

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

**Conservación de la trucha (*Salmo Gairdneri Tridens*) por
medio de radiaciones ionizantes y estudios toxicológicos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

José Ramón Civantos Benito

DIRECTOR:

Daniel de la Sierra Serrano

Madrid, 2015

R. 732.674
V.

T/639.212
CIV

José Ramón Civantos Benito



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5310715753

CONSERVACION DE LA TRUCHA (SALMO GAIRDNERI IRIDEUS) POR MEDIO
DE RADIACIONES IONIZANTES Y ESTUDIOS TOXICOLOGICOS

Departamento de Farmacología
Facultad de Veterinaria
Universidad Complutense de Madrid
1981

© José Ramón Civantos Benito
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1981
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-31094-1981

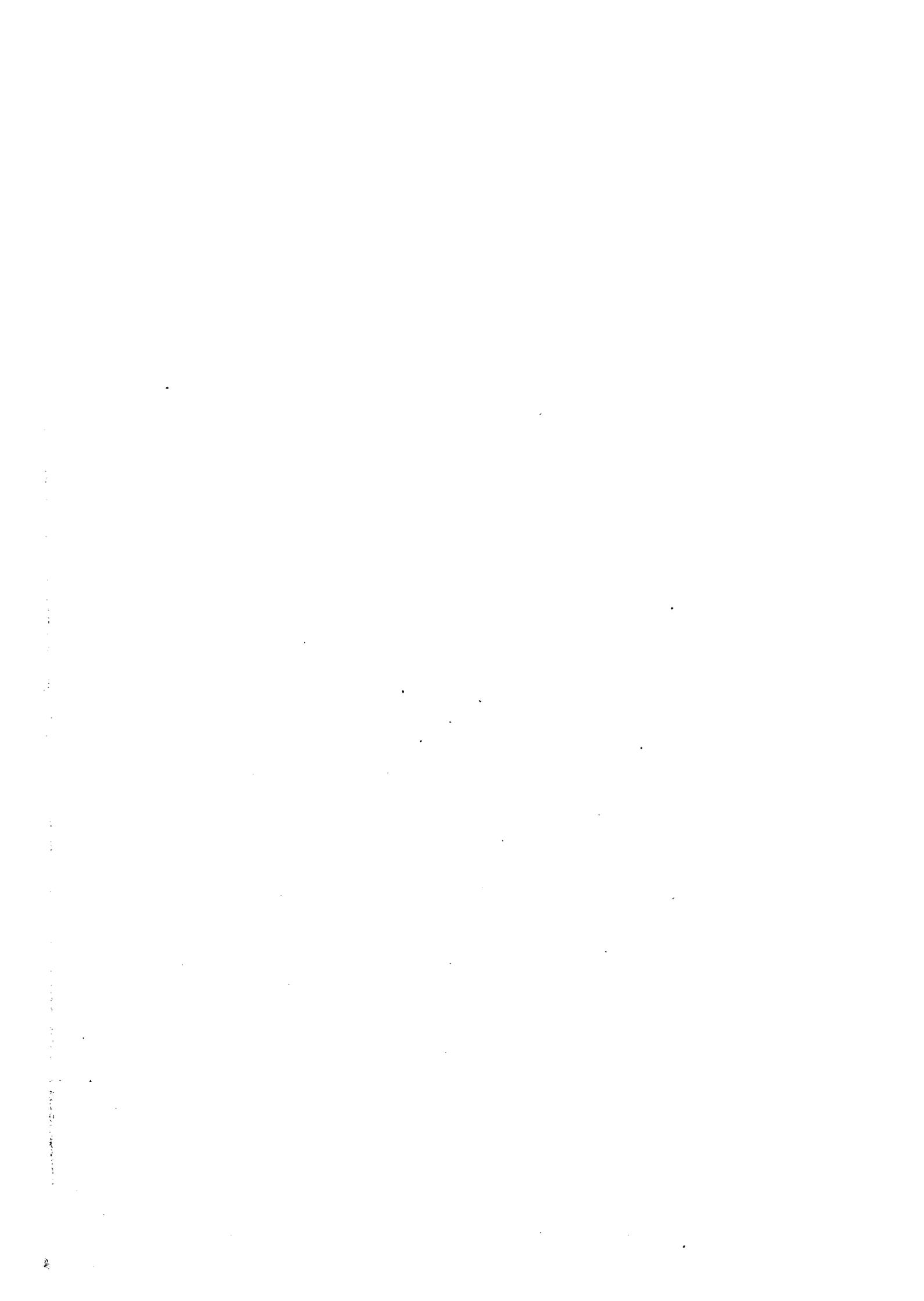
Autor: JOSE RAMON CIVANTOS BENITO

CONSERVACION DE LA TRUCHA (SALMO GAIRDNERI IRIDEUS)
POR MEDIO DE RADIACIONES IONIZANTES Y ESTUDIOS
. TOXICOLOGICOS

Director: DANIEL DE LA SIERRA SERRANO
Doctor en Veterinaria, profesor no numerario de la
Facultad de Veterinaria de Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Veterinaria
Dep.de Farmacología y Toxicología

Año 1.981



INDICE.

	<u>pág.</u>
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos.....	vi
Resumen.....	viii
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
1. 1.- ANTECEDENTES E HISTORIA.....	3
1. 2.- FUNDAMENTOS.....	7
1. 2. 1.- Efectos sobre los microorganismos.....	7
1. 2. 2.- Características generales de los efectos sobre los microorganismos.....	8
1. 2. 3.- Factores que modifican la radiosensibilidad de los microorganismos.....	10
1. 2. 3. a.- Efectos que se producen durante el período de irradiación.....	10
1. 2. 3. a. 1.- Efectos del oxígeno.....	10
1. 2. 3. a. 2.- Efectos del sustrato....	11
1. 2. 3. a. 3.- Efectos del pH.....	12
1. 2. 3. a. 4.- Efectos de la temperatura.....	12
1. 2. 3. a. 5.- Otros efectos.....	12
1. 2. 3. b.- Efectos de las condiciones antes de la irradiación.....	13
1. 2. 3. c.- Efectos de las condiciones después de la irradiación.....	13

	<u>pág.</u>
1. 2. 4.- Aplicaciones prácticas a la reducción de microorganismos en los alimentos..	14
1. 3.- JUSTIFICACION.....	15
2.- MATERIAL Y METODOS.....	19
2. 1.- OBTENCION DE EJEMPLARES.....	19
2. 2.- PREPARACION DE EJEMPLARES.....	20
2. 3.- IRRADIACION.....	21
2. 3. 1.- Fuente Náyade. Descripción.....	21
2. 3. 2.- Dosimetría.....	23
2. 3. 2. a.- Cálculos.....	23
2. 3. 2. b.- Unidades.....	25
2. 4.- CONTROLES MICROBIOLÓGICOS.....	30
2. 4. 1.- Medios de cultivo.....	30
2. 4. 2.- Medios de tinción.....	39
2. 5.- METODO QUÍMICO.....	42
2. 5. 1.- Material y reactivos.....	42
2. 5. 1. a.- Protocolo operatorio.....	43
2. 5. 2.- Cálculos.....	45
2. 6.- METODO BIOQUÍMICO.....	48
2. 6. 1.- Material y reactivos.....	48
2. 6. 2.- Cálculos.....	58
2. 7.- EXPERIMENTACION EN ANIMALES DE LABORATORIO..	61
2. 7. 1.- Pruebas hemáticas.....	62
2. 7. 1. a.- Descripción del equipo Coulter Counter, modelo FN.....	63
2. 7. 1. a. 1.- Fundamento.....	63
2. 7. 1. b.- Preparación de la muestra.....	64
2. 7. 1. c.- Fórmula leucocitaria.....	65

	<u>pág.</u>
3. 2.- RESULTADOS DEL N.B.V.T.....	89
3. 3.- RESULTADOS BIOQUIMICOS.....	93
3. 4.- RESULTADOS EN LOS ANIMALES DE EXPERIMENTA - CION.....	98
3. 4. 1.- Resultados de las pruebas hemáticas..	98
3. 4. 2.- Resultados de las pruebas bioquímicas.	98
3. 4. 3.- Resultados histológicos.....	112
4.- DISCUSION.....	126
4. 1.- DISCUSION DE LOS RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS.	126
4. 2.- DISCUSION DE LOS RESULTADOS DEL N.B.V.T.....	129
4. 3.- DISCUSION DE LOS RESULTADOS BIOQUIMICOS.....	131
4. 4.- DISCUSION DE LOS RESULTADOS EN LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACION.....	133
4. 4. 1.- Discusión de los resultados de las - pruebas hemáticas.....	133
4. 4. 2.- Discusión de los resultados de las - pruebas bioquímicas.....	134
4. 4. 3.- Discusión de los resultados histoló- gicos.....	141
5.- CONCLUSIONES.....	143
6.- BIBLIOGRAFIA.....	145

v

- DEDICATORIA:

A mis hijas, por las que
intento superarme.

AGRADECIMIENTOS.-

El presente trabajo ha sido realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Unidad de Isótopos de la Junta de Energía Nuclear y en la Cátedra de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

El autor agradece:

A los miembros directivos de la Junta de Energía Nuclear, por las facilidades concedidas para llevar a cabo este trabajo.

Al Dr. D. Daniel de la Sierra Serrano, por su dirección y acertadas y eficaces orientaciones, que han hecho posible la realización del mismo, así como por la lectura y comentarios del manuscrito.

Al Prof. Dr. D. Félix Sanz Sánchez, por dignarse a apadrinar este trabajo.

Al Prof. Dr. D. Jesús Fernández González y a la Dra. D^a. Pilar Mazón, por sus orientaciones y ayudas en algunos aspectos de esta memoria.

A la Prof. Dra. D^a. María Castaños Rosado, por sus -

consejos y orientaciones en la parte histológica del mismo.

Al Dr. D. Manuel Estada, Director del Centro Experimental del Frío, por permitirme realizar una parte del presente trabajo en el mismo.

Al Dr. D. José Antonio Lejarcegui, director de la piscicultura de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes de Madrid, por facilitarme cuantas truchas me han sido necesarias para realizar algunas experiencias.

Finalmente, a todos mis compañeros de laboratorio y, especialmente, a Lucila Ramos, por haberme ayudado en la ejecución de algunas experiencias.

Mi agradecimiento especial para mi mujer y mis hijas, que, con su paciencia, han permitido que realizase este trabajo.

Conservación de la trucha (*salmo gairdneri irideus*) por medio de radiaciones ionizantes y estudios toxicológicos.

RESUMEN

Se irradian truchas procedentes de piscifactoría, con una fuente de Co-60 y se estudia su tiempo de conservación por -- procedimientos microbiológicos y químicos. Así mismo se hacen estudios de comestibilidad y toxicidad en animales de laboratorio (ratas Wistar), por medio de pruebas hemáticas, serológicas e histológicas.

También se hacen estudios de los posibles cambios en los aminoácidos protéicos del músculo de la trucha al ser irradiada.

Los resultados indican que las truchas irradiadas con la dosis de 100 Krads. (1 KGy), se conservan frescas unas tres -- semanas por término medio, dependiendo de la carga microbiana inicial, sin congelarlas posteriormente, sino únicamente refrigeradas entre 0º y 4º C.

La toxicidad es negativa en animales de experimentación.

La composición de los aminoácidos protéicos no cambia ni con la dosis de 100 Krads. (1 KGy), ni con la dosis doble, de 200 Krads. (2 KGy).

1.- INTRODUCCION.

Las radiaciones ionizantes de cualquier tipo, necesitan, para actuar, ser absorbidas, como cualquier forma de energía. Esta energía absorbida, induce cambios a nivel molecular, es decir, a nivel del DNA, enzimas, ATP, coenzimas, etc., influyendo de una manera importante el medio en que se encuentren esas células y la forma, vegetativa o esporulada. Estos cambios se producen en microsegundos después de la irradiación, sin embargo, los efectos macroscópicos o de simple vista, tardan un poco mas de tiempo en observarse.

Así, si irradiamos un cierto número de células (bacterias) con una cierta dosis, encontramos que el número de las mismas se mantiene después de la irradiación, pero si hacemos una -- siembra de ellas en un medio sólido adecuado, nos encontramos con que no hay el mismo número de colonias, comparándola con otras no irradiadas, sino que aquel es menor, ya que algunas de ellas han sido lesionadas con la irradiación, incapacitándolas para reproducirse y, por este motivo, no han podido formar colonias.

En el presente trabajo se irradian truchas con el fin de reducir la carga microbiana y se controla la misma por procedimientos microbiológicos y químicos, para averiguar el efecto de la irradiación.

Tambien se hacen estudios de los posibles cambios que pu

dieran producirse en la proteína muscular de la trucha por efecto de la irradiación.

Bacq y Alexander, 1.964 b), indican cambios químicos en proteínas, tales como la lisozima y la albúmina del suero bovino, al recibir una dosis de 5 Mrads. (50 KGy) a 150 Mrads. (1,5 MGy) irradiándolas con electrones de 2 MeV, pero no indican nada con dosis mas bajas.

Igualmente se realizan estudios toxicológicos alimentando ratas Wistar con trucha irradiada y liofilizada, con el fin de observar la posibilidad de que aparezcan problemas al ser ingeridas; para ello se han realizado una serie de análisis tales como : recuento, fórmula, velocidad, hematocrito, hemoglobina, valor globular, transaminasas y estudios histológicos en hígado y riñón.

1. 1.- ANTECEDENTES E HISTORIA.

Aunque se conocían desde muy antiguo, las radiaciones ionizantes, los generadores de rayos X y los penetrantes rayos gamma, no se aplicaron a los alimentos hasta muy tarde, empleándose en principio los rayos ultravioleta, los rayos infrarrojos y las radiaciones electromagnéticas, así como las ondas ultrasónicas o ultrasonidos.

Todas estas alternativas tenían grandes desventajas para uso práctico, incluyendo el límite de efectividad biológica o la adecuada penetración. Hannan 1.956 b).

Las ventajas que se podrían enumerar eran:

- 1) Alta eficiencia en la inactivación de microorganismos y otras formas de vida posible.
- 2) El aumento de la temperatura y los cambios totales químicos producidos, son pequeños. Los alimentos se pueden tratar crudos o precocinados, si se quiere.
- 3) Con material de grosor apreciable, pueden ser tratados en contenedores hechos de diversos materiales, como plásticos, vidrio o metal.
- 4) El proceso de irradiación podía ser utilizado en

operación continua.

