

EFFECTOS DEL DETERIORO PRODUCIDO POR
MIXOSPORIDIOS DE LA ESPECIE *Kudoa rosenbuschi*
EN LA MUSCULATURA DE *Merluccius hubbsi* ⁽¹⁾

por

NORMA H. SARDELLA *. JORGE L. TRINCHERO * Y EMILIO A. MANCA *

Palabras claves: mixosporidios, *Kudoa*, merluza, deterioro.

Key words: myxosporidia, *Kudoa*, hake, spoilage.

SUMMARY

Spoilage effects in the muscle of *Merluccius hubbsi* caused by *Kudoa rosenbuschi* myxosporidia.

Parasitized and non-parasitized hake fillets obtained at fish processing plants were compared in order to assess the effects of *Kudoa rosenbuschi* myxosporidia on muscle of *Merluccius hubbsi*.

The following studies were carried out: a) incidence and severity of parasitism; b) proteolytic activity and spoilage at a histologic level; c) pH and proximal composition in parasitized and non-parasitized fillets; and d) parasitism action on gelified products.

Twelve samples were analyzed in two consecutive winter seasons, totalizing 1,211 fillets, of which 243 were macroscopically found to be parasitized (20,07 % parasitism).

Qualitative studies on proteolytic activity showed the existence of proteolysis in the periphery of cysts, even in fillets kept at 4° C.

Also noted was that microscopic cysts, with no conjunctive walls, have a higher lytic effect —because of the lack of the defensive barrier imposed by the host— which is present in larger cysts.

Based on the initial quality of the samples, it was noted that, as quality diminishes pH in parasitized fillets tends to increase in a larger proportion than in non-parasitized ones and that the proteic content diminishes in parasitized fillets.

Differences were also found at effecting sensory assessment of the texture of non-parasitized fillets, and those of parasitized and cooked through various methods in comparison with the quality of gelified products.

Good quality fillets showed changes in their textures when they were parasitized. Similar changes were observed in fillets of lesser quality without the presence of parasites.

Gel strength, elasticity and organoleptic level in gelified products were lower for parasitized samples.

Recommendations are put forward as to conditioning and cooling of the catch and subsequent processing in order to lessen the effects of parasitism.

(1) Contribución INIDEP N° 642.

* Investigador del INIDEP.

INTRODUCCION

Los mixosporidios son considerados como el grupo más importante de protozoos parásitos de peces debido a los daños que ocasionan a sus hospedadores. Los que parasitan la musculatura producen histólisis intensa conocida como "milk-ness" o lechosidad, por la transformación que se observa en la textura de la carne, pudiendo llegar en ocasiones a la completa licuefacción de las fibras musculares. Así, para *Merluccius productus*, Patashnik *et al.* (1982), Kabata y Whitaker (1985) y Nelson *et al.* (1985) acentúan las limitaciones para la explotación de esta especie, por el rápido ablandamiento de la carne producido por *Kudoa thyrssites* y *K. paniformis*.

Merluccius hubbsi se encuentra parasitada por un mixosporidio de la especie *Kudoa rosenbuschi*. Los quistes parasitarios están ubicados en el seno de la musculatura, de forma y tamaño variables, de color blanco a negro, atendiendo a sus diferentes grados de desarrollo. La infestación comienza siendo intracelular en la musculatura, y existe toda una gradación en la parasitosis, desde los quistes incipientes hasta los quistes visibles, primeramente blancos, y luego por reacción del hospedador, de color oscuro (Sardella, 1984).

Es de destacar que no existen estudios previos a escala tecnológica para *Merluccius hubbsi* que clarifiquen cómo funciona este sistema parasitario, y que permitan comparar las características de esta especie con respecto a otros merlúcidos (*M. productus*, *M. gayi*) en las cuales la mixosporidiosis muscular constituye un verdadero inconveniente para el mantenimiento, la comercialización y el consumo de estos recursos.

