

Microflora de la sardina (*Sardina pilchardus*) fresca y refrigerada de la costa Atlántica marroquí

Microflora of fresh and ice-stored sardines (*Sardina pilchardus*) from the Moroccan Atlantic coast

Fatima Elotmani¹
Omar Assobhei^{1*}
Anne-Marie Revol-Junelles²
Jean-Bernard Millière^{2,3}

¹ Laboratoire de Microbiologie Appliquée et Biotechnologie
Faculté des Sciences
Université Chouaib Doukkali
B.P. 20
24000 El Jadida, Maroc

* E-mail: assobhei@ucd.ac.ma; assobhei@hotmail.com

² Laboratoire Bioprocédés Agro-Alimentaires
Institut Polytechnique National de Lorraine
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA-INPL)
2 avenue de la Forêt de Haye
B.P. 172
54 505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

³ Institut Universitaire de Technologie (IUT) Nancy-Brabois
Université Henri Poincaré - Nancy I
54 600 Villers-lès-Nancy, France

Recibido en octubre de 2003; aceptado en marzo de 2004

Resumen

Se muestrearon sardinas (*Sardina pilchardus*) capturadas en la costa Atlántica marroquí, frente a El Jadida, en febrero, mayo y julio. Todas se estudiaron en fresco, pero las capturadas en julio también se estudiaron tras haber sido mantenidas en hielo durante 10 días. De las muestras en fresco, se aislaron un total de 193 cepas bacterianas, a partir de músculo, piel, branquias y vísceras. De las refrigeradas, en cambio, se aislaron un total de 122. En todas las muestras predominaban las bacterias Gram negativas, siendo los más frecuentes los géneros *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter*, *Pseudomonas*, *Shewanella* y *Flavobacterium*. Entre las Gram positivas se identificaron *Staphylococcus*, *Micrococcus* y bacterias corineiformes. No se encontró variación con respecto al mes de muestreo. El almacenaje en hielo favoreció el desarrollo de *Pseudomonas* como flora dominante, seguida por la especie *Shewanella putrefaciens*. El estudio señala a *Pseudomonas* como contribuyente a la alteración de las sardinas tras mantenerlas en hielo durante 10 días.

Palabras clave: *Sardina pilchardus*, fresca, hielo-almacenada, microflora, costa atlántica marroquí.

Abstract

Sardines (*Sardina pilchardus*) caught on the Moroccan Atlantic coast (off El Jadida) were examined fresh (February, May and July trials) and after 10 days of storage in ice (July trial). From fresh fish, a total of 193 strains were isolated from the muscle with skin, gills and viscera, whereas from ice-stored fish, 122 strains were isolated from the muscle. Gram-negative bacteria always predominated among the initial flora in all trials. The predominant Gram-negative microflora of the fresh fish consisted of *Moraxellaceae* (*Moraxella* sp., *Acinetobacter* sp., *Psychrobacter* sp.), *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas* sp.), and the genera *Shewanella* and *Flavobacterium*. The Gram-positive flora was identified as *Staphylococcus* sp., *Micrococcus* sp. and coryneform bacteria. Significant seasonal variation in initial flora was not noted. Ice storage allowed the growth of Gram-negative bacteria, with *Pseudomonas* as the dominant microflora, followed by *Shewanella putrefaciens*. The present study indicates that *Pseudomonas* sp. probably contribute to the spoilage of sardines caught in the Atlantic Ocean.

Key words: *Sardina pilchardus*, fresh and ice storage, bacterial microflora, Moroccan Atlantic coast.

Introducción

La microbiología de sardinas frescas y refrigeradas ha sido objeto de varios estudios en los últimos años (Gram *et al.*, 1987; El Marrakchi *et al.*, 1990; El Marrakchi *et al.*, 1992; Ababouch *et al.*, 1996; Gennari *et al.*, 1999). El pescado está sujeto a una rápida alteración por acción microbiana, cuya tasa de descomposición depende de varios factores tales como condiciones de almacenaje y factores intrínsecos de los especímenes como edad y tamaño, contenido en grasa, alimentación y estado fisiológico, composiciones cualitativa y cuantitativa de la microflora inicial asociada al ambiente de procedencia, estación del año, arte de pesca y procesamiento inicial del pescado (Murray y Shewan, 1979; El Marrakchi *et al.*, 1992; Gennari *et al.*, 1999). Es de aceptación generalizada que la alteración del pescado marino tiene como causa principal el crecimiento bacteriano (Liston, 1980; Gram y Huss, 1996). La composición de la flora bacteriana está también relacionada con los factores previamente mencionados. En los peces vivos y sanos, los microorganismos pueden encontrarse en la piel, branquias y vísceras. La degradación bacteriana de componentes solubles de bajo peso molecular produce metabolitos volátiles que son las sustancias responsables del olor y sabor desagradables que conducen al rechazo sensorial del pescado (Ababouch *et al.*, 1996).