Las desventajas eran :

- 1) El costo del proceso no podía estimarse con ninguna aproximación. Los costos del desarrollo del trabajo y del inicial del equipo, eran bastante altos.
- 2) Los efectos químicos producidos, con ciertas dosis eran frecuentemente adversos, produciéndose cambios en los caracteres organolépticos, tales como olores desagradables, pérdidas de color, textura y otras propiedades que, actualmente, pueden ser controlados añadiendo aditivos a la complejidad del proceso y utilizando dosis adecuadas.
- 3) Los enzimas no son, en general, inactivados por la irradiación, pero aparecían efectos adversos al almacenarlos, particularmente en frutas y vegetales, problemas que, en la actualidad, han sido resueltos.

Sin embargo, las modernas técnicas de irradiación, utilizando isótopos radiactivos artificiales, emisores gamma de alta energía, como el Co-60 y el Cs-137, con periodos de semidesintegración de 5,27 y 29,4 años, respectivamente, y los aceleradores de partículas, como el de electrones, hacen que todo esto varíe en un grado tal, que po

demos considerar estos procedimientos como ideales para -
la conservación de los alimentos.

La irradiación de pescado ha sido cronológicamente -
posterior a la de otros alimentos. Hannan 1.956 d), men-
ciona un poco de pasada, la irradiación con bajas dosis -
de productos del mar (pescados y moluscos), hablando de -
incompleta esterilización, mencionando otro trabajo con -
el mismo objetivo, por lo que podemos decir que, en la dé-
cada de los 50, no era muy utilizado este procedimiento -
para conservar el pescado.

Sin embargo en la década de los 60, parece que preocu-
pa un poco más la conservación de los productos marinos y
así Hanneson, G. en 1.972, da una lista de 112 trabajos -
de los que, la mayor parte, han sido sobre productos mari-
nos y todos ellos realizados en los últimos 6 ó 7 años de
dicha década. En Alemania, por Ehlermann, en 1.969, pu-
blicándose sus trabajos en 1.970. En Viena, en 1.976, por
Hansen y en Italia, en 1.972, por Baldrati, G., se puede
decir que son los primeros trabajos que se han hecho en -
truchas.

Todos estos trabajos tienen en común, el haber utili-
zado altas dosis de irradiación, con lo que se detectaron
cambios en la textura, índice de agua, etc., de las tru-
chas.

- 6 -

Nuestro trabajo ha sido realizado con dosis mas bajas y de esa forma, hemos eliminado los problemas que se podían presentar, como se verá en los resultados.

1. 2.- FUNDAMENTOS.

1. 2. 1.- Efectos sobre los microorganismos.

Con bajas dosis de irradiación, se producen sólo pequeños cambios en las células vivas, como, por ejemplo, en la tasa de respiración o en la división celular. Sin embargo, con dosis mayores se producen grandes daños a las células y más o menos, la muerte inmediata.

En el rango de dosis intermedias, se observan una serie de cambios característicos. Estos son principalmente genéticos, apareciendo primeramente una tasa incrementada de mutaciones y entonces, se interfiere en el mecanismo de reproducción celular. Hannan 1.956 (b).

La sensibilidad de los diferentes organismos y de las diferentes células de un mismo organismo complejo, están a gran distancia unos de otros, pero, en general, el organismo mas complejo es más sensible a los daños de la irradiación; así, el hombre y los animales superiores, son del orden de mil veces más sensibles que las bacterias. Las células de desarrollo rápido son altamente sensibles generalmente; los órganos reproductores o las células tumorales de animales,

por ejemplo, son más sensibles que el músculo y las bacterias en forma vegetativa, más sensibles que en forma esporulada.

1. 2. 2.- Características generales de los efectos sobre los microorganismos.

Lo primero a destacar es que el daño por irradiación aparece sólomente después de un determinado lapso de tiempo.

Unas pocas células pueden ser inactivadas, pero la mayoría continúa respirando normalmente y muestra una normal capacidad para reducir el azul de metileno, sintetizar ATP y, las que son móviles, muestran movilidad. La división celular es, sin embargo, retardada y como resultado el número de células individuales puede incrementarse, no apareciendo por lo tanto colonias.

Moos, Gaden y Henley han demostrado que, con algunas bacterias, los descendientes de las células supervivientes a la irradiación, muestran una resistencia a ésta superior a la del cultivo original, siendo esto interpretado como indicación de que ocurre una adaptación a la misma.

vación de la misma. Utilizando diferentes radiaciones se han llegado a demostrar nada menos que 250 -- blancos en el Escherichia Coli, con un diámetro medio de 12 milimicrones cada uno, siendo de este orden los diámetros de los genes.

La teoría de los blancos ha sido ampliamente discutida por numerosos autores, entre los que se encuentran, particularmente, Timofeeff-Ressovsky y Zimmer, en el año 1.947.

1. 2. 3.- Factores que modifican la radiosensibilidad de los microorganismos.

La acción letal puede ser modificada de muchas formas, como explicaremos a continuación en los sucesivos apartados.

1. 2. 3. a.- Efectos que se producen durante el período de irradiación.

1. 2. 3. a. 1.- Efectos del oxígeno.

Ha sido comprobado por Hollaender y cols. en 1.951, que una suspensión de Escherichia Coli en buffer de fosfato, era tres veces más sensible a los rayos X en atmósfera de oxígeno que de nitrógeno, habiéndose demostrado -

esto en trabajos posteriores.

El efecto del oxígeno, puede no ser debido a un simple efecto radioquímico, sino a cambios metabólicos que pueden ser unidos a la radiación y modificar la respuesta de la misma. Por ejemplo, en ausencia de oxígeno, las moléculas oxidables reversibles tienen un potencial bajo de oxidación-reducción, y como la radiación es predominantemente oxidativa, se puede tolerar mejor.

1. 2. 3. a. 2.- Efectos del sustrato.

La radiosensibilidad puede ser modificada por cambios en la composición química del sustrato donde se encuentran los microorganismos, por ejemplo, la formación de radicales libres móviles en fase acuosa, dentro o fuera de las células.

En solución acuosa, los microorganismos son más sensibles que en desecación.

La adición de solutos al medio, modifica indirectamente los cambios radioquímicos por haber competencia por los radicales libres -

entre los productos añadidos y los microorganismos.

1. 2. 3. a. 3.- Efectos del pH.

El pH del medio también influye, de forma que a pH neutro los gérmenes tienden a ser -- más sensibles a la irradiación que a otro pH.

1. 2. 3. a. 4.- Efectos de la temperatura.

No son muy notables los efectos de la temperatura, pues con variaciones en la misma se han demostrado pocas diferencias en cuanto a la letalidad de los microorganismos.

1. 2. 3. a. 5.- Otros efectos.

Dependiendo del alimento que se utilice - para conservar por irradiación y las condiciones de envasado y almacenado para conservar - todas sus características, se podrán observar otros efectos que influyen, como el empaquetado al vacío, el meterlos en atmósferas de gases inertes, etc.

1. 2. 3. b.- Efectos de las condiciones antes de la irradiación.

Hollaender y cols. en 1.952, han demostrado - que el tratamiento de organismos previamente a la irradiación, puede afectar su sensibilidad.

Los organismos "lavados" con buffer de fosfato, son más sensibles que los no lavados. La adición de inhibidores de la respiración, hacen también a los microorganismos más sensibles.

Huber y cols. en 1.953, demuestran que si la leche se pone durante 45 segundos a 74,5° C. y -- luego se irradia a 0° C., hay mayor reducción de gérmenes después de irradiar, que si no se hace este tratamiento.

1. 2. 3. c.- Efectos de las condiciones después de la irradiación.

Estos efectos se han demostrado cuando se han utilizado grandes dosis de irradiación, así, la a acumulación de venenos celulares en el medio, hacen que perezcan algunos microorganismos, etc., - de modo que no se puede decir que son muy importantes en la actualidad, ya que las dosis que se

emplean hoy son mucho menores que entonces.

1. 2. 4.- Aplicaciones prácticas a la reducción de -
microorganismos en los alimentos.

Se ha podido observar que para producir una esterilización total, hay que alcanzar unas dosis muy elevadas, del orden de Mrads. (10 KGy), produciéndose entonces cambios en los caracteres organolépticos de los alimentos. Por el contrario, si damos dosis más bajas, no aparecen dichos cambios y las cargas microbianas se rebajan en factores de 10. Dependiendo de si son formas vegetativas o esporuladas, los factores serán mayores o menores respectivamente, pudiéndose observar que la "vida" de almacenado aumenta si se mantiene refrigerado, no congelado, desde varios días a varias semanas.

Los organismos superiores necesitan menos dosis que las bacterias para ser eliminados de los alimentos, tales como protozoos, insectos, larvas y otras formas de vida.

Por otro lado, tenemos que los virus necesitan dosis más altas, del orden de 0,5 Mrad. (5 KGy), para conseguirse una esterilización comercial.

1. 3.- JUSTIFICACION.

La justificación del procedimiento se puede dividir - en dos vertientes, una higiénico-sanitaria y otra económi ca.

La primera se desprende de que si por medio de la ir- radiación, se consigue rebajar la carga microbiana inicial ya se está mejorando la calidad del alimento y al estar - envasado, evitamos posteriores contaminaciones hasta su - consumo.

Pero sin duda, la vertiente más importante es la eco- nómica, ya que al prolongar la vida comercial de los ali- mentos perecederos, las pérdidas son menores y, además, - la energía que se utiliza para este procedimiento es mu - cho menor que la empleada para cualquier sistema de con - servación de alimentos.

En el Symposium Internacional de Conservación de Ali- mentos por Irradiación, celebrado del 21 al 25 de Noviem- bre de 1.977, en Wageningen (Holanda), se presentó un -- trabajo (Brinjolfsson, 1.978), en el que se decía que el 16,5% del total de la energía consumida en EE.UU., se de dica a los diferentes sistemas de preparación, conserva- ción, etc., de alimentos. En ese mismo trabajo, se hace un estudio comparativo de la energía utilizada para --

conservar los alimentos por los procedimientos convencionales, frente a la utilizada para conservarlos por irradiación, viéndose que ésta es menor.

En la Tabla XI del mencionado trabajo, se dan las cifras de energía consumida en KJ/kg (Kilojulios/Kilogramo) en los diferentes procesos de conservación de pollos, teniendo que, frente a los 15.460 KJ/kg de energía utilizada para radappertizar pollos enteros sin pelar, se utilizan 46.600 KJ/kg para congelar pollos troceados y pelados; 27.550 KJ/kg, si previamente se han cocinado y después - congelado. Si, por el contrario, sólo se refrigeran los - pollos troceados y pelados, necesitan una energía de - 17.760 KJ/Kg., pero si estos mismos pollos se radiopaste- rizan, se utilizan 17.860 KJ/Kg., es decir, sólo 100 KJ/ Kg. más, siendo la conservación más larga con el último procedimiento, teniendo, por lo tanto, mayor vida comer- cial.

El costo de las plantas de tratamiento, comparadas con las convencionales, son publicadas en otro trabajo presen- tado también por EE.UU. al mismo Symposium, Kennard, -- 1.978, en el que se incluyen los gastos de amortización - de las mismas y su máximo aprovechamiento al utilizarlas al máximo, irradiando diferentes alimentos e incluso, di- ferentes productos, como material médico, etc.

Volviendo al alimento, objeto de nuestro estudio, la trucha, tenemos que, según un trabajo publicado por Cuellar Carrasco y Díaz Yubero, 1.976, en España había, en el año 1.975, un total de 113 piscifactorías, dedicadas a la cría y comercialización de la trucha, con una producción cifrada entre las 5.500 y las 6.000 Tm., a un precio que oscilaba entre las 100 y 120 Ptas., por Kilogramo, al por mayor y a pie de piscifactoría.

En el año 1.979, según datos del I.C.O.N.A., las piscifactorías habían aumentado su número a 150 y la producción estaba entre las 9.000 y las 10.000 Tm., con unos precios que han oscilado entre las 80 y las 100 Ptas. por Kilogramo; esto nos hace ver que el volumen de capital que se ha movido es importante; si tomamos la media de los precios 90 Ptas./Kg. y la cifra inferior de producción dada, obtenemos la cifra de 810 millones de pesetas, la cual creemos que es importante.

Hay que tener en cuenta que este pescado sólo se consume en estado fresco, y en muy poca cantidad, ahumado, por lo que un procedimiento de conservación como el que nosotros estudiamos, sería una solución para evitar las pérdidas por putrefacción, que no cabe duda, que son importantes y, además, sería un aliciente para aumentar la producción y regular la oferta y la demanda.

Al estarse tendiendo, en la actualidad, a sustituirse las fuentes de irradiación de isótopos radiactivos, - por aceleradores de electrones, que tienen la ventaja de que cuando no están en funcionamiento no emiten ningún tipo de partícula radiactiva, ni originan residuos radiactivos, sería interesante hacer un estudio económico del proceso, el cual no es motivo de nuestro trabajo, en algunas de las zonas de mayor producción en España, tal como la provincia de Guadalajara, por ser una de las que -- más producción tiene y con piscifactorías próximas entre sí, estando ubicada la planta de tratamiento, o bien junto a la piscifactoría de mayor producción, o equidistante a las que entre todas obtuvieran una producción superior, y de esa forma hasta se podrían tratar otros productos -- procedentes del campo y que fuesen perecederos, como las patatas, ajos, etc., con lo que se produciría un mayor -- aprovechamiento de la planta.

2.- MATERIAL Y METODOS.

2. 1.- OBTENCION DE EJEMPLARES.

Para este trabajo se han empleado, como producto esencial, truchas procedentes todas ellas, de piscifactoría, pero con la salvedad de utilizarlas en dos escalones de su proceso evolutivo comercial, es decir, tratando la trucha recién sacrificada, cuyo origen ha sido las piscifactorías de la provincia de Guadalajara, fundamentalmente, de la zona de Cifuentes, y las de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes de Madrid, y los ejemplares adquiridos en el Mercado, los cuales, como máximo, hacía tres días que habian sido sacrificados hasta ser adquiridos por nosotros.

Las truchas eran todas del tamaño comercial, con un peso que oscilaba entre los 200 y los 250 grs. por ejemplar.

El procedimiento de sacrificio de los ejemplares, en las piscifactorías visitadas, fué el habitual.

2. 2.- PREPARACION DE EJEMPLARES.

Inmediatamente después del sacrificio, las truchas - eran transportadas al laboratorio, haciéndose lo mismo - con las adquiridas en el mercado. Se evisceraban, troceaban y empaquetaban en bolsas de plástico "rilsan" (nylon francés), con el fin de evitar contaminaciones posteriores a la irradiación.

El troceado se hacía partiendo por la mitad la trucha, empleando el eje longitudinal de la misma; acto seguido, se empaquetaba, cerrándose herméticamente por termopresión, sin vacío, y se anotaba en la bolsa la que era testigo, y en la otra mitad, la que era irradiada, de modo que las muestras que se utilizaban para controles, eran de la zona simétrica del cuerpo y así se podían comparar con más rigor.