El objetivo del presente trabajo es conocer los efectos del deterioro producido por esta parasitosis, a fin de determinar la incidencia en la calidad de productos tradicionales como el filet, y nuevos, como los productos gelificados, y eventualmente recomendar el tratamiento más adecuado por parte de la industria.

Se abordaron los siguientes estudios: a) incidencia y severidad de la parasitosis; b) actividad proteolítica y deterioro a nivel histológico; c) determinación de la calidad inicial de las muestras; d) pH y composición proximal en filetes parasitados y no parasitados; e) efectos de la parasitosis sobre la textura; y f) acción de la parasitosis sobre productos gelificados.

MATERIAL Y METODOS

INCIDENCIA Y SEVERIDAD

Las muestras consistieron en filetes frescos de merluza provenientes de empresas marplatenses. Se cubrieron dos períodos invernales consecutivos (1985-1986), analizándose 12 muestras con un total de 1.211 filetes.

Cada filet fue observado por transparencia de ambas caras con ayuda de un visor portátil. Se los dividió en dos zonas (mitad anterior y mitad caudal) a fin de sumarizar el número y el porcentaje de quistes presentes en cada una de ellas. Se registraron los pesos de cada filet, y el peso promedio de cada muestra; se separaron lotes de filetes parasitados y no parasitados para su posterior procesamiento en el laboratorio.

Para establecer la severidad de la parasitosis (número de quistes por filet) se clasificaron los filetes con hasta 5 quistes, con más de 10 y con más de 30 quistes.

ACTIVIDAD PROTEOLITICA Y DETERIORO A NIVEL HISTOLÓGICO

Se utilizaron tres placas de Petri, a las cuales se les colocó una capa de agar inerte, y sobre ésta, una capa de agar gelatina muy delgada. Se dividieron las placas en 4 zonas (I, II, III y IV), a los efectos de unificar los tratamientos a los que se expusieron posteriormente. En la zona I se ubicó una pieza de músculo solo, sin parásitos, a manera de testigo. En la zona II se colocó un trozo de musculatura con un quiste. En la zona III se ubicó un quiste entero, sin músculo circundante, y en la zona IV un aplastado de un quiste, para dejar a las esporas sueltas en contacto directo con la gelatina. Se procedió de la misma manera en las tres placas (Figura 1). Una de ellas se incubó a 37° C por 24 hs. La segunda placa se mantuvo a temperatura ambiente por 24 hs y la tercera se incubó en heladera a 4° C por 72 hs. Cumplidos los tiempos, se retiró el material, y las proteínas fueron precipitadas con ácido tricloroacético al 5 %, revelándose las zonas de actividad proteásica como halos transparentes sobre un fondo opaco.

Con respecto a los ensayos sobre deterioro a nivel histológico, se trabajaron muestras prove-

nientes de la campaña H-01-83 del B.I.P. "Dr. E. Holmberg", partiendo de material de merluza a tiempo cero. Se procesaron 21 ejemplares, fileteándose rápidamente. Algunos trozos de músculo parasitado se fijaron inmediatamente en Carnoy.

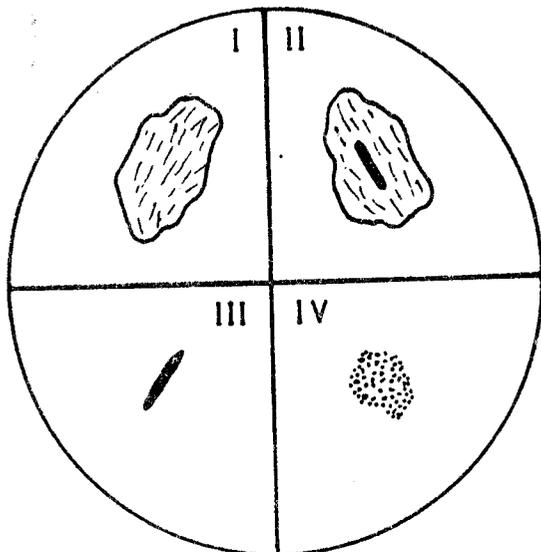


FIG. 1: Ensayo sobre actividad proteolítica.