En 2000 la sardina (*Sardina pilchardus*) representó cerca de 80% del pescado capturado en aguas marroquíes. A escala mundial, Marruecos es el principal productor y exportador de esta especie (representando el 47% de la producción mundial en 1997). Los valores nutricional y económico de esta especie son de gran importancia ya que satisface las necesidades nacionales de pescado fresco y porque corresponde a la mayor parte del pescado exportado en conserva. El objetivo de este trabajo fue la identificación de la naturaleza de la flora bacteriana de las sardinas frescas y refrigeradas de la costa marroquí, como parte de un programa de estudios de la capacidad de preservación del pescado a través del uso de bio-preservativos. Los resultados obtenidos en este trabajo serán comparados con otros disponibles para otras especies de pescado.

Material y métodos

Muestreo y almacenaje

Las sardinas fueron pescadas en las aguas frente a la ciudad de El Jadida (costa atlántica marroquí, 33°–33°16'09"N, 8°30'–8°45'W). Se efectuaron seis ensayos con las muestras obtenidas: cuatro en febrero y mayo de 1999 y dos en julio de 2001. Cada muestra fue de 5 kg de pescado. Después de recolectadas las sardinas se transportaron al laboratorio en contenedores refrigerantes, en los que se mantuvieron a aproximadamente 4°C con hielo troceado durante un total de 8 h. A su llegada al laboratorio se eligieron aleatoriamente muestras de 5 pescados que fueron inmediatamente sometidas a análisis microbiológicos.

Introduction

The microbiology of fresh or ice-stored fish has been studied in recent years (Gram *et al.*, 1987; El Marrakchi *et al.*, 1990, 1992; Ababouch *et al.*, 1996; Gennari *et al.*, 1999). Fish are subject to rapid microbial spoilage, whose rate depends on several factors, such as storage conditions, specific intrinsic factors like age and size, fat content, feeding and physiological state, qualitative and quantitative composition of the initial microflora related to the environment where the fish lives and is caught, seasonal period, fishing method and early handling (Murray and Shewan, 1979; El Marrakchi *et al.*, 1992; Gennari *et al.*, 1999). It is well established that spoilage of marine fish is primarily caused by bacterial growth (Liston, 1980; Gram and Huss, 1996). The composition of the bacterial flora is related to the different factors previously mentioned. In live healthy fish, micro-organisms are present on skin, in gills and viscera. Bacterial degradation of soluble, low molecular weight components produces volatile metabolites; these substances are responsible for the unpleasant and offensive off-odours and off-flavours leading to the sensory rejection of fish (Ababouch *et al.*, 1996).

In 2000, nearly 80% of the fish caught in Moroccan waters were sardines (*Sardina pilchardus*). On a worldwide scale, Morocco is the main producing and exporting country of this fish (47% of the worldwide production in 1997). The nutritional and economical values of this species are of great importance because it satisfies the national needs for fresh fish and assures the largest part of exported canned fish. This paper aims to identify the nature of the bacterial flora of Moroccan fresh and iced sardines, as part of a programme studying the preservability of fish through the use of bio-preservatives. Our results will be compared with those already available for other fish species.

Materials and methods

Sampling and storage conditions

Sardines were caught off the city of El Jadida (Moroccan Atlantic coast, 33°–33°16'09" N, 8°30'–8°45" W). Six sample trials were carried out, four in February and May 1999 and two in July 2001. Each sample consisted of 5 kg of fish. After catching, sardines were maintained at –4°C in a portable cooler containing crushed ice for 8–10 h during their transport to the laboratory, where five fish samples were immediately drawn at random for microbiological analyses.

The July samples were used for storage in ice. Five sardines were immediately analyzed (day 0), and the others were stored at 4°C for 10 days in plastic boxes with alternating layers of sardines and crushed ice. The ice was added as needed. At pre-determined times (days 0, 3, 6, 8 and 10), five fish samples were randomly drawn on each sampling day for bacteriological analyses.

Las muestras de julio se usaron para las pruebas de almacenamiento en hielo, seleccionando al azar 5 sardinas para su análisis inmediato (día 0), mientras que las restantes se almacenaron en cajas de plástico con camas alternadas de sardinas y hielo troceado para mantenerlas a 4°C durante 10 días, y añadiendo hielo troceado a las cajas siempre que fue necesario. Posteriormente se tomaron de estas cajas muestras de 5 pescados aleatoriamente seleccionados los días 3, 6, 8 y 10 después del inicio de la refrigeración, para proceder a su análisis bacteriológico.

Análisis bacteriológicos

Se analizaron por separado 25 g de branquias, vísceras y músculo dorsal obtenido con piel. En los pescados recolectados en julio solamente se analizaron muestras de músculo dorsal con piel. Las muestras se homogeneizaron en condiciones de asepsia, en 225 mL de caldo de sal de triptona estéril (TS), usando un homogeneizador del tipo Ultra-Turax. Después se procedió a una serie de diluciones a 1/10 en TS. La siembra de placas e incubación se realizó de acuerdo con El Marrakchi *et al.* (1990), excepto en el caso de la flora productora de sulfuro (SPF) que, después de incubada a 25°C durante 3 d, se observó en Agar Hierro con suplemento de cisteína según el formulado por Gram *et al.* (1987). Los conteos de flora mesófila aerobia total (TMAF) y flora psicrófila aerobia (PF) se ejecutaron en Agar para Conteo en placas (PCA) (Biokar, Beauvais, France) incubadas a 30°C durante 3 d y a 4°C durante 10 d, respectivamente. La flora moderadamente halófila (MHF) se observó con PCA rehidratado con agua de mar esterilizada después de incubarse a 25°C durante 5 d. La flora enterobacteriana (EF) se contó usando Agar de MacConkey (Biokar) incubado a 37 °C durante 24 h. Se añadió 1 ml de la dilución apropiada en placas por duplicado, excepto para EF cuyos conteos se determinaron en placas de difusión. Después de la incubación, se recolectaron aleatoriamente 10% de colonias bacterianas, de las placas de mayor dilución que presentaban crecimiento.