2. 3.- IRRADIACION.

La irradiación se hacía en la fuente de irradiación - "Nayade" de la J.E.N., cuyas fuentes son de Co-60, administrándose unas dosis de 100 Krad. (1 KGy) y 200 Krad. (2 KGy), pasándose, a continuación, a realizar los análisis correspondientes.

2. 3. 1.- Fuente Nayade. Descripción.

En esta unidad de irradiación, las fuentes radiactivas están situadas en el fondo de un pozo lleno de agua, que actúa de blindaje, con unas características de resistividad y pH determinadas, controladas por unos filtros y resinas intercambiadoras de iones que las mantienen.

El pozo tiene sección cuadrada de 1,20 m. de lado, y 4,20 m. de profundidad. Las paredes están convenientemente blindadas y comprobada su estanqueidad.

El blindaje para las fuentes es por medio de agua y suponiendo una actividad de 10^4 Ci. de Co-60 ($3,7 \times 10^{14}$ Bq.), situados en un punto del fondo sin autoabsorción, según los cálculos, sería necesaria una profundidad de agua de 2,66 m., pero para mayor seguridad tiene 4 m. de profundidad de agua.

Para manejarlas, llevan las fuentes unas cabezas que se manipulan con una pieza de largo alcance, que posee un electroimán.

Las fuentes se colocan en un soporte, de forma circular, rodeando a un portamuestras cilíndrico que contiene el material a irradiar, consiguiéndose con esta disposición, un campo de irradiación bastante uniforme en la parte central del referido portamuestras.

Los portamuestras tienen 4,6, 13 y 28 cm. de diámetro, pudiéndose cambiar de una a otra geometría de irradiación, manipulándose convenientemente.

Se han hecho cálculos de las curvas de isodosis para las geometrías mayores, calculando el 100% en el centro del contenedor de muestras, siendo la intensidad de exposición, en las geometrías G-2, G-3 y G-4 con unos volúmenes de irradiación de 82, 270 y 2.000 cm³, respectivamente, y con una relación dosis máxima/dosis mínima, de 1,5 dentro de los citados volúmenes, de 3,7 MR/h (954,6 C/kg.h.), 1,1 MR/h (283,8 C/Kg.h.) y 0,33 MR/h. (90,3 C/Kg.h.), respectivamente.

2. 3. 2.- Dosimetría.

Para medir las dosis de la irradiación gamma, el método de Fricke es el más exacto de los dosímetros químicos.

Su fundamento es el de medir la concentración de Fe^{3+} después de irradiar una solución ácida de sal ferrosa en agua saturada de aire, ya que ésta cantidad es proporcional a la irradiación.

La determinación de la concentración del ión férrico producido se hace por espectrofotometría, y los cálculos se basan en suponer que se oxidan un promedio de 15,5 átomos de hierro por cada 100 eV de energía absorbida por la solución, (valor G).

Las dosis pueden medirse con un error inferior al 2%.

2. 3. 2. a.- Cálculos.

Dosis en el dosímetro:

Se parte de los siguientes datos:

Valor $G = 15,5$

Densidad de la solución del dosímetro = $1,024 \text{ gr./ cm}^3$.

Coefficiente de extinción del Fe^{3+} a $23,7^{\circ}\text{C}.$ =
2.174 litros/mol. x cm.

La dosis recibida por el dosímetro es:

$$\text{Dosis} = 2,8 \times 10^4 \text{ A/d rads (0,28 xA/d KGy)}$$

A= Absorbancia medida a 304 mm. y $23,7^{\circ}\text{C}.$ de la solución irradiada con respecto a la no irradiada.

d= es el paso de la luz de las células de -- cuarzo del espectrofotómetro, expresado en cm.

Si se hace a otra temperatura se utiliza la corrección siguiente:

$$\text{Dosis corregida} = \frac{\text{Dosis medida a } t^{\circ} \text{ C.}}{1 + 0,007 (t^{\circ} \text{ C} - 23,7^{\circ}\text{C.})}$$

Siendo t° la temperatura de la solución irradiada en el momento de la lectura.

Dosis en un cuerpo cualquiera.-

Si se irradia otro material, se efectúa la corrección, ya que el material y el dosímetro pueden no absorber la misma energía.

Se supone que en la absorción predomina el efecto Compton y la corrección se efectúa de la siguiente forma:

Dosis material = $\frac{Z/A \text{ del material}}{Z/A \text{ del dosímetro}}$ x Dosis dosímetro
en rads (Gy)

Siendo Z/A del dosímetro = 0,553 y Z/A del material la fracción másica de cada uno de los elementos, siendo Z = nº atómico y A = peso atómico.

2. 3. 2. b.- Unidades.

Actividad.- Se define como el número de transformaciones nucleares que ocurre en una cantidad de sustancia radiactiva en la unidad de tiempo.

La unidad es el Curio (Ci.), que es la actividad de una fuente en la que se producen $3,7 \times 10^{10}$ d.p.s. (desintegraciones por segundo).

La nueva unidad es el Becquerelio (Bq.) que se define como una desintegración por segundo, de modo que:

$$1 \text{ Ci} = 3,7 \times 10^{10} \text{ Bq} = 37 \text{ GBq (giga)}$$

Exposición.- Las desintegraciones producen ionizaciones en el aire, apareciendo entonces la magnitud exposición, que se define como el cociente Q/m , siendo Q la suma de las cargas eléctricas de

todos los iones de un mismo signo producido a esa masa m de aire, para rayos X y gamma.

La unidad de exposición es el Roentgen (R) - que se define como la exposición que produce en 1 cm^3 de aire a 0°C . y 760 mm. de presión de Hg., iones que transportan una unidad electrostática de carga de cada signo.

La nueva unidad es C/Kg. (Culombio/Kg) y la relación entre ambas es:

$$1 \text{ C/Kg.} = 3.876 \text{ Roentgens.}$$

Dosis absorbida.- Cuando a esa exposición se coloca un objeto cualquiera, aparece la dosis absorbida, que es el cociente W/m , siendo W la suma de todas las energías de los electrones arrancados por el haz primario de radiación y que se disipan dentro del volumen del objeto que posee una masa m .

La unidad de dosis absorbida es el rad y su valor es igual a 100 erg/g.

La nueva unidad es el Gray (Gy), siendo la relación entre ambas : $1 \text{ Gy} = 100 \text{ rads.}$

Factor E.B.R. (eficacia biológica relativa).- Como el número de rads (Gy) absorbidos por un tejido o un órgano, no determina el efecto biológico resultante, ya que depende del tipo de radiaciones, de la energía de las mismas, de la intensidad de las mismas, etc., se define la dosis E.B.R. en Radiobiología, que se mide en rems, como la dosis de cualquier radiación requerida para producir el mismo efecto biológico que un rad (10 mGy) de rayos X de 250 KVp.

Entonces el factor E.B.R. que relaciona rems con rads tiene distintos valores para las distintas radiaciones, tal como se relaciona en la Tabla I, existiendo, por tanto, la relación:

$$\text{Dosis en rems} = \text{Dosis en rads} \times \text{E.B.R.}$$

La nueva unidad es el Sievert (Sv) y la relación entre ambas es:

$$1 \text{ Sv} = 100 \text{ rems.}$$

Factor f.- Para convertir la exposición en dosis absorbida, ya que está en función de la naturaleza del material irradiado y de la energía de la radiación, existe otro factor que nos relaciona



la dosis absorbida con la exposición de la siguiente forma:

Dosis absorbida = f x exposición.

Para ciertas energías de radiaciones hay factores muy distintos entre las dosis absorbidas por diferentes tejidos de un organismo, como por ejemplo, el hueso y el músculo, siendo la relación 4:1, respectivamente, pero para otras energías a partir de 0,15 MeV en adelante, el factor es muy próximo a la unidad, tanto en hueso como en músculo y se puede decir que 1 R es, aproximadamente igual, a 1 rad.

T A B L A - I

Tipo de radiación	E.B.R.
Rayos X, gamma, beta.	1
Neutrones térmicos.	2,5
Neutrones rápidos	10
Protones	10
Partículas alfa	10
Núcleos de retroceso.	20

2. 4.- CONTROLES MICROBIOLÓGICOS.

2. 4. 1.- Medios de cultivo.

El primer medio empleado, utilizado como diluyente, es el agua de peptona, en la proporción de 1 gr/1., cuya composición es 0,66 gr. de peptona y 0,33 gr. de ClNa , para preparar un litro. Una vez hecha la preparación se esteriliza en autoclave durante 15 minutos, habiéndose repartido previamente en tubos de ensayo, con tapón de rosca, a razón de 9 cc. por tubo y en frascos con tapón de rosca, a razón de 45 cc. por frasco.

A estos frascos se añadían 5 g. del músculo de la trucha y se trituraba, con lo que se obtenía la primera dilución, es decir, la 10^{-1} . De esta última dilución, se tomaba un cc. y se añadía a un tubo de los preparados con el mismo medio y de éste, otro cc. al siguiente, y así sucesivamente, con lo que se iban obteniendo las diluciones sucesivas de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , etc., y de éstas, se sembraba en los medios líquidos y sólidos.

El procedimiento de trituración era el siguiente:

Se pesaban 5 g. del músculo de la trucha testigo y de la irradiada, en condiciones estériles, para lo cual

se utilizaba una batea y un juego de pinzas y tijeras por bolsa, esterilizadas por medio de alcohol -- quemado en la misma batea.

A continuación se flameaba la bolsa de plástico hasta conseguir un orificio suficientemente grande - para poder obtener la muestra sin contaminación, pero en un lugar alejado de donde se encontraba dicha muestra, con el fin de no influir en la carga microbiana de la misma con la llama del mechero.

Una vez que se habían añadido al frasco con los - 45 cc. de agua de peptona estéril, los 5 g. del músculo, se tapaba hasta poderse realizar la trituración - del mismo.

La trituración se realizaba con una trituradora a la cual se le había colocado un vástago de calibre suficiente para que entrase por la boca del frasco y al que previamente se había esterilizado con llama de alcohol durante 6 ó 7 minutos. Después de que el vástago se enfriaba se introducía en el frasco hasta el fondo y se procedía a la trituración de la muestra a 20.000 r.p.m., con lo que la homogeneización era lo más perfecta posible.

Cada vez que era triturada una muestra, se lavaba -

el vástago y se volvía a esterilizar de la misma forma, con el fin de proceder con la siguiente.

El triturado se dejaba reposar durante unos minutos para que desapareciera la espuma formada y seguidamente se tomaban diferentes fracciones de un cc. y se hacían las diluciones o se sembraba directamente en los medios empleados.

El segundo medio líquido empleado, es el agua de triptona enriquecido con citrato de hierro y cistina.

La preparación es como sigue:

- Triptona..... 10 g./litro
- ClNa..... 5 g./litro
- Agua destilada..... c.s.p. un litro.

al cual se le añadían 0,2 g./l. de cistina y 0,5 g./l. de citrato de hierro.

La disolución de los productos hay que hacerla en caliente, consiguiéndose la total disolución de los mismos si se efectúa en ebullición.

A continuación se distribuye en tubos de ensayo, con tapón de rosca, a razón de 9 cc. por tubo y se esteriliza en autoclave durante 15 minutos.

Este medio se emplea normalmente para detectar -
gérmenes productores de SH_2 y de Indol.

Se utiliza de la siguiente forma:

De las diluciones de los tubos con agua de peptona,
se añade 1 cc. a cada tubo de este medio y se ponen a
incubar en estufa a 30°C ., durante 48-72 horas, hacién
dose la primera lectura a las 48 horas y en caso de -
duda, a las 72 horas.

El medio, que toma un color amarillo claro recién
preparado, se torna oscuro, casi negro, cuando hay --
gérmenes productores de SH_2 , por formar un precipita-
do de sulfuro de hierro, el cual es de ese color.

Sobre estos tubos de positividad, se añaden unas
gotas del reactivo de Kovacs, y si hay gérmenes produc
tores de Indol, se produce en la zona de contacto un
anillo de color rojo intenso; en caso negativo, el an
llo es el formado por el reactivo, que al ser menos den
so que el medio, se queda sobrenadante y de color ama-
rillo transparente y de consistencia oleosa.

El reactivo de Kovacs se compone de alcohol amílico,
para-dimetil-amino-benzaldehído y ClH puro.

La forma de prepararlo es como sigue:

Se disuelven 10 g. de para-dimetil-amino-benzal dehidro con 150 cc. de alcohol amílico en baño María a 60°C. A continuación se deja enfriar y se añaden, gota a gota, 50 cc. de ClH, con lo que se obtienen - 210 cc. del reactivo.

El siguiente medio líquido empleado es el Brilliant Green Bile al 2%, cuya composición es:

- Peptona.....	10 g./l.
- Lactosa.....	10 g./l.
- Bilis de buey purificada.....	20 g./l.
- Verde brillante.....	0,0133 g./l.
- Agua destilada.....c.s.p.	un litro.

Para prepararlo se disuelven todas estas cantidades en agua destilada hasta completar un litro y se distribuye en tubos de ensayo como los ya descritos, pero en cuyo interior hay campanas de Durham, esterilizándose a continuación en autoclave durante 15 minutos.

Este medio se usa para detectar o confirmar la presencia de gérmenes del grupo coli-aerógenos. Tiene el mismo principio que el caldo de Mac-Conkey, pero en --

1.948 Mac-Kenzic y cols. demuestran que el verde brillante suprime el crecimiento de gérmenes anaerobios, fermentadores de lactosa, tales como el Clostridium - perfringens, los cuales dan reacciones positivas falsas a los 44°C., que es la temperatura de cultivo para este medio.

La positividad se produce cuando el caldo se enturbia y cuando en la campana Durham aparece un desplazamiento del líquido por estar ocupado por gas, como consecuencia de la producción del mismo por los gérmenes.

Algunos organismos como el Escherichia coli, pueden dar positivo al "Brilliant Green Bile" y, además, ser Indol positivo, por lo que se consideran del grupo Escherichia coli I, y si son Indol negativos, indican Escherichia coli del grupo II ó VI.

El siguiente medio líquido empleado, es el "Lauryl Tryptosa Broth", cuya composición es la siguiente:

- Tryptosa.....	20 g./l.
- Lactosa.....	5 g./l.
- Fosfato dipotásico.....	2,75 g./l.
- Fosfato monopotásico.....	2,75 g./l.
- Cloruro sódico.....	5 g./l.
- Lauryl Sulfato sódico.....	0,1 g./l.

El medio se prepara diluyendo todas las cantidades anteriores en agua destilada hasta un litro, se dosifica en tubos de ensayo con tapón de rosca y con campana de Durham, esterilizándose en autoclave durante 15 minutos.