El resto fue incubado a temperatura ambiente a intervalos distintos de tiempo (2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24 y 48 hs) para seguir el deterioro en función del tiempo a partir del momento de captura. Posteriormente, se fijaron las piezas y se procesaron con la técnica de hematoxilina y eosina de uso convencional.

CALIDAD INICIAL DE LAS MUESTRAS

Se determinó la calidad inicial de las muestras mediante la evaluación sensorial de los filetes crudos (olor, color y textura) y cocidos (olor, color, sabor y textura), obteniéndose un grado de calidad final de acuerdo a una escala estructurada en 5 puntos (muy buena, buena, regular, mala y muy mala). Paralelamente se determinó el contenido de bases volátiles nitrogenadas (N. B. V.) por el método de Lücke y Geidel (1935), modificado por Antonacopoulos (1963), con un tiempo de destilación de 20 minutos.

pH Y COMPOSICION PROXIMAL

Para estas determinaciones se tomó un pool de filetes no parasitados y parasitados. Los datos de

pH fueron registrados con un pHímetro digital SGH con electrodo de punción para carnes.

Las proteínas se determinaron por el método de Kjeldahl en un equipo Büchi, la humedad por medio de un desecador infrarrojo Mettler y las cenizas se obtuvieron en una mufla a 500-550° C. Los lípidos se determinaron por el método de Bligh y Dyer (1959) modificado por Hanson y Olley (1963).

EFFECTOS DE LA PARASITOSIS SOBRE LA TEXTURA

Las muestras se sometieron a ensayos de cocción lenta (horno y vapor) y rápida (horno de microondas y frito) a los efectos de observar si la parasitosis desarrollaba textura anormal. La textura se evaluó sensorialmente en la característica mecánica de dureza (firme a blanda).

ACCION DE LA PARASITOSIS SOBRE PRODUCTOS GELIFICADOS

Se procesaron en forma separada los filetes parasitados y no parasitados. En los parasitados se tomaron las porciones de musculatura que con-

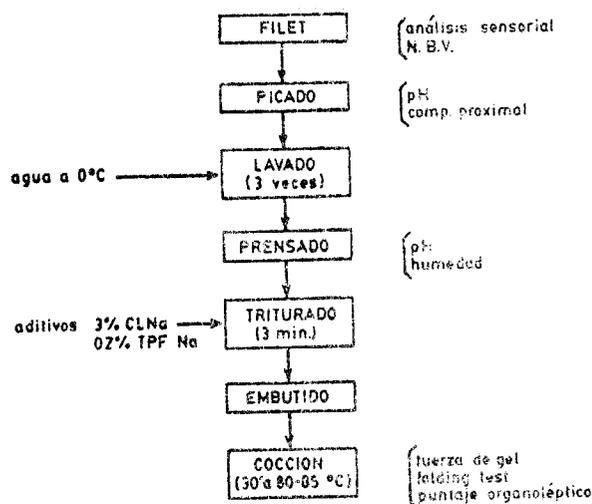


FIG. 2: Diagrama de flujo para las muestras de productos gelificados.

tenían los quistes parasitarios. Las muestras se desmenuzaron en una picadora con perforaciones de 4 mm de diámetro. El músculo desmenuzado se lavó 3 veces con agua a 0° C en una relación de 5 partes de agua por 1 de pescado. Se eliminó

el exceso de agua por prensado hasta reducir la humedad de la muestra a valores próximos al 82 %. El músculo prensado se trituró en una multiprocesadora National durante 3 minutos, adicionándole 3 % de cloruro de sodio y 0,2 % de tripolifosfato de sodio. Se embutió en tripas de celulosa recubierta, de 4 cm de ancho plano. La cocción de los embutidos se efectuó en agua a 85 - 90° C durante 30 minutos. En la Figura 2 se indica el diagrama de flujo del proceso.