Mantenimiento de las cepas bacterianas

Los aislados fueron mantenidos en Agar Nutritivo inclinado (Biokar), excepto los de MHF cuyo Agar Nutritivo se preparó con agua de mar. Todos los aislados se almacenaron a 4°C hasta que fueron usados.

Identificación de los aislados

Las reacciones y pruebas bioquímicas realizadas fueron: reacción de Gram, oxidasa, presencia de catalasa con H₂O₂ al 3%, observaciones microscópicas de forma y determinaciones de movilidad. El metabolismo de la glucosa se investigó a través del test O/F en medio de Hugh y Leifson (Biomérieux) y de la producción de H₂S en Agar Hierro de Kligler (Biomérieux). Los medios de identificación de MHF se rehidrataron con agua de mar esterilizada. Las cepas se identificaron inicialmente

Bacterial examinations

Analyses were performed separately on 25 g of gills, viscera or dorsal muscle recovered with skin. In July, only the samples of dorsal muscle with skin were analyzed. Samples were aseptically homogenized in 225 mL of sterile tryptone salt broth (TS) using an ultra turax type blender. Then, serial ten-fold dilutions were made in TS. Plating and incubation were carried out as recommended by El Marrakchi *et al.* (1990), except for sulfide-producing flora (SPF) observed on the cysteine-supplemented iron agar as formulated by Gram *et al.* (1987) after incubation at 25°C for 3 days. Total mesophilic aerobic flora (TMAF) and psychrotrophic aerobic flora (PF) counts were obtained on plate count agar (PCA) (Biokar, Beauvais, France) after incubation at 30°C for 3 days and at 4°C for 10 days, respectively. The moderately halophilic flora (MHF) was observed using PCA rehydrated with sterile seawater and incubated at 25°C for 5 days. Enterobacteriaceae flora (EF) was numbered using MacConkey agar (Biokar) incubated at 37°C for 24 h. One millilitre of each appropriate dilution was poured on duplicate plates, except for EF whose count was determined as spread plate. After incubation, 10% bacterial colonies were randomly picked from plates of the highest dilution showing growth.

Strain maintenance

Isolates were maintained on nutrient agar slants (Biokar), except MHF for which the nutrient agar was prepared in seawater. All isolates were stored at 4°C until used.

Identification of isolates

The reactions and biochemical tests conducted were: Gram-reaction, oxidase, catalase presence with 3% H₂O₂, microscopic observations for shape and motility determinations. Glucose metabolism was investigated by the O/F-test in Hugh and Leifson medium (Biomérieux) and H₂S production on Kligler Iron Agar (Biomérieux). Identification media for MHF were rehydrated with sterile seawater. Strains were first identified according to Dainty *et al.* (1979). Furthermore, the identification was performed by API 20E, API NE kits, API Staph for Micrococcaceae, and API 50 CHB for *Bacillus* strains (API System, Montolieu-Vercieu, France).

Results

Bacterial flora of fresh sardines caught in February and May

The four February and May trials were pooled because no marked differences were found between them.

For fresh sardines, initial population levels of the five microflora retained were always significantly below the limit of 10⁶–10⁷ CFU g⁻¹ (table 1), value recommended by the International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). Gills were the most infected organ,

Tabla 1. Niveles de contaminación de sardinas frescas, por flora bacteriana y número de aislados (entre paréntesis) relacionados con el tipo de flora y de órganos de las sardinas recolectadas en febrero-mayo y en julio. a: promedio de 4 ensayos, b: promedio de 2 ensayos.
Table 1. Bacterial flora contamination levels of fresh sardines, and number of isolates (in brackets) related to the type of flora and fish organs for sardines caught in February and May and in July: * means from four trials; ** means from two trials.

Flora bacteriana	Número de CFU g ⁻¹ en los diferentes órganos del pescado (número de aislados)			
	Ensayos de febrero y mayo*			Ensayos de julio**
	Músculo con piel	Branquias	Visceras	Músculo con piel
Flora mesofílica aeróbica total	3.0 10 ³ (27)	3.5 10 ⁴ (22)	2.6 10 ³ (24)	4.0 10 ³ (20)
Flora moderadamente halofílica	7.2 10 ³ (20)	2.6 10 ⁴ (14)	8.0 10 ² (14)	4.3 10 ³ (17)
Flora psicotrófica aeróbica	3.6 10 ² (18)	4.4 10 ⁴ (12)	7.6 10 ² (14)	1.2 10 ³ (12)
Flora productora de sulfido	No detectada	63 (16)	No detectada	1.2 10 ² (13)
Flora Enterobacteriaceae	20 (4)	65 (6)	20 (2)	No determinada

según Dainty *et al.* (1979). Posteriormente la identificación se efectuó a través de los kits API 20E, API NE, Api Staph para las *Micrococcaceae* y API 50 CHB para las cepas de *Bacillus* (API System, Montolieu-Vercieu, France).