La positividad es igual que en el anterior, apareciendo gas entre las 24 y 48 horas. Se incuba también a 44°C.

Los medios sólidos empleados son el "Plate Count Agar" (P.C.A.) y el "E.M.B. Levine".

El "P.C.A." lleva la composición siguiente:

- Triptona..... 5 g./l.
- Extracto de levadura..... 2,5 g./l.
- Dextrosa..... 1 g./l.
- Agar..... 15 g./l.
- Agua destilada.....c.s.p. un litro.

Para prepararlo se disuelven las cantidades anteriores en agua destilada hasta un litro, dejándose en maceración durante 15 minutos. A continuación se hierve durante 30 minutos para conseguir la total dilución de los productos y se distribuye en tubos anchos de tapón de rosca y se esteriliza en autoclave durante 15

minutos.

Una vez realizada la esterilización del medio, al enfriarse se solidifica y para emplearlo en placa - hay que volverlo a fundir. El procedimiento para fundirlo consiste en introducir los tubos en agua hirviendo durante unos minutos, de modo que el nivel del agua sobrepase el de los tubos, con lo que el medio se funde y cuando no hay grumos se introducen los mismos en un baño María a 45°C. que los mantiene fundidos hasta su utilización, ya que a esta temperatura no se produce shock térmico para los gérmenes.

Cuando las placas de Petri han recibido el inóculo de las diferentes diluciones, se añade una pequeña cantidad del P.C.A. fundido y antes de que se enfríe y solidifique, se realizan seis movimientos de giro a la derecha, seis a la izquierda, seis horizontales de derecha a izquierda y seis verticales de arriba a abajo, sobre un plano horizontal paralelo al suelo (la mesa). De esta forma aseguramos una perfecta distribución del inóculo.

A continuación se dejan las placas enfriar para que se solidifique el medio y se llevan a la estufa a 30°C durante 48 horas, tomando la precaución de colocarlas de forma invertida, es decir, apoyadas sobre la tapa con el fin de evitar contaminaciones durante el tiempo

de cultivo y de que el agua que se acumularía en la ta
pa cayese al mismo destruyendo las colonias. Pasado es
te tiempo se procede al recuento de las colonias.

No son significativas las placas que tienen menos
de 30 colonias, teniendo que tener estas como mínimo -
1 mm. de diámetro.

Para saber la carga microbiana original, se proce-
de como a continuación se indica:

Se cuentan las colonias que hay en la última de las
placas que sea significativa, es decir, en la que haya
más de 30 colonias y menos de 300.

Sea n el número de colonias significativas, conta-
das en la dilución 10^{-k} , entonces tendremos que:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de gérmenes/gramo de muestra} = n \times k.$$

El siguiente medio sólido empleado es el "E.M.B. Le
vine", cuya composición es la siguiente:

- Peptona.....	10 g./l.
- Lactosa.....	10 g./l.
- Fosfato dipotásico.....	2 g./l.
- Agar.....	15 g./l.

- Eosina Y..... 0,4 g./l.
- Azul de metileno..... 0,065 g./l.

Para prepararlo se toman las cantidades anteriores y se añade agua destilada hasta 1 litro, después se calienta hasta ebullición hasta conseguir la disolución completa del medio, se vierte en tubos con tapón de roca iguales que los del medio anterior y se esteriliza en autoclave durante 15 minutos.

Para emplearlo se procede del mismo modo que con el "P.C.A.", pero una vez hecha la siembra, se mete en estufa a 44°C.

Las colonias de *Escherichia coli* son, en este medio, de 2 ó 3 mm. de diámetro, aisladas, con pequeña tendencia a la confluencia, exhibiendo un brillo metálico verdoso con luz reflejada, y centros de color púrpura por transparencia.

2. 4. 2.- Medios de tinción.

El procedimiento de tinción empleado fué el de Gram, realizándose de la siguiente forma:

1) Hacer la preparación para el microscopio tomando un portaobjetos limpio y exento de grasa. Si se u-

utilizan medios líquidos, con un asa de platino esterilizada a la llama de un mechero Bunsen, se sumerge en el medio que contenga los gérmenes a identificar y se extiende sobre el portaobjetos.

Si se parte de una colonia de una placa, se toma el asa de platino esterilizada a la llama y se introduce en agua bidestilada estéril, depositándose la gota tomada sobre el portaobjetos; se vuelve a flamear el asa y una vez que se ha enfriado se toma una pequeña alícuota de la colonia elegida y se extiende en el portaobjetos con la ayuda de la gota de agua depositada previamente. El asa se vuelve a flamear a continuación.

2) Para fijar las preparaciones, se flamea el portaobjetos por la cara contraria donde se ha hecho la extensión de la muestra, teniendo cuidado de que no se caliente mucho, para lo cual se toca con el mismo en el dorso de la mano para comprobarlo, pues de calentarse mucho podrían estropearse las preparaciones.

3) Se deja enfriar la muestra a temperatura ambiente.

4) Se sumerge la preparación en cristal violeta durante un minuto.

5) Se lava con agua corriente, sin presión para no arrastrar la preparación.

6) Se sumerge la preparación en lugol durante un minuto.

7) Se lava igual que en el apartado 5.

8) Se sumerge la preparación en el decolorante, - alcohol etílico al 95%, durante 30-60 segundos. Se -- puede utilizar acetona, pero al actuar muy rápidamente, se corre el peligro de tener error en la identificación.

9) Se lava igual que en el apartado 5.

10) Se sumerge la preparación en safranina durante 30-60 segundos.

11) Se lava igual que en el apartado 5.

12) Se seca la preparación y se observa con objetivo de inmersión.

2. 5.- METODO QUIMICO.

Para ver el estado de degradación (putrefacción) de la trucha y compararlo en la irradiada con la no irradiada, - se utilizó el método de detección del nitrógeno básico volátil total. (N.B.V.T.).

Este procedimiento se basa en que estas sustancias, aminas básicas y amoníaco, tienen la propiedad de ser fácilmente desplazables de sus sales por bases débiles y arrastrables por vapor de agua. La cantidad de N.B.V.T. es directamente función del nivel de degradación protéica producida por los gérmenes proteolíticos.

El N.B.V.T. desplazado por el carbonato de litio, base débil que no hidroliza la urea, ni los prótidos, ni los aminoácidos, es arrastrado por el vapor de agua, titulándose el destilado con ácido sulfúrico.

2. 5. 1.- Material y reactivos.

Frasco de tapón de rosca con capacidad para 250 cc., trituradora, tijeras, pinzas de disección, bureta de 10 cc., dos probetas graduadas de 50 cc., matraz de 500 cc., vaso de precipitados de 100 cc., refrigerante y sistema de empalme al matraz.

Como reactivos agua recientemente destilada, sili-
cona antiespumante, solución de ferrocianuro de pota -
sio al 15% en agua, solución de acetato de zinc al 30%
en agua, solución de fenolftaleína al 2% en alcohol e-
tílico de 90º, solución de carbonato de litio saturada,
(alrededor del 8 por mil) en agua, solución acuosa de
alizarina sulfonato de sodio al 0,5% (alizarina S, ro-
jo de alizarina), solución décimo-normal de ácido sulfú-
rico.

2. 5. 1. a.- Protocolo operatorio.

1) Se pesan 10 g. del músculo de la trucha -
que se va a analizar.

2) Se pone el músculo pesado en el frasco de
tapón de rosca con 50 cc. de agua.

3) Se tritura.

4) Se vierte en el matraz de 500 cc. el triru-
rado.

5) Se lava el frasco con otros 50 cc. de agua
destilada.

6) Se vierte el agua del lavado anterior en -

el matraz de 500 cc.

7) Añadir sucesivamente al matraz y agitando cada vez:

- 3 gotas de silicona antiespumante.
- 1 cc. de la solución de ferrocianuro potásico.
- 1 cc. de la solución de acetato de zinc.
- 5 gotas de la solución de fenolftaleína.
- 20 cc. de la solución de carbonato de litio.

Este último añadido se acompaña de un cambio de color al rosa franco de la fenolftaleína.

El añadir la silicona permite que el triturado se pueda calentar rápidamente y no se formen espumas, que podrían pasar al refrigerante y vaso recogedor del destilado; por otro lado el ferrocianuro de potasio y el acetato de zinc realizan una defecación que asegura el bloqueo de los prótidos.

8) Empalmar el matraz a un refrigerante descendente, de modo que el destilado se pueda recoger en un vaso de precipitados que contenga 20 cc. de agua destilada con 5 gotas de la solución de alizarina. El destilado debe caer directamente en el líquido, mediante un tubo de prolongación sumer

gido en él. (Figura 1).

9) Calentar el matraz hasta ebullición, y cuando el cambio al violeta de la alizarina comience, - se continúa la destilación durante 10 minutos.

10) Se separa el matraz del refrigerante.

11) Se lava el aparato de destilación (refrigerante, empalmes, etc.) y se recoge en el vaso de precipitados.

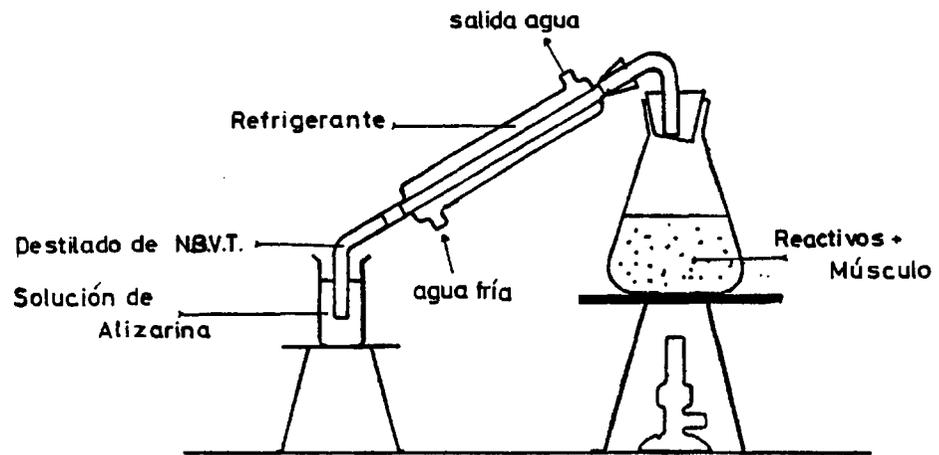
12) Se titula el destilado con ácido sulfúrico 0,1 N., hasta el cambio al amarillo pálido de la alizarina.

2. 5. 2.- Cálculos.

Los cálculos vienen expresados en mg. de NH_3 por 100 g. de muestra, entonces tenemos:

$$\text{N.B.V.T. mg./100 g.} = 1,7 \times n \times 10 = 17n$$

1,7 es el peso del NH_3 en 100 ml. y n es el número de cc. de ácido sulfúrico 0,1 N., corregidos con el factor, gastados en la titulación del destilado.



- 46 -

Aparato de obtención del N.B.V.T.

Figura 1.

La corrección se realiza mediante la siguiente fórmula:

$$V \times N \times f = V' \times N' \quad (1)$$

donde f es el factor calculado para la solución del ácido sulfúrico 0,1 N.; despejando V' , obtenemos el número de cc. que se habrían gastado de ser correcta la normalidad del ácido sulfúrico.

Dicho factor se calculó con una sustancia de tipo primario, el CO_3Na_2 , de la siguiente forma:

peso molecular del $\text{CO}_3\text{Na}_2 = 106$

$$1 \text{ eq.} = \frac{106}{2} = 53$$

Se disuelven 4 g. del producto en un litro de agua, de modo que la normalidad será: $\frac{4}{53}$ N.

Se toman 20 cc. de la solución y se valoran tres veces, para hacer la media, con el ácido sulfúrico 0,1 N. preparado y del que queremos calcular el factor, aplicando la fórmula (1) y despejando f obtenemos dicho factor que en nuestro caso $f = 0,989$.

2. 6.- METODO BIOQUIMICO.

2. 6. 1.- Material y reactivos.

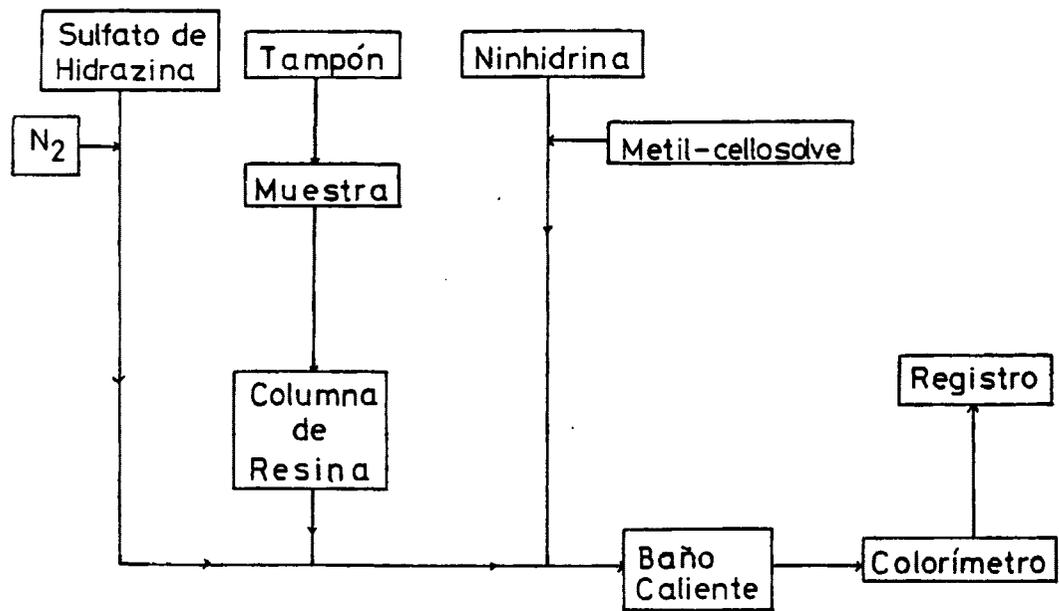
Para detectar posibles cambios en la composición - de los aminoácidos protéicos del músculo de la trucha irradiada, se ha empleado el analizador de aminoácidos TECHNICON T.S.M.-1, cuyo esquema de funcionamiento se puede ver en la figura 2.

La muestra para el analizador se obtiene como sigue:

Se pesa 1 g. de músculo fresco de la trucha, evitando que formen parte de él espina y piel. Se pone en un frasco de 50 ml. forrado con papel de aluminio para evitar la penetración de la luz, se añade mezcla P.A.E. (fenol, acético glacial y agua, en la proporción 1:1:1) a dicho frasco, en la cantidad de 5 cc.