Se obtuvieron las siguientes muestras: músculo sin lavar no parasitado (NPSL), músculo lavado no parasitado (NPL), músculo sin lavar parasitado (PSL), y músculo lavado parasitado (PL).

La fuerza de gel es uno de los índices más importantes para determinar la calidad de los productos gelificados. Se define como el producto entre la fuerza necesaria para romper la superficie del gel y la deformación producida en el mismo. Para determinarla se utilizó un reómetro RHEO-TEX TYP-SD-302 con un huso esférico de 0,5 cm de diámetro. Se tomaron dos secciones cilíndricas de la muestra, de 2,5 cm de espesor, midiendo tres puntos en cada cara. La elasticidad se midió con el Folding Test, según la adaptación de Kudo *et al.* (1973) de la escala de Nishiya (1963), con valores que van de 5 puntos (extremadamente elástico) a 1 punto (se rompe al presionar con los dedos).

Con respecto a las determinaciones organolépticas, se evaluó la textura mediante una tabla de 10 puntos (extremadamente firme: 10 puntos; extremadamente blanda: 1 punto), caracterizando la sensación al morder una pieza cilíndrica de 3 cm de alto (Kudo *et al.*, 1973).

RESULTADOS Y DISCUSION

a) Incidencia y severidad de la parasitosis

Las 12 muestras analizadas totalizaron 1.211 ejemplares, de los cuales 243 se encontraron visiblemente parasitados (20,07 %) (Tabla 1).

La severidad registrada fue la siguiente:

hasta 5 quistes:	123 filetes (51,12 %);
de 5 a 10 quistes:	46 filetes (18,93 %);
más de 10 quistes:	37 filetes (23,46 %);
más de 30 quistes:	17 filetes (6,99 %).

Con respecto a las zonas de ubicación de los parásitos en el filete, la mitad anterior presentó un porcentaje de 59 % y la mitad caudal el 41 % restante.

b) Actividad proteolítica y deterioro a nivel histológico

En la placa incubada a 37° C hubo un gran desarrollo bacteriano; la lisis fue muy alta por la adición de proteasas microbianas. En la placa incubada a temperatura ambiente el crecimiento bacteriano fue menor, apareciendo halos proteolíticos en las cuatro zonas. La placa mantenida en heladera arrojó resultados más precisos. En las zonas I y II no aparecieron halos, en cambio en las III y IV (quiste solo y esporas sueltas) aparecieron halos tenues y no se detectó crecimiento bacteriano. Estas zonas de digestión proteica son de índole parasitaria.

Se puede afirmar que ya existe deterioro neto, y en ocasiones generalizado en el pez vivo. La infestación comienza intracelularmente en la musculatura, ubicándose las esporas en el interior de las células musculares. El estar dentro de las células les permite a los parásitos pasar inadvertidos por el hospedador hasta que por multiplicación invaden áreas considerables del músculo. Recién cuando atraviesan la membrana celular pueden ser detectados por el aparato inmunológico-defensivo de la merluza. A partir de este momento comienzan a formarse los quistes por reacción del hospedador.

Interesa destacar la acción proteolítica alrededor del quiste. Macroscópicamente se puede observar que los quistes negros ubicados en el seno de la musculatura se extraen con suma facilidad al tomarlos de un extremo, sin estar entremezclados en la trama del tejido muscular, o sea se detecta una destrucción localizada del músculo alrededor del quiste.