Resultados

Flora bacteriana de las sardinas frescas recolectadas en febrero y mayo

Los cuatro ensayos de febrero y mayo se juntaron ya que no se encontraron diferencias evidentes entre ellos.

En las sardinas frescas los niveles iniciales de los cinco tipos de microflora analizados fueron siempre significativamente inferiores al límite de 10⁶–10⁷ CFU g⁻¹ recomendado por el ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) (tabla 1). Las branquias fueron el órgano más afectado, seguidas de las vísceras. Los niveles bacterianos encontrados en el músculo fueron de 3.5, 3.8, 2.5, y 1.3 log CFU g⁻¹ para la flora TMAF, MHF, PF y EF, respectivamente. La SPF, detectada solamente en las branquias, constituyó una baja proporción de la flora inicial del pescado.

Se identificaron un total de 193 cepas (73 TMAF, 48 MHF, 44 PF, 16 SPF y 12 EF), pertenecientes a 17 géneros. Las bacterias Gram-negativas (138 aislados) estuvieron representadas por 12 géneros, de los cuales los predominantes fueron *Acinetobacter* sp. con 26 aislados, *Pseudomonas* sp. con 21, *Flavobacteria* sp. con 19, y *Vibrio* sp. con 18. La flora Gram-positiva (55 aislados) estuvo representada predominantemente por *Staphylococcus* con 30 aislados y por *Micrococcus* sp. con 19 aislados (tabla 2).

Flora bacteriana de las sardinas frescas recolectadas en julio

En el día 0, los conteos de bacterias en las sardinas fueron de 3.6, 3.1, 3.6 y 2.1 log CFU g⁻¹ para TMAF, PF, MHF y SPF, respectivamente (tabla 1). De la flora inicial de las sardinas

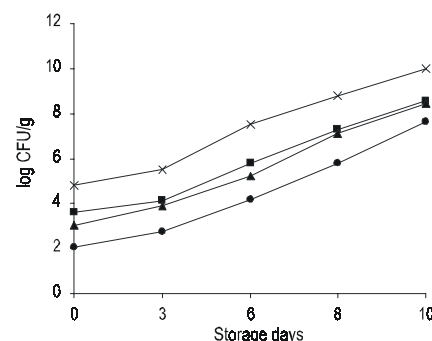


Figura 1. Variación de los conteos de bacterias a lo largo de 10 días de refrigeración. Conteos de: (-x-) Flora mesofílica aeróbica total en IA, (-■-) Flora mesofílica aeróbica total en PCA, (-▲-) Flora psicotrófica aeróbica y (-●-) Flora productora de Sulfido.

Figure 1. Changes in bacterial counts during 10 days of ice storage. (-x-) Total mesophilic aerobic flora on iron agar, (-■-) total mesophilic aerobic flora on plate count agar, (-▲-) psychrotrophic aerobic flora and (-●-) sulfide-producing flora counts.

followed by the viscera. The initial bacterial levels in muscle were 3.5, 3.8, 2.5 and 1.3 log CFU g⁻¹ for TMAF, MHF, PF and EF, respectively. The SPF, only detected in gills, represented a poor proportion of the initial fish flora.

A total of 193 strains, belonging to 17 genera, were identified: 73 from TMAF, 48 from MHF, 44 from PF, 16 from SPF and 12 from EF. Gram-negative bacteria (138 isolates) were from 12 genera with 26 *Acinetobacter* sp., 21 *Pseudomonas* sp., 19 *Flavobacteria* sp. and 18 *Vibrio* sp. as the predominant flora. The Gram-positive flora (55 isolates) was represented predominantly by 30 *Staphylococcus* sp. and 19 *Micrococcus* sp. (table 2).

Bacterial flora of fresh sardines caught in July

At day 0, bacterial counts of sardines were 3.6, 3.1, 3.6 and 2.1 log CFU g⁻¹ for TMAF, PF, MHF and SPF, respectively

Tabla 2. Número e identificación de los aislados de sardinas frescas recolectadas en febrero-mayo y julio, y de sardinas con 10 días en refrigeración de las recolectadas en julio.

Table 2. Number and identification of isolates of fresh sardines caught in February and May and in July, and on day 10 of ice-stored sardines caught in July.