A continuación se tritura el músculo pesado, durante 5 minutos, evitando el calentamiento por medio de la inmersión del frasco en hielo fundente mientras se realiza el triturado, evitando la penetración de luz al interior del frasco para que no se oxide el fenol.

Acto seguido se centrifuga a 12.000 r.p.m. a 5º C.



Esquema del analizador de aminoácidos.

Figura 2.

durante 30 minutos.

Se toma el sobrenadante (extracto "P.A.E.") y se elimina el sedimento, que suele ser casi nulo.

El extracto P.A.E. se mezcla con siete volúmenes de acetona, se tiene una noche, se vuelve a centrifugar a 12.000 r.p.m. a 5º C. durante 30 minutos, se tira el sobrenadante y el residuo es el precipitado de proteínas.

La mezcla P.A.E. se prepara utilizando agua, ácido acético glacial y fenol recientemente destilados, evitando para este último la oxidación, tomando las precauciones que se han descrito mas arriba.

El precipitado recogido se deja en placa de Petri para que se evapore la acetona y no sea factor influyente al pesar, en los cálculos posteriores.

Se toman 5 mg. aproximadamente de este precipitado y se colocan con 5 cc. de ClH 6 N., en un frasco como los de penicilina, se hace el vacío, se encapsula y se coloca en estufa a 110º C. durante 24 horas; de esa forma obtenemos la hidrólisis de la proteína.

El hidrolizado se evapora en Rotavapor, con el fin

de eliminar el ClH, haciéndole tres lavados con 5 cc. de agua destilada y evaporando cada vez, a una temperatura de 35° C.

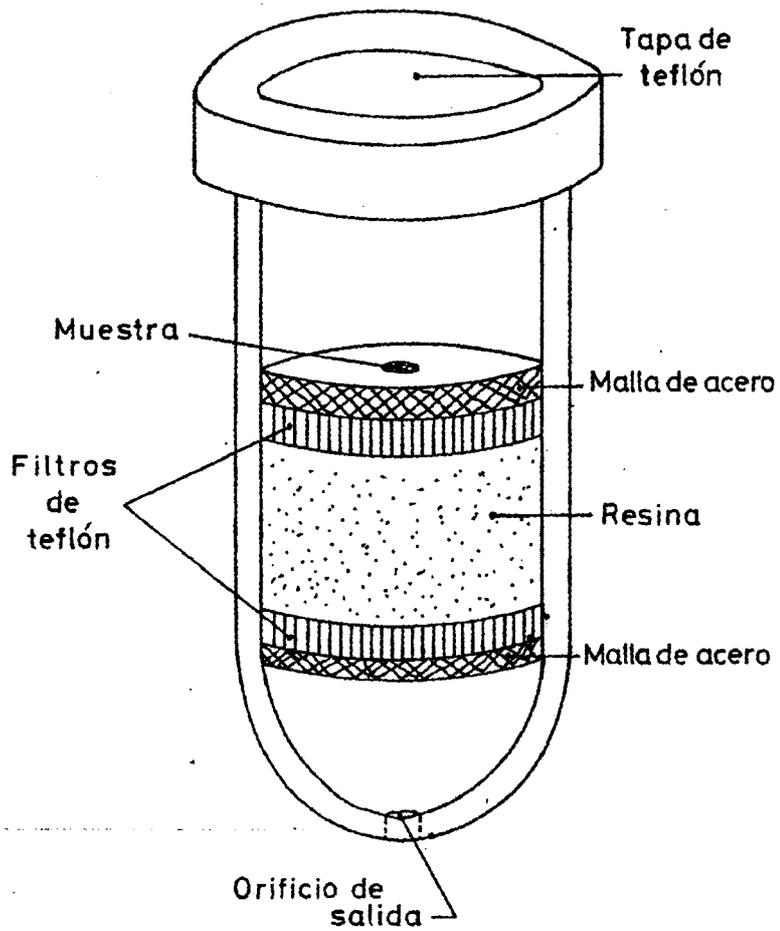
Después del último lavado se recoge en 2 cc. de ClH 0,1 N., que posee un pH adecuado para el procedimiento analítico.

La colocación de la muestra se hace sobre un cartucho de resina colocada entre dos filtros de teflón, como se indica en la figura 3.

Los cartuchos se preparan de la siguiente forma:

Después de lavados con agua destilada, se hace pasar por ellos NaOH 0,2 N. a través de la resina y se lava de nuevo con ClH 0,1 N. Después se hace pasar la solución tampón de pH 2 y queda preparado para recibir la muestra.

La muestra se coloca en la parte superior del cartucho, sobre el filtro de teflón, en una cantidad comprendida entre 10 y 100 microlitros y 0,025 ml. de la solución patrón de norleucina. Estas aplicaciones se hacen con microjeringa y después de cada una es necesario succionar con trompa de vacío para que la muestra penetre en la resina. Después se deposita una gota de solución tampón de pH 2, se vuelve a succionar -



Cartucho de resina para el analizador de aminoácidos

Figura 3.

y se tapa la parte superior con un filtro de teflón, - con lo que el cartucho ya se puede colocar en el porta muestras del analizador.

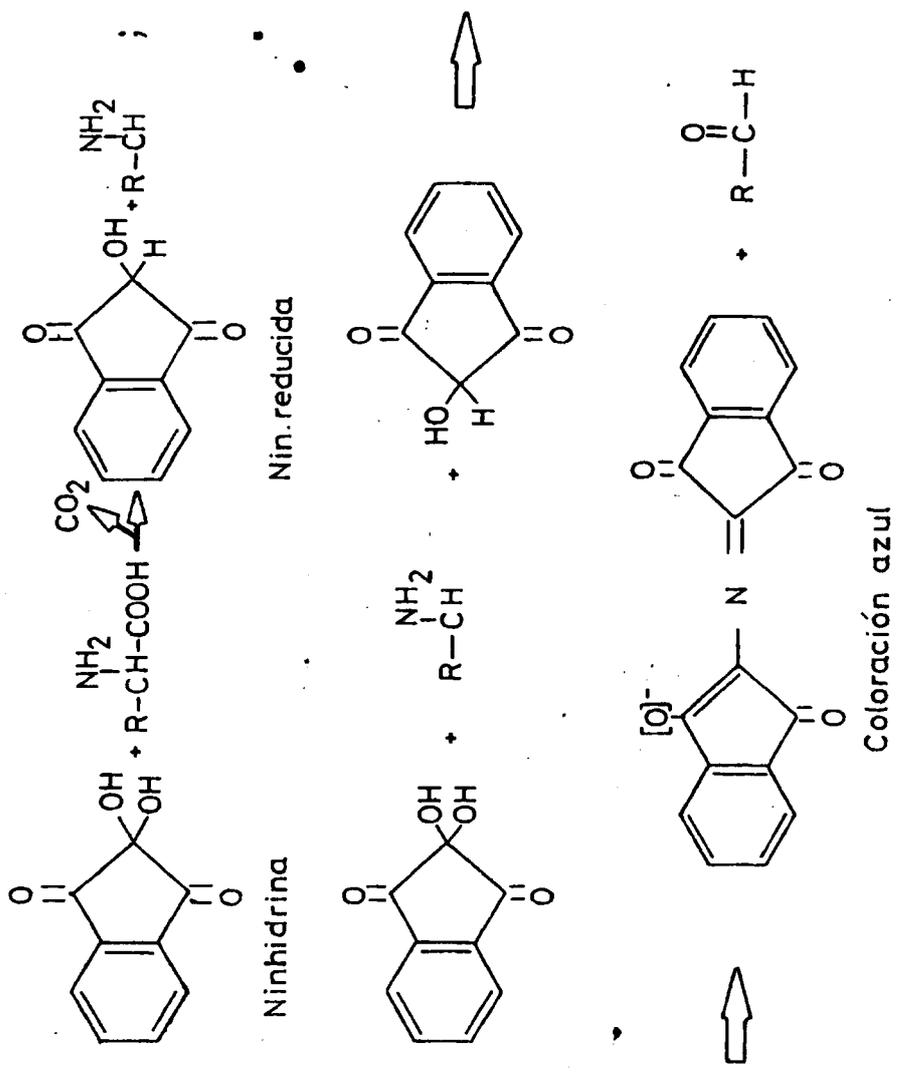
Los cartuchos, dos para cada muestra, se colocan - en un plato giratorio que los hace coincidir sobre dos columnas cromatográficas de resina, que separan los aminoácidos según su acidez o basicidad, sirviendo una para los aminoácidos básicos y la otra para los aminoácidos ácidos y neutros.

La composición de las resinas de cada columna es - como sigue:

Características	Col. Básica	Col. ácido- neutra
Tipo de resina	Technicon C-3	Technicon C-3
Longitud	4,5-5,0 cm.	23,0-23,5 cm.
Diámetro	0,5 cm.	0,5 cm.
Temperatura	60° C.	60° C.
Flujo	0,5 ml./min.	0,5 ml./min.

La fase móvil está formada por tampones de diferentes pH, utilizándose un pH para cada fracción.

Una vez separados los aminoácidos en el flujo que sale de las columnas, se detectan por la reacción colorada que producen al unirse con la ninhidrina, como - se indica en la figura 4.



Reacción de coloración de la ninhidrina.

Figura 4.

Para que se produzca la reacción coloreada, se hace pasar el flujo de la mezcla a través de un baño caliente a 95° C. y un sistema refrigerador a la salida. A continuación un colorímetro mide la densidad óptica a 570 y 440 nm., cuyas variaciones quedan dibujadas en un registro gráfico de dos canales.

El sistema, en su conjunto, funciona mediante un programador de cinta perforada que dirige los tiempos y las posiciones de una válvula peristáltica que controla el flujo de los tampones, desde los recipientes donde se almacenan hasta las columnas, pasando por los cartuchos portadores de la muestra. La válvula peristáltica distribuye el tampón requerido en cada etapa para la elución de los aminoácidos y controla el flujo de cada columna en el sistema analítico y el de los productos residuales.

Reactivos.-

Solución tampón stock, que es la solución madre de los tampones empleados.

Su composición es:

- Acido cítrico monohidratado..... 420 g.
- NaOH en pastillas..... 165 g.

- Agua destilada c. s. p. 2 litros.

Tampones de trabajo :

pH 3,25, cuya composición es:

- Solución stock..... 400 cc.
- Metil-cellosolve..... 240 cc.
- Tiodiglicol..... 1 cc.
- Agua destilada c. s. p. 4 litros.

pH 4,25, cuya composición es:

- Solución stock..... 400 cc.
- Tiodiglicol..... 1 cc.
- Agua destilada c. s. p. 4 litros.

pH 5,25, cuya composición es:

- Solución stock..... 400 cc.
- Tiodiglicol..... 1 cc.
- ClNa..... 40 g.
- Agua destilada c. s. p. 4 litros.

pH 2, cuya composición es:

- Solución stock..... 400 cc.

- Tiodiglicol..... 40 cc.
- Agua destilada c.s.p. 4 litros

Todos ellos se titulan con ClH, siendo importante el conseguir un buen calibrado del pH para poderlos utilizar. También se deben proteger de alteraciones atmosféricas y microbianas.

Solución de NaOH 0,2 N.

- NaOH..... 32 g.
- EDTA disódico..... 4 g.
- Solución Brij-35,30%..... 40 cc.
- SO_4H_2 conc..... 4 gotas

Solución de metil-cellosolve al 50% con H_2O destilada.

Ninhidrina 1%. - Es necesario preparar previamente una solución tampón de acetato de sodio 4 N., que debe tener un pH de 5,51, para ello se toma:

- Acetato de sodio anhidro..... 1:312 g.
- Acido acético glacial..... 400 cc.
- Agua destilada c.s.p. 4 litros

A continuación se prepara la ninhidrina de la --

siguiente forma:

- Ninhidrina..... 40 g.
- Metil-cellosolve..... 2.000 cc.
- Tampón acetato de sodio 4 N... 1.000 cc.
- Agua destilada c.s.p. 4 litros.

Patrones de los aminoácidos.- La mezcla standard está formada por los aminoácidos siguientes, en la misma proporción molar:

Lisina, histidina, arginina, aspártico, treonina, serina, glutámico, prolina, glicocola, alanina, cistina, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina, fenil-alanina.

El standard interno es una solución de norleucina a la concentración de 2,5 micromoles/ml.

2. 6. 2.- Cálculos.

En cada cromatograma obtenido se identifican los aminoácidos correspondientes a cada pico, comparándolo con el cromatograma de la mezcla standard conocida. Se calculan las áreas de los picos multiplicando la altura por la semibase correspondiente a cada uno.

En el cromatograma de la mezcla standard se hace igual y se hallan a continuación los equivalentes de norleucina (EN) para cada aminoácido.

$$\text{E.N.} = \frac{\text{Area de norleucina}}{\text{Area del aminoácido}}$$

Este E.N. nos va a servir para hallar la concentración de los aminoácidos de la muestra mediante la fórmula:

$$\text{Micromol. de aminoácido} = \frac{S_{aa.}}{S_N} \times \text{EN} \times \text{micromol.N.}$$

Donde S aa. = área del pico correspondiente al aminoácido cuya concentración estamos calculando.

S N = área del pico correspondiente a la norleucina que hemos introducido en el standard interno junto con la muestra.

E.N. = equivalente en norleucina para este aminoácido hallado en el cromatograma standard.

Micromol. N = son los micromoles de norleucina introducidos con la mezcla standard, que será igual al volumen tomado de la solución standard de norleucina por la concentración que tiene (2,5 micromoles/ml.).

Con esto se calcula la cantidad de micromoles de cada aminoácido presente en el volumen de muestra que se haya introducido. Conociendo el factor de dilución empleado, si ha sido necesario diluir el extracto, y el volumen total del mismo, se pueden referir los resultados a la cantidad de materia inicial de donde se obtuvo el extracto y cuya composición se trata de analizar.

2. 7.- EXPERIMENTACION EN ANIMALES DE LABORATORIO.

Para esta experiencia se utilizaron 44 ratas Wistar, - con un peso inicial medio de 60 g./rata.

Se hicieron cuatro lotes de 11 ratas cada uno, y se - las tuvo durante una semana en adaptación. Cuando transcurrió dicho tiempo se eliminó una rata de cada lote de modo que estos fuesen homogéneos, quedando cinco hembras y cinco machos en cada uno, con lo que se inició la experiencia.

Los lotes se denominaron control, testigo, 100 y 200, según se alimentaran sus animales con pienso comercial, truchas sin irradiar, trucha irradiada con 100 Krads. (1 KGy) y trucha irradiada con 200 Krads. (2KGy) respectivamente. Los animales comían un peso aproximado de alimento igual - para cada jaula, utilizándose como corrector vitamínico mi neral, el mismo pienso que comía el lote control.