A nivel histológico, durante el transcurso de la incubación aumenta la lisis muscular, pero no se observan daños mayores periquísticos en los quistes que poseen fuertes paredes conjuntivas (negros). La barrera conjuntivo-reaccional resulta efectiva aun *post-mortem*, no ocurriendo lo mismo para *Mer'uccius productus* va que Patashnik *et al.* (1982) citan que a las 16 hs de incubación los quistes rompen sus paredes, quedando las esporas sueltas en el tejido muscular. Para *Mer'uccius gayi peruanus* Okada *et al.* (1981) observaron que el 75 % de las merluzas parasita-

das presentaron quistes blancos. Esta situación es diferente en *M. hubbsi* ya que el mayor porcentaje de quistes poseen paredes conjuntivas (negros)

En *M. hubbsi*, si se trata de esporas sueltas, o de quistes con paredes incipientes (blancos) o sin paredes, la actividad proteolítica es evidente, li-



Fig. 3: Deterioro a nivel histológico.

q = quiste parasitario sin paredes.
fm = fibra muscular lisada. 10x.

sándose completamente la musculatura periquística (Figura 3). A ello se le suma que luego de la muerte, el aparato inmunológico defensivo del hospedador se detiene por completo.

c) Calidad inicial de las muestras

Las muestras analizadas abarcaron un rango de calidad desde muy bueno hasta muy malo. En la Tabla 2 se indica el grado de calidad de cada una y los correspondientes valores de N. B. V., obteniéndose un coeficiente de correlación entre la evaluación sensorial y los valores de N. B. V. de 0,930.

La calidad inicial se tomó como referencia en los posteriores estudios sobre el efecto de la parasitosis en el músculo de *Merluccius hubbsi*.

d) pH y composición proximal

En la Tabla 3 se indican los valores promedio del pH de las muestras parasitadas y no parasitadas de acuerdo al grado de calidad inicial. Se observa que el pH de las muestras no parasitadas y parasitadas es similar en las muestras de calidad muy buena, mientras que en muestras de calidad inferior, el aumento del pH por efecto

del deterioro es más marcado en los filetes parasitados. La muestra de calidad intermedia (R - B) no siguió el mismo comportamiento que las demás.

De acuerdo a los datos obtenidos de la composición proximal en filetes no parasitados y parasitados, se observó una tendencia a la disminución de las proteínas totales en los filetes parasitados, más marcada en aquellos con mayor severidad de parasitosis. El contenido proteico de los filetes no parasitados y parasitados en relación con la calidad inicial de las muestras se indica en la Tabla 4. Las muestras 9 y 12, con una severidad de más de 5 quistes mayor del 50 %, presentan una disminución del contenido proteico del 1,09 % y 5,36 % respectivamente.

Patashnik *et al.* (1982), comparando la composición proximal de filetes ligera a moderadamente parasitados con filetes excesivamente parasitados de *Merluccius productus*, encontraron una disminución de proteínas del orden del 28 %.

e) Efectos de la parasitosis sobre la textura

En la Figura 4 se observan los resultados de la evaluación sensorial de la textura de filetes pa-

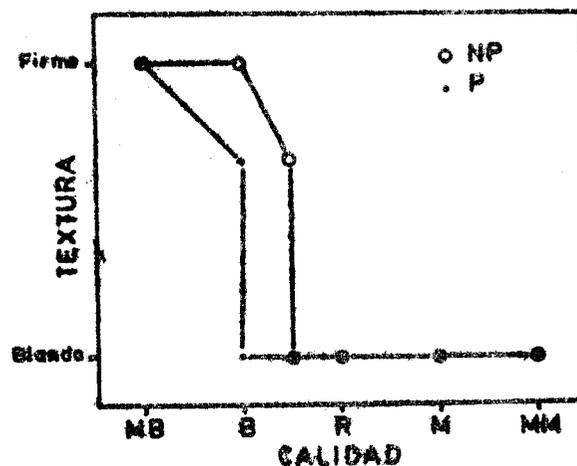


Fig. 4: Efecto de la parasitosis sobre la textura.

rasitados y no parasitados, agrupando las muestras de acuerdo al grado de calidad inicial.