Microorganismos	Número de aislados				
	En sardinas frescas			En sardinas refrigeradas	
	Ensayos de febrero y mayo			Ensayos de julio	Ensayos de julio
	Músculo con piel	Branquias	Vísceras	Músculo con piel	Músculo con piel
Bacterias Gram-positivas					
<i>Bacillus</i> sp.	1	2	-	-	-
Coryneform bacteria	1	2	-	2	-
<i>Micrococcus</i> sp.	5	10	4	8	2
<i>Staphylococcus</i> sp.	4	7	5	8	3
<i>S. aureus</i>	3	2	4	4	1
<i>S. epidermidis</i>	-	-	2	-	-
<i>S. hominis</i>	-	1	-	-	-
<i>S. xylosus</i>	2	-	-	-	-
Total	16	24	15	22	6
Bacterias Gram-negativas					
<i>Acinetobacter</i> sp.	8	10	8	3	1
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-	5	-	-
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	7	2	-	1	-
<i>Enterobacter agglomerans</i>	-	-	1	1	-
<i>Escherichia coli</i>	7	7	3	3	2
<i>Providencia stuartii</i>	-	2	-	-	-
<i>Flavobacterium</i> sp.	2	2	3	1	1
<i>F. indologenes</i>	7	3	2	5	1
<i>Moraxella</i> sp.	3	2	1	4	3
<i>Pseudomonas</i> sp.	6	-	1	3	11
<i>Ps. diminuta</i>	2	1	-	-	-
<i>Ps. cepacia</i>	2	2	1	-	-
<i>Ps. paucimobilis</i>	-	2	-	-	-
<i>Ps. fluorescens</i>	-	-	4	8	20
<i>Psychrobacter immobilis</i>	4	-	2	4	-
<i>Shewanella putrefaciens</i>	-	6	-	6	14
<i>Vibrio alginolyticus</i>	5	5	8	1	1
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	-	2	-	-	-
Total	53	46	39	40	54

frescas se aislaron 22 cepas Gram-positivas y 40 Gram-negativas (tabla 2). La composición fue semejante a la descrita para el músculo de las sardinas frescas recolectadas en febrero-mayo. Sin embargo, las proporciones de *Shewanella putrefaciens*, *Micrococcus* sp. y *Staphylococcus* sp. presentaron valores más altos en los ensayos de julio, mientras que las de *Acinetobacter* sp., *Flavobacterium* sp., *E. coli*, *Vibrio alginolyticus* y *A. salmonicida* fueron más altas en los ensayos de febrero-mayo.

Evolución de la flora de las sardinas recolectadas en julio

Los datos de los conteos de bacterias efectuados durante el almacenaje en hielo se presentan en la figura 1. En este período los valores límite de 10^6 – 10^7 CFU g⁻¹ se alcanzaron a los 10 días en la SPF, mientras que en la TMAF y PF estos valores se alcanzaron a los 8 días de almacenaje. Para toda la microflora en general, el crecimiento fue detectado a partir del tercer día de almacenaje. La TMAF incrementó de 3.6 a 8.6 log CFU g⁻¹. Los conteos en PCA fueron significativamente más bajos que los obtenidos en Agar Hierro. La PF incrementó de 3.1 a 8.5 y la SPF de 2.1 a 7.6 log CFU g⁻¹, en 10 d (figura 1).

Al final del almacenaje en hielo las bacterias Gram-negativas constituían cerca de 90% de la flora total (tabla 2). *Ps. fluorescens* era la especie predominante con 33% del total de aislados, seguida de *Sh. putrefaciens* con 23% del total de aislados; otras especies de *Pseudomonas* representaban 18.3%. Las SPF estuvieron representadas casi exclusivamente por la especie *Sh. putrefaciens* (tabla 3).

Discusión

En peces vivos y sanos el músculo normalmente no presenta microorganismos. Es de resaltar que la contaminación del músculo del pescado empieza en las horas siguientes a su captura. Los conteos iniciales de las diferentes poblaciones de microflora estudiadas fueron semejantes a los obtenidos en pescados de aguas frías, aunque bastante más bajos que los obtenidos en pescados tropicales, cuyos conteos alcanzaron 10^9 – 10^{10} CFU g⁻¹ (Gram, 1989, en Ababouch *et al.* 1996). El Marrakchi *et al.* (1990) registraron niveles idénticos en sardinas recolectadas en la costa de Agadir. La contaminación bacteriana relativamente baja en las vísceras puede ser un indicador de un período de alimentación reducido (Huss, 1988). En nuestro estudio la SPF constituyó una baja proporción de la flora inicial del pescado; sus niveles estuvieron por debajo de los descritos en trabajos anteriores (Huss, 1988; El Marrakchi *et al.*, 1990; Ababouch *et al.*, 1996). La composición de la microflora del músculo, con relación a la reacción de Gram, fue distinta a la observada por El Marrakchi *et al.* (1992). En nuestro estudio las bacterias Gram-negativas fueron siempre predominantes en la flora inicial de los ensayos de febrero-mayo y en los de julio, en agua de mar a temperatura de 16°C y 18°C, respectivamente.

(table 1). From the initial flora of fresh fish, 22 Gram-positive and 40 Gram-negative strains were isolated (table 2). The composition was similar to that of muscle of fresh sardines caught in February and May, but proportions of *Shewanella putrefaciens*, *Micrococcus* sp. and *Staphylococcus* sp. were higher in the July trials, while those of *Acinetobacter* sp., *Flavobacterium* sp., *Escherichia coli*, *Vibrio alginolyticus* and *Aeromonas salmonicida* were higher in February and May.