La experiencia duró un mes y los animales se alimentaron con trucha irradiada en la Fuente Nayade de la J.E.N. y después liofilizada en el Centro Experimental del Frío de Madrid y cuyo proceso de liofilización duraba unas 16 - horas aproximadamente.

Una vez hecha la liofilización, se guardaban en bolsas de plástico, con el fin de que no actuase la humedad del -

aire en sus propiedades.

Los animales tenían agua a discreción y el lecho de la jaula estaba formado por viruta y serrín de madera, el cual era cambiado con frecuencia.

Los animales fueron pesados al final de la experiencia y sacrificados, previa anestesia con éter etílico, por medio de una extracción masiva de sangre, haciendo una punción cardiaca en el ventrículo izquierdo.

2. 7. 1.- Pruebas hemáticas.

En la sangre extraída se realizaron estudios de re cuenta de hematíes y leucocitos, fórmula leucocitaria, hematocrito, hemoglobina, volúmen celular medio, velocidad de sedimentación globular a la primera hora, segunda hora y veinticuatro horas, así como del índice de Katz.

Para algunos de estos análisis se utilizó un equipo Coulter Counter, modelo FN, que actúa con diluciones prefijadas y con diluyentes estudiados y cuyas disoluciones son estudiadas o medidas eléctricamente por el equipo, dándonos los resultados a través de computadores asociados al mismo.

2. 7. 1. a.- Descripción del equipo Coulter Counter
Modelo FN.

2. 7. 1. a. 1.- Fundamento.

Este equipo se basa en la succión que hace un sifón de mercurio sobre una suspensión de partículas en un electrolito, forzándolas a pasar a través de una abertura de dimensiones específicas. El orificio está situado entre dos electrodos, uno fuera del tubo y otro dentro.

Cuando una partícula pasa a través de la abertura, se desplaza el electrolito y entonces cambia la resistencia entre los dos electrodos, produciendo una diferencia de potencial de magnitud proporcional al volumen de la partícula.

Este voltaje es captado por una serie de circuitos con discriminadores que generan cuentas para sólo las partículas que exceden de un cierto nivel; de esa forma se cuentan las partículas que pasan a través del orificio.

El equipo viene con dos sistemas de chequeo, un osciloscopio y un sistema de proyección vi--

sual con dígitos.

2. 7. 1. b.- Preparación de la muestra.

En un tubo con cristales de EDTA o heparina como anticoagulante, se añaden 2 ó 3 cc. de sangre recién extraída. Con estos tubos se va a un equipo automático (Dual dilueter III) el cual toma de los tubos una fracción de sangre y la diluye en un volumen determinado de electrolito, marca ISOTON (R) en la proporción de 1:50.000 para la serie roja. Para la serie blanca lo hace en la proporción 1:500. Para hacer los recuentos se ha de esperar unos 30 minutos, con el fin de que los electrolitos se estabilicen.

Una vez pasado ese tiempo, se lleva el frasco con la solución al sistema succionador, el cual se ha lavado previamente con el producto ISOTERGE (R), y se anota el número que aparece en el tablero. Si estamos en la serie roja hay unas tablas correctoras para saber el número de hematíes por milímetro cúbico, que facilita la casa, y si es la serie blanca el número que aparece es el correcto.

Con los equipos asociados, y previa calibración, salen directamente la hemoglobina, el hematocrito y

el volúmen celular medio en micras cúbicas.

2. 7. 1. c.- Fórmula leucocitaria.

Las preparaciones para hacer las fórmulas leucocitarias, se hicieron de la siguiente forma:

Se toma sangre sin citratar en la esquina de un portaobjetos y se hace la extensión sobre otro de forma que no salga muy gruesa para poder identificar los glóbulos blancos sin lugar a dudas, para lo cual se debe dar al primero una inclinación adecuada. Se deja secar la preparación durante unos minutos y a continuación se procede a su tinción. El colorante utilizado por nosotros fué el Giemsa, cuya composición es azur-eosina y azul de metileno en solución. Una vez seca la preparación se puede observar en el microscopio con objetivo de inmersión.

2. 7. 2.- Pruebas bioquímicas.

Las pruebas bioquímicas consistieron en estudiar la tasa de transaminasas en suero de la sangre extraída a las ratas.

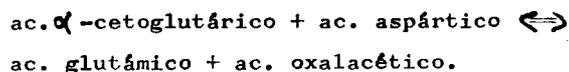
Estos estudios se hicieron con un producto comer-

cial de los utilizados normalmente y las lecturas con un espectrofotómetro marca VARIAN-TECHTRON, mod. 635, en luz visible y a una longitud de onda de 530 nm., - según indicaba el laboratorio preparador de los reactivos.

2. 7. 2. a.- Fundamento.

El estudio de las transaminasas se fundamenta en que en los tejidos existen enzimas que catalizan la transformación del NH_2 de los aminoácidos en sus correspondientes ácidos cetónicos. Estas enzimas son las llamadas transaminasas, que se encuentran en el suero en ciertas cantidades, pero que pueden aumentar en caso de descomposición celular, como necrosis hepáticas, infarto de miocardio, etc., de modo que este aumento puede darnos importantes datos diagnósticos.

La transaminasa GOT (glutámico-oxalacética), cataliza la siguiente reacción reversible:



La transaminasa GPT (glutámico-pirúvica), cataliza la siguiente reacción reversible:

ac. α -cetoglutárico + alanina \rightleftharpoons
ac. glutámico + ac. pirúvico.

La actividad de las transaminasas se mide en unidades, las cuales son proporcionales a la cantidad de ácidos cetónicos formados.

El fundamento consiste en que si se deja reaccionar el suero (sin que se haya producido hemólisis al obtenerlo) durante cierto tiempo a 37° C., sobre un sustrato en solución tampón de ácido α -cetoglutárico y ácido aspártico para la GOT y sobre ácido α -cetoglutárico y alanina para la GPT, entonces, según la actividad enzimática disminuye el ácido α -cetoglutárico, aumentando el oxalacético para la GOT y el ácido pirúvico para la GPT. Estos ácidos cetónicos se transforman en el compuesto dinitrofenil-hidrazina, y como ésta tiene un grado de extinción mas alto que el ácido α -cetoglutárico, la medida de la actividad de las enzimas séricas, vendrá dada por el aumento de la extinción problema frente a la extinción de una prueba en blanco, a la longitud de onda indicada.

Si la prueba se hace siguiendo paso a paso los tiempos de reacción, se consigue establecer función lineal entre actividad enzimática y aumento de la

extinción.

2. 7. 3.- Reactivos.

Son los facilitados por el estuche comercial, siendo los siguientes:

- Sustrato GOT
- Sustrato GPT
- Standard GOT
- Standard GPT
- Solución de dinitrofenil-hidrazina en ClH 1 N.
- Lejía sódica 0,4 N.

2. 7. 4.- Técnicas.

Una vez extraída la sangre, se vierte en unos tubos de centrifuga, teniendo cuidado para no producir hemólisis, ya que de producirse ésta, la medida no vale.

Se centrifuga esa sangre durante 5 minutos a 3.000 r.p.m. y del suero sobrenadante se toman las alícuotas correspondientes como se indica en las tablas que hay a continuación.

Es importante no pasarse en el tiempo marcado en cada paso y añadir los reactivos siempre en el mismo -

- 69 -

orden, con el fin de que el tiempo sea el mismo para -
todos los tubos y de esa manera la lectura posterior -
será correcta.

Medición de GOT

	Problema	Suero en blanco	Prueba en blanco	Standard
Sustrato GOT	0,5 ml.	0,5 ml.	0,5 ml.	0,4 ml.

Pre calentamiento 5 min. a 37°C.

Standard GOT	--	--	--	0,1 ml.
H ₂ O dest.	--	--	0,2 ml.	0,2 ml.
Suero	0,2 ml.	--	--	--

Incubación a 37°C. durante 15 min.

Solución de di-nitrofenil-hidrazina.	0,5 ml.	0,5 ml.	0,5 ml.	0,5 ml.
Suero	--	0,2 ml.	--	--

Se mezcla bien y se deja 10 min. en reposo a 37°C.

NaOH 0,4 N.	5 ml.	5 ml.	5 ml.	5 ml.
-------------	-------	-------	-------	-------

Al cabo de 10 minutos de añadir la sosa se mide en el espectrofotómetro a 530 nm.

Medición de GPT

	Problema	Suero en blanco	Prueba en blanco	Standard
Sustrato GPT	0,5 ml.	0,5 ml.	0,5 ml.	0,4 ml.

Pre calentamiento 5 min. a 37°C.

Standard GPT	--	--	--	0,1 ml.
H ₂ O destilada	--	--	0,1 ml.	0,1 ml.
Suero	0,1 ml.	--	--	--

Incubación a 37°C. durante 15 min.

Solución de di- nitrofenil-hi- drazina.	0,5 ml.	0,5 ml.	0,5 ml.	0,5 ml.
Suero	--	0,1 ml.	--	--

Se mezcla bien y se deja 10 min. en reposo a 37°C.

NaOH 0,4 N.	5 ml.	5 ml.	5 ml.	5 ml.
-------------	-------	-------	-------	-------

Al cabo de 5 min. y antes de los 30 min., se mide en el -
espectrofotómetro a 530 nm.

2. 7. 5.- Cálculos.

$$\frac{\text{Extinción problema} - \text{extinción suero en blanco}}{\text{Extinción Standard}} \times 50 =$$

= mUnidades internacionales/ml.

La medida en el espectrofotómetro se realiza como sigue:

- Se enciende el aparato un cierto tiempo antes - con el fin de que se caliente y se estabilicen los sistemas de medida.

- Se selecciona la tecla de luz visible, la longitud de onda (530 nm.) y la tecla absorbancia.

- Se hace el ajuste a cero, para lo cual se introduce en las dos cubetas agua destilada, teniendo siempre la precaución al introducirlas de que estén completamente secas, limpias las paredes transparentes y - - puestas éstas de modo que puedan ser atravesadas por - el rayo de luz y no haya interferencia en las medidas.

- Una de las cubetas, generalmente la de la parte posterior, se vacía de agua y se llena del tubo que contiene la prueba en blanco de los reactivos, apareciendo una medida en la ventana en dígitos, la cual no es necesario apuntar para restársela a todas las demás,

ya que cuando se miden los otros tubos frente a ésta, el aparato hace la resta de forma automática.

- En la cubeta de la parte anterior se pone el líquido del tubo problema y se anota la absorbancia, lavando la misma con agua destilada a continuación.

- En esa misma cubeta se mide el suero en blanco correspondiente al anterior tubo, se anota la absorbancia y se vuelve a lavar.

- Se mide el Standard en esa misma cubeta y se anota la absorbancia, volviéndose a lavar a continuación.

2. 7. 5. a.- Estadística.

2. 7. 5. a. 1.- Apreciación del grado de precisión de una medida.

Se tienen una serie de resultados cuyo valor medio y desviación típica son: \bar{x} y $\sigma_{n.1}$.

Se define como coeficiente de variabilidad (C.V.), a una serie de valores a la relación entre la desviación típica y la media expresada en %.

$$C.V. = \frac{\sigma_{n-1}}{\bar{x}} \times 100$$

Tomamos el valor $\sqrt{n-1}$, porque en nuestro caso la serie de valores han sido siempre menores de 30 y, por lo tanto, no se puede tomar el valor \sqrt{n} .

Generalmente, y de forma orientativa, en el material biológico, el C.V. no debe ser superior al 20% si la muestra es homogénea.

2. 7. 5. a. 2.- Aplicación de las "t" de Student a la apreciación del grado de significación de la diferencia de dos medias.

Se tienen dos series de resultados correspondientes a los tratamientos A. y B., siendo sus valores medios respectivamente \bar{x}_A y \bar{x}_B .

Interesa saber si la diferencia $d = \bar{x}_A - \bar{x}_B$ es significativa al nivel del 95 o del 99%.

La diferencia se distribuye según la función t, existiendo la siguiente relación entre las varianzas:

$$\sigma_d^2 = \frac{\sigma_A^2}{n_A} + \frac{\sigma_B^2}{n_B}$$

La desviación típica de la diferencia - \sqrt{d} será la raíz cuadrada de la expresión anterior.

El grado de significación d se determina por el método de la t , como si se tratase de una media.

Se busca en las tablas de doble entrada el valor de t correspondiente, por una parte a la probabilidad deseada y, por otra, a la suma de los grados de libertad de las dos series de medidas, es decir $n_A + n_B - 2$.

Se calcula el valor del producto $\sqrt{d} \times t_p$ para cada una de las probabilidades que se desee.

Discusión.

Si el valor del producto calculado es mayor que d , las dos medias no son significativamente diferentes en el nivel de probabilidad considerado.

Si el valor del producto calculado es menor o igual que d , las dos medias son - -

significativamente diferentes en el nivel de probabilidad considerado.

2. 7. 5. a. 3.- Intervalo de confianza de la -
media.

El estudio del intervalo de confianza de la media, nos lleva a tener la seguridad de que la media se encuentra entre ese intervalo con una seguridad prefijada, que suele ser generalmente tomado el 95 y 99%, quedando entonces las - probabilidades de que no se encuentre de un 5 y de un 1%, respectivamente.

El intervalo se puede utilizar para dar límites de valores normales, superior e inferior, o para ver si los valores que se han calculado experimentalmente están dentro de cifras normales conocidas para esos ensayos o experiencias, de modo que podemos considerar que esta parte de estudio estadístico es importante para tener la confianza de que en esa oscilación de - la media es por donde discurre la normalidad, mientras que la desviación estadísticamente - significativa, nos daría un estado anormal o - patológico en nuestro caso.

Los cálculos se realizan como sigue:

Se calcula, en primer lugar, la desviación standard, según la fórmula:

$$S_m = \frac{\sqrt{\quad}}{\sqrt{n-1}}$$

donde $\sqrt{\quad}$ = desviación típica y n = número de muestras, que como son en nuestro caso menos de 30, hay que emplear $n-1$.

La media \bar{m} se calcula con los datos obtenidos experimentalmente, como ya es conocido, y entonces se aplica la fórmula

$$\bar{m} \pm t_{0,05} S_m \quad \text{ó la}$$

$\bar{m} \pm t_{0,01} S_m$ según se quiera el 95 ó el 99% respectivamente, teniendo así el intervalo de confianza.

Los valores de la t lo obtenemos de las tablas de doble entrada de Student.

Lógicamente, cuanto mayor queramos que sea la probabilidad de que se encuentre la media dentro de ese intervalo, mayor será éste.

2. 7. 6.- Técnicas de histología animal.

2. 7. 6. a.- Obtención de las piezas.

