan Bautista**

AGUA DEL ESTANQUE

DETERMINACIÓN	RESULTADOS	ESPECIFICACIONES
Bacterias coliformes totales	1600 NMP/100mL	2000 NMP/100mL
Bacterias coliformes fecales	350 NMP/100mL	1000 NMP/100mL
NMP Número más Probable		
OBSERVACIONES: Especificaciones basadas en la Norma Internacional OMS (Organización Mundial de la Salud) para Aguas Recreacionales apta para crianza de peces.		

MANIPULADOR (MANOS)

DETERMINACIÓN	RESULTADOS	ESPECIFICACIONES
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 1UFC	< 100 UFC/manos
<i>Escherichia coli</i>	7.8 NMP/100mL	< 1.1 NMP / 100 mL
UFC Unidad Formadora de Colonia NMP Número más Probable		
OBSERVACIONES: Especificaciones basadas en la normas legales de Perú del ministerio de salud, manipuladores no aptos para manipular alimentos.		

TILAPIA

DETERMINACIÓN	RESULTADOS		ESPECIFICACIONES
	Visceras	Carne	
<i>Escherichia coli</i>	6,800 UFC/g	23,000 UFC/g	10 ² UFC/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 1UFC	< 1UFC	10 ³ UFC/g
<i>Salmonella sp</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
UFC Unidad Formadora de Colonia			
OBSERVACIONES: Especificaciones basadas en la normativa del Reglamento Técnico Centroamericano 67.04.50:08. Alimento apto para consumo humano bien cocinado no crudo.			

INFORME DE ANÁLISIS

Tabla N° 9: Resultados Granja N° 8 **Reynaldo Viera**
AGUA DEL ESTANQUE

DETERMINACIÓN	RESULTADOS	ESPECIFICACIONES
Bacterias coliformes totales	280 NMP/100mL	2000 NMP/100mL
Bacterias coliformes fecales	110 NMP/100mL	1000 NMP/100mL
NMP Número más Probable		
OBSERVACIONES: Especificaciones basadas en la Norma Internacional OMS (Organización Mundial de la Salud) para Aguas Recreacionales apta para crianza de peces.		

DETERMINACIÓN	RESULTADOS	ESPECIFICACIONES
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 1UFC	< 100 UFC/manos
<i>Escherichia coli</i>	17 NMP/100mL	< 1.1 NMP / 100 mL
UFC Unidad Formadora de Colonia NMP Número más Probable		
OBSERVACIONES: Especificaciones basadas en la normas legales de Perú del ministerio de salud, manipuladores no aptos para manipular alimentos.		

DETERMINACIÓN	RESULTADOS		ESPECIFICACIONES
	Visceras	Carne	
<i>Escherichia coli</i>	30,800 UFC/g	45,600 UFC/g	10 ² UFC/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 1UFC	< 1UFC	10 ³ UFC/g
<i>Salmonella sp</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>
UFC Unidad Formadora de Colonia			
OBSERVACIONES: Especificaciones basadas en la normativa del Reglamento Técnico Centroamericano 67.04.50:08. Alimento apto para consumo humano bien cocinado no crudo.			

INFORME DE ANÁLISIS

Tabla N° 10: Resultados Granja N° 9 **Miguel Valle**

AGUA DEL ESTANQUE

DETERMINACIÓN	RESULTADOS	ESPECIFICACIONES
Bacterias coliformes totales	350 NMP/100mL	2000 NMP/100mL
Bacterias coliformes fecales	31 NMP/100mL	1000 NMP/100mL
NMP Número más Probable		
OBSERVACIONES: Especificaciones basadas en la Norma Internacional OMS (Organización Mundial de la Salud) para Aguas Recreacionales apta para crianza de peces.		

MANIPULADOR (MANOS)

DETERMINACIÓN	RESULTADOS	ESPECIFICACIONES
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 1UFC	< 100 UFC/manos
<i>Escherichia coli</i>	25 NMP/100mL	< 1.1 NMP / 100 mL
UFC Unidad Formadora de Colonia NMP Número más Probable		
OBSERVACIONES: Especificaciones basadas en la normas legales de Perú del ministerio de salud, manipuladores no aptos para manipular alimentos.		

TILAPIA

DETERMINACIÓN	RESULTADOS		ESPECIFICACIONES
	Visceras	Carne	
<i>Escherichia coli</i>	11,000 UFC/g	20,600 UFC/g	10 ² UFC/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 1UFC	< 1UFC	10 ³ UFC/g
<i>Salmonella sp</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>
UFC Unidad Formadora de Colonia			
OBSERVACIONES: Especificaciones basadas en la normativa del Reglamento Técnico Centroamericano 67.04.50:08. Alimento apto para consumo humano bien cocinado no crudo.			

INFORME DE ANÁLISIS

Tabla N° 11: Resultados Granja N° 10 **San Patricio**
AGUA DEL ESTANQUE

DETERMINACIÓN	RESULTADOS	ESPECIFICACIONES
Bacterias coliformes totales	47 NMP/100mL	2000 NMP/100mL
Bacterias coliformes fecales	23 NMP/100mL	1000 NMP/100mL
NMP Número más Probable		
OBSERVACIONES: Especificaciones basadas en la Norma Internacional OMS (Organización Mundial de la Salud) para Aguas Recreacionales apta para crianza de peces.		

MANIPULADOR (MANOS)

DETERMINACIÓN	RESULTADOS	ESPECIFICACIONES
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 1UFC	< 100 UFC/manos
<i>Escherichia coli</i>	< 1.1 NMP/100mL	< 1.1 NMP / 100 mL
UFC Unidad Formadora de Colonia NMP Número más Probable		
OBSERVACIONES: Especificaciones basadas en la normas legales de Perú del ministerio de salud, manipuladores no aptos para manipular alimentos.		

TILAPIA

DETERMINACIÓN	RESULTADOS		ESPECIFICACIONES
	Visceras	Carne	
<i>Escherichia coli</i>	7,300 UFC/g	9,700 UFC/g	10 ² UFC/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 1UFC	< 1UFC	10 ³ UFC/g
<i>Salmonella sp</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Ausencia</i>
UFC Unidad Formadora de Colonia			
OBSERVACIONES: Especificaciones basadas en la normativa del Reglamento Técnico Centroamericano 67.04.50:08. Alimento apto para consumo humano bien cocinado no crudo.			

ANEXO N° 17

**UBICACIÓN GEOGRAFICA DE ATIOCOYO, SAN PABLO TACACHICO, LA
LIBERTAD.**



Figura N° 52: Ubicación Geográfica de Atiocoyo, San Pablo Tacachico, La Libertad