Evolution of the bacterial flora of ice-stored sardines caught in July

Data of the bacterial counts of sardines during ice storage are shown in figure 1. The limit counts of 10^6 – 10^7 CFU g⁻¹ were reached after 10 days for SPF, while the TMAF and PF counts exceeded that limit within 8 days of storage. For all microflora, growth was noted after 3 days of storage. The TMAF increased from 3.6 to 8.6 log CFU g⁻¹. Counts made on PCA were significantly lower than those obtained on iron agar. The PF increased from 3.1 to 8.5 and the SPF from 2.1 to 7.6 log CFU g⁻¹ in 10 days (fig. 1).

At the end of ice storage, Gram-negative bacteria constituted about 90% of the total flora (table 2). *Pseudomonas fluorescens* was the predominant species, with 33% of total isolates, then *Shewanella putrefaciens*, with 23%. Other *Pseudomonas* species represented 18.3%. SPF was represented almost exclusively by *Sh. putrefaciens* (table 3).

Discussion

In live healthy fish, micro-organisms are normally absent in muscle. It is important to note that the contamination of fish muscle starts within the first hours following its capture. The initial population counts of the different microflora studied (table 1) were similar to those recorded for cold-water fish, but much lower than the bacterial counts for tropical fish, which reached 10^9 – 10^{10} CFU g⁻¹ (Gram, 1989, cited by Ababouch *et al.* 1996). In 1990, similar values were reported by El Marrakchi *et al.* (1990) for sardines caught on the coast of Agadir. The relative low bacterial contamination in viscera may be indicative of a reduced feeding period (Huss, 1988). In our study, SPF represented a poor proportion of the initial fish flora (table 1); their levels were below those from other studies (Huss, 1988; El Marrakchi *et al.*, 1990; Ababouch *et al.*, 1996). The microflora composition of muscle, in relation to Gram-reaction, differed from that mentioned by El Marrakchi *et al.* (1992). In our study, Gram-negative bacteria always predominated among the initial flora in the trials of February and May and in those of July, in seawater temperatures of 16°C and 18°C, respectively.

In sardines from the coast of Agadir, El Marrakchi *et al.* (1992) observed a slight predominance of Gram-positive bacteria with *Staphylococcus* sp., *Micrococcus* sp. and coryneform bacteria, while Gram-negative flora was principally represented by *E. coli*, *Vibrio fluvialis*, *Aeromonas hydrophila*,

Tabla 3. Número e identificación de los aislados de flora productora de sulfuros (SPF) de sardinas frescas (ensayos de febrero-mayo y julio), y del día 10 de refrigeración de la sardinas cogidas en julio.**Table 3.** Number and identification of sulfide-producing flora isolates of fresh sardines (February and May, and July trials), and on day 10 of ice-stored sardines (July trials).

Microorganismos	Número de aislados				
	En sardinas frescas				En sardinas refrigeradas
	Ensayos de febrero y mayo			Ensayos de julio	Ensayos de julio
	Músculo con piel	Branquias	Visceras	Músculo con piel	Músculo con piel
Coryneform bacteria	-	2	-	2	-
<i>Micrococcus</i> sp.	-	5	-	2	1
<i>Shewanella putrefaciens</i>	-	3	-	5	10
<i>Staphylococcus</i> sp.	-	6	-	4	2
Total		16		13	13

En las sardinas de la costa de Agadir, El Marrakchi *et al.* (1992) observaron una escasa predominancia de bacterias Gram-positivas, principalmente *Staphylococcus* sp., *Micrococcus* sp. y bacterias corineiformes, mientras que la flora Gram-negativa estuvo representada predominantemente por *Escherichia coli*, *Vibrio fluvialis*, *Aeromonas hydrophila*, *Acinetobacter anitratus*, *Moraxella* spp. y *Flavobacterium multivorum*. Así, el sitio de recolección influye en la frecuencia de aislamiento de las diferentes especies de flora del pescado, pero no en su composición cualitativa. De esta manera se pudo observar un alto nivel de similitud entre la composición cualitativa de bacterias iniciales de sardinas frescas cogidas en la costa atlántica marroquí, y de sardinas procedentes de otras áreas como el Mar Adriático (Gennari y Tomaselli, 1988; Gennari *et al.*, 1999).

Elementalmente, el perfil bacteriológico de las sardinas frescas de la costa atlántica marroquí, se asemeja a lo descrito para muchos otros pescados de aguas frías y templadas, en los que las bacterias Gram-negativas psicotróficas no-fermentativas (*Pseudomonas*, *Flavobacterium*,...) eran predominantes y las bacterias Gram-positivas eran menos abundantes (Gram *et al.*, 1987; El Marrakchi *et al.*, 1992; Gennari *et al.*, 1999).

Se encontró un gran número de bacterias (10^7 – 10^8 g⁻¹) en pescado alterado (con olor desagradable) en el período final del almacenaje en hielo, corroborando las observaciones de otros autores; es de aceptación común que para que se induzca la producción de olores y sabores desagradables, los conteos de bacterias suelen ser del orden de los 10^7 g⁻¹ o superiores (Jorgensen *et al.*, 1988; Koutsoumanis *et al.*, 1999). Sin embargo, sólo una parte de estas bacterias pueden clasificarse como alteradoras activas (Gram *et al.*, 1987).