Una vez que el animal ha sido anestesiado y extraída su sangre, se hace una laparotomía y se extraen el hígado y los riñones, depositándose en -- unas cápsulas de vidrio para, posteriormente, tomar las porciones que se van a fijar para procesar las.

2. 7. 6. b.- Fijación de las piezas.

Para fijar las piezas se utilizó la solución - de Carnoy, cuya composición es la de etanol absoluto, cloroformo y ácido acético glacial en la proporción 6:3:1, respectivamente.

Las piezas se mantuvieron en esta solución unas seis horas, y después hasta el proceso siguiente - se mantuvieron en alcohol etílico de 70°.

2. 7. 6. c.- Deshidratación de las piezas.

Iniciado el proceso de deshidratación, se mantuvieron durante dos horas en alcohol etílico de - 70°, a continuación, durante una hora, en alcohol

etílico de 80º, después, en alcohol etílico de - 90º durante otra hora y, por último, durante 5 - horas en alcohol etílico absoluto, cambiando cada vez de recipiente.

A continuación, y cambiando siempre de recipiente, se tienen en los productos y tiempos que se relacionan:

- Alcohol etílico absoluto..... 1 h.
- Etanol benceno (1:1)..... 1 h.
- Benceno puro..... 1 h.
- Benceno puro..... 1 h.
- Benceno-parafina (2:1) a 40ºC..... 4 h.
- Parafina líquida de p.f. 56-58ºC..... 1 h.
- Parafina líquida de p.f. 56-58ºC..... 1 h.

2. 7. 6. d.- Inclusión de las piezas.

Del recipiente anterior se pasan las piezas a otro con forma especial que contiene parafina líquida y se sumergen las piezas, procurando que la cara que va a ser cortada posteriormente quede mirando hacia el fondo; se dejan enfriar y los bloques resultantes se guardan en nevera.

2. 7. 6. e.- Obtención de los cortes.

Los cortes se obtuvieron con un microtomo de -
parafina-congelación, marca JUNG, AG, dando un gro-
sor al corte de 4 micras.

Con el fin de que el corte salga lo más unifor-
me posible, se procura que los bloques tengan la -
forma prismática, pudiéndose, de esa forma, obtener
series de cortes y es más sencillo observarlos al
microscopio.

Antes de poner los bloques en el soporte del -
microtomo, es conveniente que estén lo más fríos -
posible, de modo que una vez tallados en forma --
prismática, se meten en el congelador de una neve-
ra por lo menos durante 2 ó 3 horas, después se mo-
ja la cara de corte con un poco de agua y se pro--
cede a cortar, de esa manera evitamos en gran medi-
da el astillamiento de la pieza al ser cortada por
la cuchilla del microtomo.

2. 7. 6. f.- Desparafinación y tinción de los cor-
tes. Montaje de los mismos.

Una vez que se han obtenido las series de cor-
tes, se pasan con ayuda de una aguja histológica -

y un pincel a un baño que contiene agua a la temperatura de 30-35°C.

El fondo del baño es negro con el fin de poder identificar los cortes que flotan en el agua.

En el agua caliente los cortes se estiran y es más fácil recogerlos en los portaobjetos.

Los portaobjetos están impregnados de una fina película de albúmina de huevo por la cara donde se van a situar los cortes, con el fin de que los mismos se fijen y no sean arrastrados al desparafinarlos y teñirlo por las soluciones correspondientes.

Cuando estos se han secado, y sin esperar mucho tiempo para que no haya retracciones, se procede a la desparafinación y tinción con hematoxilina-eosina, pasando por unas cubetas apropiadas que contienen las soluciones y los colorantes que a continuación se detallan, permaneciendo exactamente el tiempo que se indica:

- Xilol..... 10 min.
- Xilol..... 10 min.
- Xilol-etanol (1:1)..... 3 min.
- Etanol absoluto..... 3 min.

- Etanol 95%..... 3 min.
- Etanol de 70%..... 3 min.
- Hematoxilina..... 8 min.
- Agua..... 2 min.
- Agua..... 1 min.
- Eosina 0,5%..... 2 min.
- Agua..... 2 min.
- Agua..... 1 min.
- Etanol 70%..... 3 min.
- Etanol 95%..... 3 min.
- Etanol absoluto..... 3 min.
- Etanol-xilol (1:1)..... 5 min.
- Xilol..... 5 min.

A continuación se monta la preparación en Balsa
mo del Canadá, poniendo una gota del mismo sobre -
ésta y cubriéndola con un cubreobjetos, teniendo -
la precaución de que no quede ninguna burbuja de
aire que podría ser motivo de mala interpretación.

3.- RESULTADOS.

3. 1.- RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS.

En la figura 5 se muestran las gráficas de la evolución de la carga microbiana en la trucha irradiada y en la testigo, siendo dicha gráfica la media de los valores obtenidos al analizar las 80 muestras utilizadas en nuestro trabajo, con ocho lotes de irradiados-testigo, compuestos de cinco mitades de trucha cada uno, que servían para los análisis de los controles semanales.

En la Tabla II se ven los valores medios de la carga microbiana, en cada momento del análisis, practicado en su día con la cámara cuentacolonia y en la Tabla II-bis, los valores individuales de cada conjunto de medidas.

Como se puede observar en ellas, el crecimiento de gérmenes es rápido en el grupo testigo durante la primera semana, llegando a tasas próximas a 10^7 ger./g., para luego estabilizarse o crecer lentamente en la siguiente semana, aumentar el crecimiento en la tercera semana de una forma muy discreta y de una forma llamativa entre la tercera y la cuarta semana.

En la trucha irradiada, como la capacidad reproductora ha sido dañada con la irradiación, los que quedan con --

- 84 -

capacidad lo hacen, pero hasta conseguir una carga microbiana equivalente a la del tercer o cuarto día del grupo testigo, han pasado veintiun días.

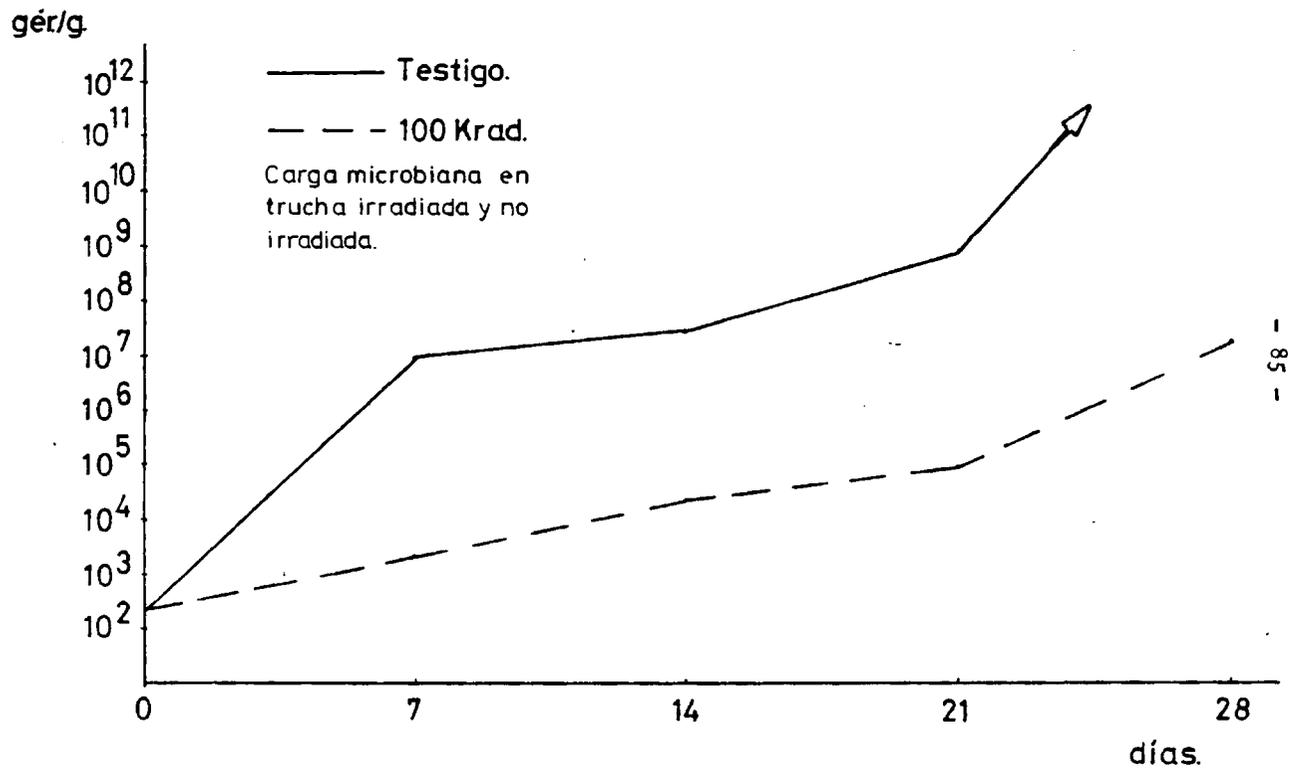


Figura 5.

- 85 -

T A B L A II

VALORES MEDIOS OBTENIDOS DE LA CARGA MICROBIANA EN
LAS TRUCHAS TESTIGO E IRRADIADAS CON 100 Krad.(1 KGy)

	Grupo testigo	Grupo 100 Krad.
0 días	-----3,6 x 10 ² gér./g.-----	
7 días	10 ⁷ gér./gr.	3,1 x 10 ³ gér/g.
14 días	5 x 10 ⁷ gér./g.	3,3 x 10 ⁴ gér./g.
21 días	10 ⁹ gér./g.	9,2 x 10 ⁴ gér./g.
28 días	más de 10 ¹² gér./g.	3,2 x 10 ⁷ gér./g.

T A B L A II-bis

VALORES INDIVIDUALES OBTENIDOS DE LAS CARGAS MICROBIANAS EN -
TRUCHA TESTIGO E IRRADIADAS CON 100 Krad. (1 KGy).

	Testigo	100 Krad
0 días	39,38,37,40,32,31,30,41 Todos por 10	
7 días	96,94,103,101,106, 98,100,102. Todos x 10 ⁵	340,320,310,269,281, 292,278,380 Todos x 10
14 días	48,47,52,51,53, 49,50,51 Todos x 10 ⁶	370,360,310,282,288, 350,340,340. Todos x 10 ²
21 días	97,93,102,102,104, 100,96,106 Todos x 10 ⁷	88,89,92,96,93,87, 99,92. Todos x 10 ³
28 días	más de 10 ¹² gér/g.	320,360,350,300,281,299, 330,320. Todos x 10 ⁵

La identificación de gérmenes realizada con los métodos ya descritos, nos arrojó los mismos resultados que a otros autores (Hussain, A 1.76. Ehlermann, D 1.969), haciéndose notar la ausencia de gérmenes del tipo coli fecal.

Las colonias encontradas en nuestros medios eran redondeadas unas, otras irregulares, de coloración variable, -- predominando, la mayoría de las veces, las incoloras, aunque aparecían en todas las ocasiones, en mayor o menor número, las de color amarillento, anaranjado y rosáceo.

Tomando las muestras pertinentes para observarlas al microscopio, nos encontramos con lo siguiente:

De las colonias no pigmentadas salían bacilos gram-negativos, de pequeño tamaño, que nosotros identificamos como Achromobacter y Pseudomonas.

De las colonias pigmentadas encontramos una diversidad de gérmenes, bacilos gram-positivos, identificados como - Lactobacillus; cocos gram-positivos, identificados como - Micrococcos y bacilos gram-positivos, de colonias en enjambre, identificados como Proteus.

3. 2.- RESULTADOS DEL N.B.V.T.

Paralelamente al crecimiento de gérmenes, aumenta la cantidad de nitrógeno básico volátil total, como se muestra en la figura 6, pudiéndose observar en la misma, como dicho aumento es notablemente más alto en la trucha no irradiada, alcanzándose niveles inaceptables de comestibilidad de la misma, antes de la primera semana, no ocurriendo así con las truchas irradiadas, cuyos aumentos son prácticamente paralelos, llegando hasta la tercera semana con un buen nivel de aceptabilidad. Tablas III y III-bis.

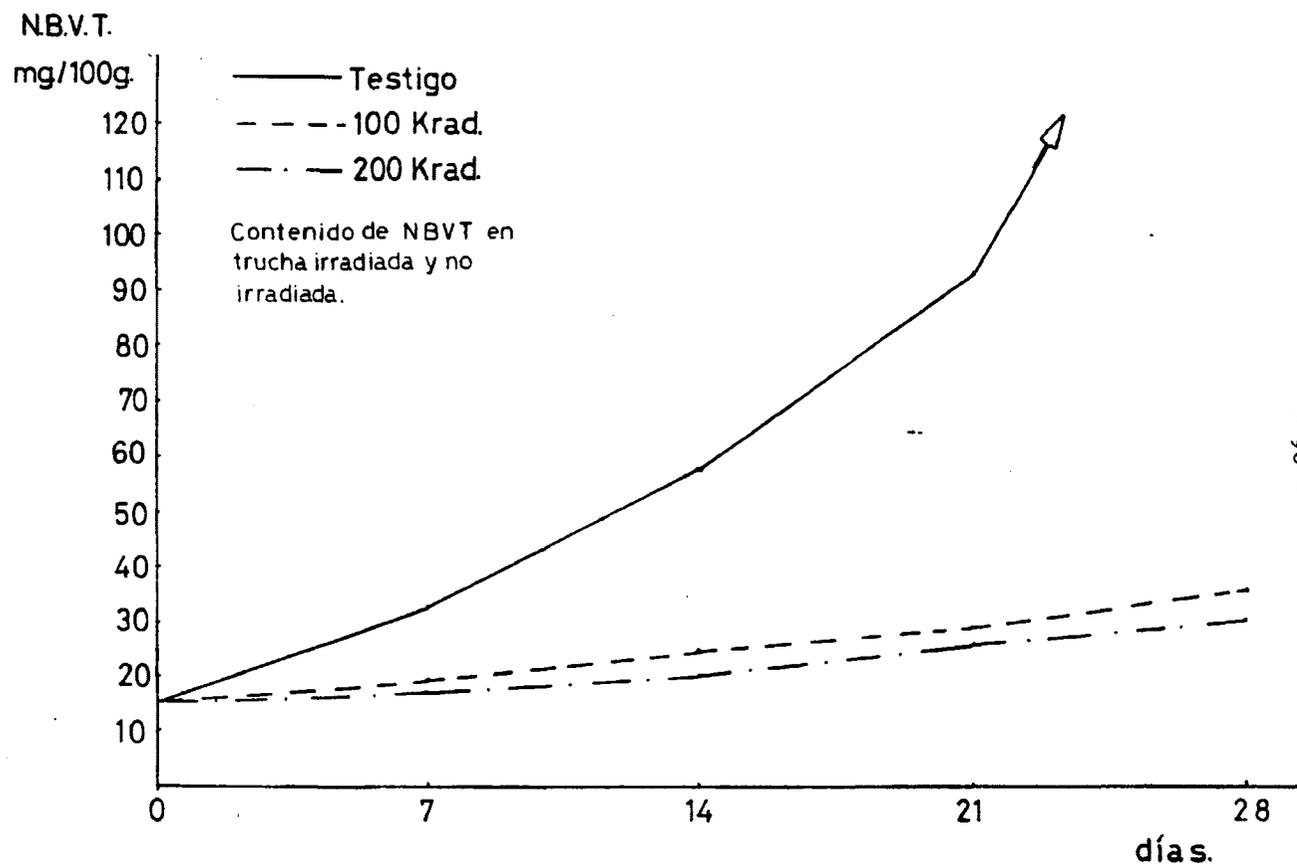


Figura 6.