Las muestras de calidad muy buena presentaron una textura firme en los distintos métodos de cocción, tanto los filetes parasitados como los no parasitados. En las de calidad buena, se diferenció la textura de filetes parasitados y no

parasitados. Mientras que la de los primeros fue firme en los distintos métodos de cocción, la de los segundos varió desde ligeramente firme a blanda.

En las muestras de calidad intermedia regular-buena, ensayadas con cocción al horno de microondas, los filetes no parasitados presentaron una textura de ligeramente blanda a blanda, y los parasitados definitivamente blanda. Las de calidad regular, mala y muy mala no presentaron diferencias apreciables de textura entre filetes parasitados y no parasitados en los distintos métodos de cocción, siendo blanda en todos los casos.

En las muestras parasitadas se observó que los quistes negros permanecían encapsulados, sin una

lisis extensiva alrededor del quiste, y que había una zona de lisis localizada más apreciable alrededor de los quistes blancos.

f) Acción de la parasitosis sobre los productos gelificados

En la Figura 5 se evidencian las diferencias de fuerza de gel de las muestras parasitadas y no parasitadas partiendo de músculo sin lavar, y agrupadas de acuerdo al grado de calidad. En todas las muestras se observó una disminución de la calidad de los geles en los filetes parasitados. Estas muestras permiten apreciar claramente la acción de las proteasas parasitarias.

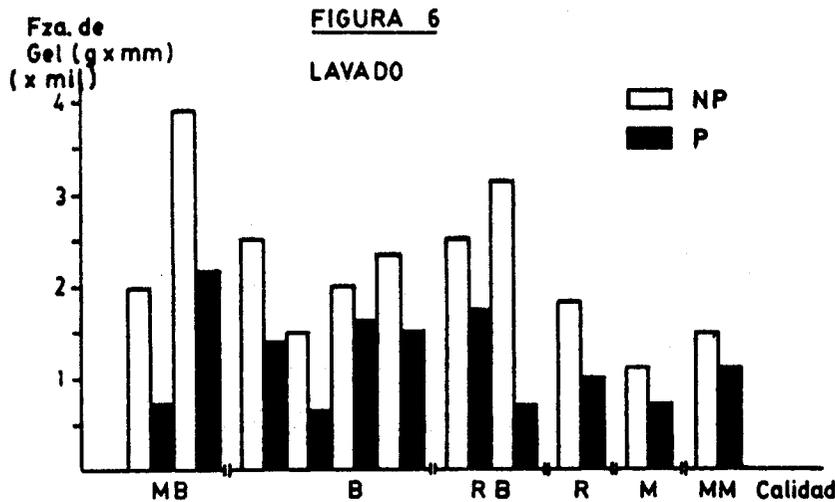
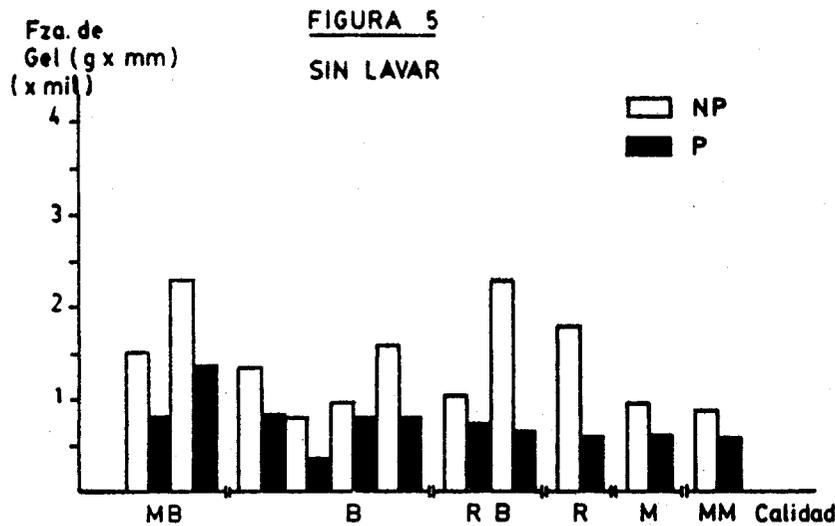


FIG. 5: Fuerza de gel vs. calidad en músculo sin lavar.