El Agar para Conteo en Placas (PCA) sigue siendo el sustrato más usado para la determinación de los conteos de bacterias totales. Sin embargo, los análisis de pescado fresco y refrigerado mostraron que la utilización de una peptona de agar enriquecida, como el Agar Hierro (IA) (Gram *et al.*, 1987),

Acinetobacter anitratus, *Moraxella* spp. and *Flavobacterium multivorum*. Therefore, the fishing location has an influence on the isolation frequency of different species of fish flora, but not on its qualitative composition. So, a high degree of similarity was found between the initial bacterial qualitative composition of fresh sardines caught on the Moroccan Atlantic coast and sardines from other marine areas such as the Adriatic Sea (Gennari and Tomaselli, 1988; Gennari *et al.*, 1999).

Roughly, the bacteriological profile of fresh Moroccan Atlantic sardines appeared similar to those described for many fishes from cold and temperate waters, where Gram-negative non-fermenting psychrotrophic bacteria (*Pseudomonas*, *Flavobacterium*,...) predominated, whereas Enterobacteriaceae and Gram-positive bacteria were present at minor levels (Gram *et al.*, 1987; El Marrakchi *et al.*, 1992; Gennari *et al.*, 1999).

A large number of bacteria (10^7 – 10^8 g⁻¹) was found on spoiled fish (off-odours production) at the end of the ice storage (fig. 1). This result agrees with observations made by other authors. It is usually assumed that bacterial counts of the order of 10^7 g⁻¹ or higher are necessary to induce the production of off-odours and off-flavours (Jorgensen *et al.*, 1988; Koutsoumanis *et al.*, 1999), but only a part of this flora may be classified as active spoilers (Gram *et al.*, 1987).

The substrate most widely used for the determination of total bacterial counts is still PCA. However, analyses of fresh and iced fish showed that an enriched agar peptone, such as iron agar (Gram *et al.*, 1987), produced significantly higher counts when all the colonies were counted (fig. 1). This finding also agrees with Gram's (1992) observations. In PCA, the TMAF counts were underestimated, so we recommend the use of iron agar for the enumeration of that flora.

Dominance of psychrotrophic Gram-negative bacteria (*Pseudomonas* sp. and *Sh. putrefaciens*) at the end of ice storage was also reported by Gennari and Tomaselli (1988) for Adriatic sea sardines. A similar evolution was not reported for

produce conteos significativamente más altos cuando todas las colonias se cuentan. Este hecho concuerda con las observaciones de Gram (1992). En PCA, los conteos de TMAF fueron subestimados, así que se sugiere la utilización de IA para la cuantificación de este tipo de flora.

La dominancia de bacterias Gram-negativas psicotróficas (*Pseudomonas* sp. y *Sh. putrefaciens*) en el período final del almacenaje en hielo, fue también registrada por Gennari and Tomaselli (1988) para sardinas del mar Adriático. Semejante evolución no se describe en las sardinas recolectadas en la costa de Agadir (El Marrakchi *et al.*, 1992). En ese estudio, *Sh. putrefaciens* fue la flora dominante (22.7% de la microflora total, al final del almacenaje) seguida de *Proteus mirabilis* y de las bacterias corineiformes (18.7%) y *Ps. fluorescens* fue aislada en baja cantidad. En otro estudio con sardinas de la costa atlántica marroquí, Ababouch *et al.* (1996) observaron una incidencia más baja de *Sh. putrefaciens* (2–10%). Varios estudios también demuestran que esta cepa fue la predominante en el período final de almacenamiento en frío de pescado marino de aguas frías y templadas (Gram *et al.*, 1987). El presente trabajo indica que la proliferación de bacterias no productoras de H₂S, como *Pseudomonas*, contribuye probablemente a la alteración de las sardinas de la costa atlántica. La interacción microbiana parece ser el factor más importante en el desarrollo de la flora responsable por la alteración del pescado (Gram y Melchiorson, 1996); la fuerte actividad anti-*Shewanella* encontrada entre los aislados de *Pseudomonas* sp. de pescado tropical refrigerado que presenta alteración puede explicar parcialmente por qué las *Pseudomonas* sp. se tornaron dominantes a lo largo del almacenaje en hielo (Gram, 1993).

Es necesaria más investigación para la caracterización del potencial de alteración de las bacterias aisladas, y para estudiar la potencial actividad inhibidora de las cepas de *Pseudomonas* sp. sobre la microflora de las sardinas, en especial sobre *Sh. putrefaciens*.

El enfriamiento y la refrigeración mecánica no son procedimientos suficientemente adecuados para proteger el pescado contra la acción de la alteración microbiana. La incorporación de varias técnicas, como el uso de conservadores alimenticios, a la refrigeración (Leistner y Gorris, 1995) podría constituir una ventaja adicional en el control de la alteración del pescado por acción microbiana.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por becas concedidas por la Coopération Franco-Marocaine, REMER (Réseau National des Sciences et Techniques de la Mer) y por el Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Formation des Cadres et de la Recherche Scientifique (PROTARS II-PIT1/37).

Referencias

Ababouch, L.H., Souibri, L., Rhaliby, K., Ouahdi, O., Battal, M. and Busta, F.F. (1996). Quality changes in sardines (*Sardina*

sardines from the coast of Agadir (El Marrakchi *et al.*, 1992). In that study, *Sh. putrefaciens* was the predominating flora (22.7% of the total microflora at the end of storage), followed by *Proteus mirabilis* and coryneform bacteria (18.7%), and *Pseudomonas fluorescens* was poorly isolated. In another study on Atlantic Moroccan sardines (Ababouch *et al.*, 1996), a lower incidence of *Sh. putrefaciens* (2–10%) was observed. Several studies also show that this strain was the predominant bacteria at the end of cold-storage of marine fish from cold and temperate waters (Gram *et al.*, 1987). The present work indicates that the proliferation of non-H₂S-producing bacteria such as *Pseudomonas* probably contributes to the spoilage of sardines caught in the Atlantic Ocean. Microbial interaction may be the major factor governing the development of spoilage flora (Gram and Melchiorson, 1996). The strong anti-*Shewanella* activity found among the *Pseudomonas* sp. isolates from spoiled tropical iced fish may partly explain why *Pseudomonas* sp. become dominant during ice storage (Gram, 1993).

Further research is needed to characterize the potential spoiling activity of the isolated bacteria, and to determine the potential inhibitory activity of *Pseudomonas* sp. strains towards the microflora of sardines, especially towards *Sh. putrefaciens*.

Chilling and mechanical refrigeration are not sufficient to protect the fishery product against the action of microbial spoilage. The incorporation of various techniques, like the use of food preservatives with refrigeration (Leistner and Gorris, 1995), could provide an additional advantage in controlling microbial spoilage of fish.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Coopération Franco-Marocaine, REMER (Réseau National des Sciences et Techniques de la Mer), and Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Formation des Cadres et de la Recherche Scientifique (PROTARS II-PIT1/37).

English translation by the authors.

-
- pilchardus*) stored in ice and at ambient temperature. Food Microbiol., 13: 123–132.
- Dainty, R.H., Shaw, B.G., Hardinger, C.D. and Michanie, S. (1979). The spoilage of vacuum-packed beef by cold tolerant bacteria. In: A.D. Russel and R. Fuller (eds.), Cold Tolerant Microbes in Spoilage and the Environment. Academic Press, pp. 83–110.
- El Marrakchi, A., Bennour, M., Bouchriti, N., Hamama, A. and Tagafait, H. (1990). Sensory, chemical, and microbiological assessments of Moroccan sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice. J. Food Prot., 53: 600–605.
- El Marrakchi, A., Bouchriti, N., Bennour, M., Hamama, A. and Koufail, A. (1992). The bacteriology of Moroccan sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice. I. Nature of the bacterial flora. Microbiol.-Aliments-Nutr., 10: 61–68.

- Gennari, M. and Tomasselli, S. (1988). Changes in aerobic microflora of skin and gills of Mediterranean sardines (*Sardina pilchardus*) during storage in ice. *Int. J. Food Microbiol.*, 6: 341–347.
- Gennari, M., Tomasselli, S. and Cotrona, V. (1999). The microflora of fresh and spoiled sardines (*Sardina pilchardus*) caught in Adriatic (Mediterranean) sea and stored in ice. *Food Microbiol.*, 16: 15–28.
- Gram, L. (1992). Evaluation of the bacteriological quality of seafood. *J. Food Microbiol.*, 16: 25–39.
- Gram, L. (1993). Inhibitory effect against pathogenic and spoilage bacteria of *Pseudomonas strains* isolated from spoiled and fresh fish. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 2197–2203.
- Gram, L. and Huss, H.H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *Int. J. Food Microbiol.*, 33: 121–137.
- Gram, L. and Melchiorson, J. (1996). Interaction between fish spoilage bacteria *Pseudomonas* sp. and *Shewanella putrefaciens* in fish extracts and on fish tissue. *J. Appl. Bacteriol.*, 80: 589–595.
- Gram, L., Trolle, G. and Huss, H.H. (1987). Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0°C) and high (20°C) temperatures. *Int. J. Food Microbiol.*, 4: 65–72.
- Huss, H. (1988). Fresh fish quality and quality changes. *FAO Fish. Ser. No. 29*, FAO, Rome.
- Jorgensen, B.R., Gibson, D.M. and Huss, H.H. (1988). Microbiological quality and shelf life prediction of chilled fish. *Int. J. Food Microbiol.*, 6: 295–307.
- Koutsoumanis, K., Lampropoulou, K. and Nychas, G.J.E. (1999). Biogenic amines and sensory changes associated with the microbial flora of Mediterranean gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) stored aerobically at 0, 8, and 15°C. *J. Food Prot.*, 62: 398–409.
- Leistner, L. and Gorris, L.G.M. (1995). Food preservation by hurdle technology. *Trends Food Sci. Technol.*, 6: 41–46.
- Liston, J. (1980). Microbiology in fishery science. In: J.J. Connell (eds.), *Advances in Fishery Science and Technology*. Fishing News Books, Farnham, UK, pp. 138–157.
- Murray, C.K. and Shewan, J.M. (1979). The microbial spoilage of fish with special reference to the role of psychrotrophs. In: A.D. Russell and R. Fuller (eds.), *Cold Tolerant Microbes in Spoilage and the Environment*. Academic Press, pp. 117–136.