FIG. 6: Fuerza de gel vs. calidad en músculo lavado.

En la Figura 6 se representan los datos ordenados de igual manera para los geles obtenidos de músculo lavado. En todos los casos los valores de fuerza de gel fueron mayores que los obtenidos en muestras sin lavar dado que se elimina la proteína sarcoplasmática que interfiere negativamente en el proceso de formación de gel. De igual modo es apreciable la calidad inferior en las muestras parasitadas.

Las mismas tendencias se observaron al comparar los valores promedio de Folding Test y de puntaje organoléptico de geles obtenidos a partir de músculo lavado (Figuras 7 y 8).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se encontró que la incidencia parasitaria promedio visible fue de alrededor del 20 %, con casi el 50 % de los filetes parasitados con más de 5 quistes, siendo la mitad anterior del filete la más parasitada.

En condiciones de conservación en fresco apareció actividad proteolítica periquística en los quistes negros a las 72 hs de incubación. En los quistes sin paredes, microscópicos o blancos, la lisis fue mayor, manifestándose en el pez vivo e intensificándose *post-mortem*.

Se registró un aumento del pH en mayor proporción en filetes parasitados que en los no parasitados al disminuir la calidad inicial de las muestras. La disminución del contenido proteico en filetes parasitados fue ligeramente más acentuada, en especial en aquellos filetes con alta severidad de parasitosis, no llegando a los niveles registrados para *Merluccius productus*.

Los cambios de textura entre filetes parasitados y no parasitados se evidenciaron en muestras de buena calidad inicial, y no se observaron diferencias significativas de textura con los diferentes métodos de cocción (lenta y rápida), sí encontradas para las merluzas del Pacífico.

Los geles obtenidos a partir de filetes parasitados, tanto de músculo lavado como sin lavar, fueron de calidad inferior. Si bien en el lavado se eliminan conjuntamente con las proteínas sarcoplasmáticas las enzimas proteolíticas de origen parasitario, los resultados demuestran que el deterioro que ocasionan estas enzimas a las proteínas miofibrilares es irreversible.

El buen uso del frío, un recurso fundamental para conservar la frescura del pescado, atenuaría el efecto parasitario, ya que si bien es irreversible en lo que respecta al daño en las miofibrillas y se manifiesta en el pez en actividad, aumenta notablemente con una mala conservación.

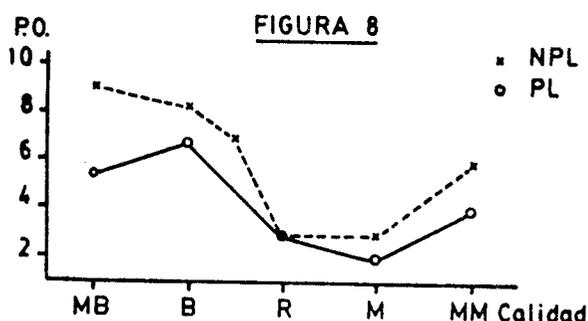
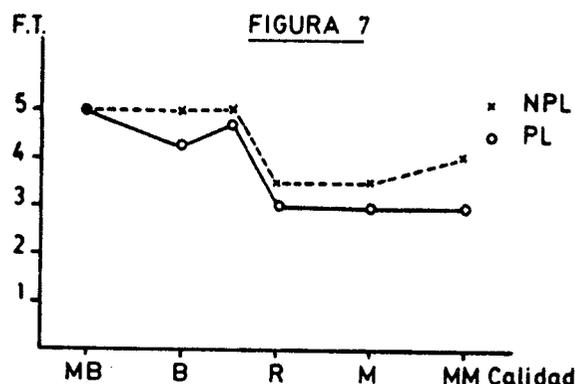


FIG. 7: Folding test vs. calidad en músculo lavado.

FIG. 8: Puntaje organoléptico vs. calidad en músculo lavado.

Interesa destacar la influencia que esta parasitosis puede tener en productos intermedios como el "surimi", cuyo destino final es la elaboración de productos gelificados. Debe considerarse la acción que una alta concentración de quistes puede ocasionar sobre las propiedades de éstos.

BIBLIOGRAFIA

- HANSON, S. W. F. y OLLEY, J. 1963. Application of the Bligh and Dyer method of lipid extraction to tissue homogenates. *Biochem. J.*, 89 (3): 101-102.
- KABATA, Z. y WHITAKER, D. J. 1985. Parasites as a limiting factor in exploitation of Pacific Whiting, *Merluccius productus*. *Mar. Fish. Rev.*, 47 (2): 55-59.

KUDO, G.; OKADA, M. y MIYAUCHI, D. 1973. Gel-Forming Capacity of Washed and Unwashed Flesh of Some Pacific Coast Species of Fish. *Mar. Fish. Rev.*, 35 (12): 10-15.

NELSON, R. W.; BARNETT, H. J. y KUDO, G. 1985. Preservation and processing characteristics of Pacific Whiting, *Merluccius productus*. *Mar. Fish. Rev.*, 47 (2): 60-74.

OKADA, M.; ARECHE, T. e YSIKAWA, Y. 1981. Myxosporidian infestation of Peruvian hake. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 47 (2): 229-238.

PATASHNIK, M.; GRONINGER, H. S.; BARNETT, H.; KUDO, G. y KOURY, B. 1982. Pacific Whiting, *Merluccius productus*: I. Abnormal muscle texture caused by Myxosporidian-induced proteolysis. *Mar. Fish. Rev.*, 44 (5): 1-12.

SARDELLA, N. H. 1984. Mixosporidios parásitos musculares de peces del Mar Argentino (incidencia, reacciones de respuesta ante la agresión parasitaria, consideraciones zoogeográficas y aspectos tecnológicos). Tesis Doctoral. U.N.L.P. 66 págs.

TABLA 1. Muestras analizadas e incidencia de parasitosis.

Muestra N°	Fecha	N	N° parasitados	Peso promedio (g)
1	5/85	164	31	87
2	5/85	23	12	115
3	5/85	89	16	163
4	5/85	16	8	161
5	7/85	121	19	199
6	7/85	19	9	143
7	8/85	16	8	160
8	3/86	145	26	136
9	3/86	150	32	157
10	4/86	128	23	186
11	8/86	188	24	119
12	8/86	152	35	140
Total		1.211	243	147

TABLA 3. pH de las muestras no parasitadas y parasitadas.

Muestra N°	Calidad inicial	pH	
		NP	P
4	MB	6,83	6,80
7			
2	B	6,89	6,96
6			
11			
12			
5	RB	6,91	6,85
10			
8	M	6,96	7,02
3	MM	7,05	7,14

TABLA 2. Calidad inicial de las muestras.

Muestra N°	Calidad inicial	N. B. V. mg N %
1	R	20,41
2	B	18,06
3	MM	69,86
4	MB	19,18
5	RB	20,65
6	B	21,42
7	MB	19,18
8	R	22,75
9	M	26,95
10	RB	20,29
11	B	21,00
12	B	19,88

TABLA 4. Proteínas totales de muestras no parasitadas y parasitadas.

Muestra N°	Calidad inicial	Severidad %	g % Proteínas	
			NP	P
11	B	29,17	15,78	15,67
12	B	60,00	16,23	15,36
10	RB	34,78	16,45	16,27
9	M	53,13	16,33	16,22