T A B L A I I I

VALORES MEDIOS DE N.B.V.T. OBTENIDOS EN LOS
ANALISIS EFECTUADOS EN mg./100 g. DE MUSCULO

	<u>Grupo testigo</u>	<u>Grupo 100 Krad.</u>	<u>Grupo 200 Krad.</u>
0 días	-----	15,13	-----
7 días	31,94	18,49	16,81
14 días	57,16	23,53	20,17
21 días	92,47	28,58	25,21
28 días	----	35,30	30,26

T A B L A III-bis

N.B.V.T	Testigo	100 Krad	200 Krad
0 días	15,31 17,48 15,76 14,29 15,40 14,90 15,83 14,06	$\sqrt{n-1} = 0,65$ $\bar{x} = 15,13$ C.V. = 4,34%	
7 días	30,96 31,83 32,45 33,01 31,40 32,17 32,03 31,69	$\sqrt{n-1}=0,63$ $\bar{x} = 31,94$ C.V.= 1,97%	19,23 18,16 17,14 17,90 19,10 18,00 19,23 19,17
14 días	58,03 57,90 56,87 56,42 57,34 56,92 56,30 57,54	$\sqrt{n-1}=0,64$ $\bar{x} = 57,16$ C.V.=1,12%	17,23 16,94 15,98 16,20 17,10 16,43 17,56 17,04
21 días	93,30 91,80 92,41 92,62 92,73 92,12 93,07 91,73	$\sqrt{n-1}=0,57$ $\bar{x} = 92,47$ C.V.=0,61%	22,97 23,81 23,60 22,15 23,72 22,56 24,49 24,93
28 días	— —	$\sqrt{n-1}=0,60$ $\bar{x}=35,30$ C.V.=1,70%	21,03 20,12 19,87 19,93 19,45 20,97 20,43 19,54

Valores individuales del N.B.V.T. con $\sqrt{n-1}$, \bar{x} y C.V.

3. 3.- RESULTADOS BIOQUIMICOS.

En las Tablas IV, V y VI, aparecen los valores medios obtenidos en los análisis practicados en el músculo de -- los diferentes lotes de truchas, y en la figura 7 las gráficas correspondientes a esos valores.

La composición de aminoácidos protéicos no es alterada por las dosis de irradiación empleadas por nosotros, - como puede apreciarse en la figura 7, pues las tres gráficas se superponen prácticamente. Las ligeras variaciones que se aprecian son debidas a diferentes factores, - como el error del aparato de medida, el error cometido al pesar las muestras, el error cometido al prepararlas, la zona del músculo del que se obtuvieron dichas muestras, - etc.

T A B L A IV

VALORES MEDIOS OBTENIDOS DE LOS AMINOACIDOS PROTEICOS DEL MUSCULO DE LA TRUCHA SIN IRRADIAR.

	<u>Peso molecular</u>	<u>mg. de aa.</u> <u>100 mg. de m.b.</u>	<u>% de aa.</u>
Lis.	146,19	3.912	9,08
His.	155,16	1.608	3,72
NH ₃	17,03	728	1,69
Arg.	174,21	2.572	5,96
Asp.	133,11	5.056	11,77
Treo.	119,12	2.668	6,21
Ser.	105,10	2.348	5,48
Glu.	147,14	6.468	15,05
Pro.	115,14	1.836	4,27
Gli.	75,07	1.860	4,37
Ala.	89,10	1.956	4,54
Val.	117,50	2.112	4,86
Met.	149,22	832	1,91
Ileu.	131,18	2.304	5,36
Leu.	131,18	3.408	7,91
Tir.	181,20	1.444	3,33
Fen-a	165,20	1.844	4,29
	Total.....	42.956	

T A B L A V

VALORES MEDIOS OBTENIDOS DE LOS AMINOACIDOS PROTEICOS
DEL MUSCULO DE LA TRUCHA IRRADIADA CON 100 KRAD.(1 KGy)

	Peso molecular	<u>mg. de aa.</u> 100 mg. de m.b.	% de aa.
Lis.	146,19	3.800	10,00
His.	155,16	1.796	4,79
NH ₃	17,03	624	1,63
Arg.	174,21	2.436	6,27
Asp.	133,11	3.992	10,38
Treo.	119,12	1.996	5,18
Ser.	105,10	1.804	4,71
Glu.	147,14	5.704	14,87
Pro.	115,14	1.424	3,71
Gli.	75,07	1.828	4,77
Ala.	89,10	1.708	4,44
Val.	117,50	2.156	5,62
Met.	148,22	952	2,47
Ileu.	131,18	1.836	4,80
Leu.	131,18	2.936	7,66
Tir.	181,20	1.376	3,59
Fen-a.	165,20	1.912	4,98
Total.....		38.280	

T A B L A VI

VALORES MEDIOS OBTENIDOS DE LOS AMINOACIDOS PROTEICOS
DEL MUSCULO DE LA TRUCHA IRRADIADA CON 200 Krad (2 KGy)

	Peso molecular	<u>mg. de aa.</u> 100 mg. de m. b.	% de aa.
Lis.	146,19	2.738,81	9,39
His.	155,16	1.309,62	4,56
NH ₃	17,03	499,40	1,76
Arg.	174,21	1.793,62	6,12
Asp.	133,11	3.158,22	10,78
Treo.	119,12	1.545,48	5,27
Ser.	105,10	1.405,77	4,81
Glu.	147,14	4.327,70	14,72
Pro.	115,14	963,85	3,28
Gli.	75,07	1.377,77	4,71
Ala.	89,10	1.323,55	4,52
Val.	117,50	1.659,55	5,63
Met.	149,22	621,18	2,09
Ileu.	131,18	1.505,92	5,17
Leu.	131,18	2.310,96	7,93
Tir.	181,20	1.107,70	3,80
Fen-a.	165,20	1.515,55	5,36
	Total.....	29.164,65	

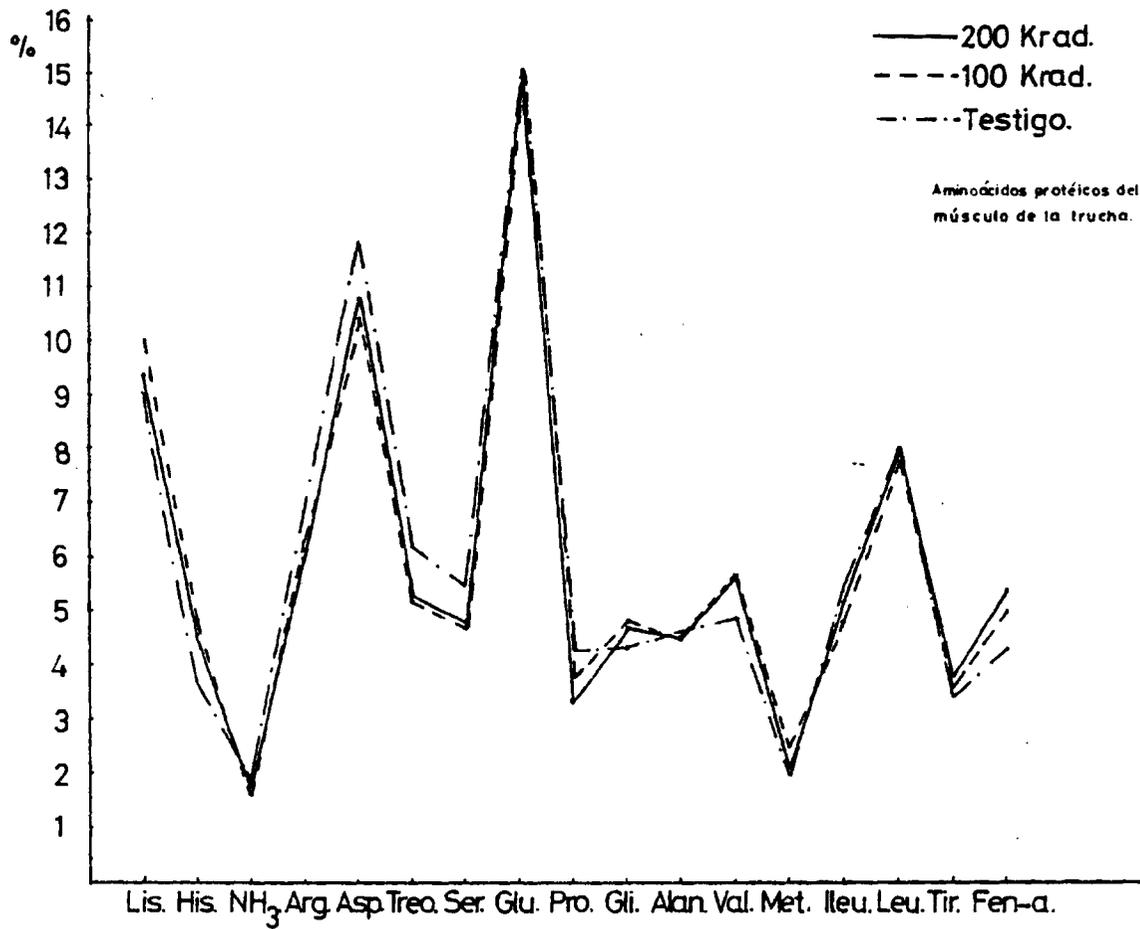


Figura 7.

3. 4.- RESULTADOS EN LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

Los animales pesaban al iniciar la experiencia, unos - 60 g. y al terminarla, un mes después, el lote control pesaba una media de 229 g., el lote testigo, una media de - 198 g., el lote 100 una media de 190 g. y, por último, el lote 200 una media de 198 g., habiendo pocas oscilaciones entre los animales del mismo lote.

No se detectó intoxicación de ningún tipo, ni se produjo ninguna baja durante el tiempo que duró la experiencia, así como ningún cuadro patológico en ninguno de los animales de dichos lotes.

3. 4. 1.- Resultados de las pruebas hemáticas.

Los hemogramas realizados en todos los animales, mostraron una normalidad absoluta, como se muestra - en la Tabla VII, no evidenciándose infecciones por la fórmula leucocitaria y la velocidad de sedimentación globular.

3. 4. 2.- Resultados de las pruebas bioquímicas.

Los valores de las transaminasas aparecen en las - Tablas comprendidas entre la VIII y la XI, y los de - los estudios estadísticos, en las Tablas comprendidas

entre la XII y la XXV, y cuya explicación de las mismas se hará oportunamente, en la discusión de los resultados.

T A B L A VII

VALORES MEDIOS DE LOS HEMOGRAMAS OBTENIDOS AL ANALIZAR
LA SANGRE DE LOS ANIMALES DE LOS DIFERENTES GRUPOS.

	<u>Grupo testigo</u>	<u>Grupo 100</u>	<u>Grupo 200</u>
Hematíes	6.910.000	7.360.000	6.440.000
Leucocitos	7.169	10.195	8.435
Hematocrito	61,5%	64,5%	56,5%
Hemoglobina	13,9	15,1	12,3
Vol. celular	90,5	90,5	91
V.S.G.1ª h.	1 mm.	1 mm.	1 mm.
V.S.G.2ª h.	1 mm.	1 mm.	1 mm.
V.S.G.24 h.	3 mm.	3 mm.	3 mm.
I. de Katz	1	1	1
Polimorfonucle	12%	20%	21%
Linfocitos	68%	68%	65%
Monocitos	4%	1%	2%
Eosinófilos	1%	0	0
Basófilos	15%	11%	12%

T A B L A VIII

VALORES OBTENIDOS DE LAS TRANSAMINASAS
EN RATAS CONTROL, EN mUI/ml.

<u>SGPT</u>	<u>SGOT</u>
27,56	30,88
25,33	39,77
17,6	30,86
16,87	39,61
27,83	32,36
24,78	40,01
21,37	31,27
24,50	37,32
23,61	35,31
26,42	36,43

T A B L A IX

VALORES OBTENIDOS DE LAS TRANSAMINASAS
EN RATAS TESTIGO, EN mUI/ml.

<u>SGPT</u>	<u>SGOT</u>
17,94	33,82
19,99	26,52
11,92	29,99
13,59	23,54
17,07	35,15
10,42	37,16
15,32	32,11
17,21	31,12
19,98	33,24
17,20	29,98

T A B L A X

VALORES OBTENIDOS DE LAS TRANSAMINASAS EN RATAS
ALIMENTADAS CON TRUCHA IRRADIADA CON 100 Krad.,
EN mUI/ml.

<u>SGPT</u>	<u>SGOT</u>
30,12	29,41
30,66	36,36
21,92	29,41
21,25	24,17
19,73	33,91
25,97	23,80
16,08	26,66
21,45	36,30
27,41	23,81
27,42	25,59

T A B L A X I

VALORES OBTENIDOS DE LAS TRANSAMINASAS EN RATAS
ALIMENTADAS CON TRUCHA IRRADIADA CON 200 Krad.,
EN mUI/ml.

<u>SGPT</u>		<u>SGOT</u>
23,84		30,88
33,12		30,11
23,15		31,37
29,97		37,36
20,86		25,21
38,54		24,99
25,91		25,48
21,29		29,90
26,90		41,17
26,97		32,84

T A B L A XII

COEFICIENTES DE VARIABILIDAD (C.V.) EN %

	<u>SGPT</u>	<u>SGOT</u>
Grupo Control	16,23	10,74
Grupo Testigo	20,04	12,89
Grupo 100 Krad.	19,83	17,31
Grupo 200 Krad.	20,41	17,00

T A B L A XIII

VALORES DE LAS MEDIA \bar{x} , DESVIACIONES TIPICAS $\sqrt{n-1}$
Y VARIANZAS $\sqrt{n-1}^2$ EN EL GRUPO CONTROL.

	<u>SGPT</u>	<u>SGOT</u>
Media \bar{x}	23,59	35,38
Desviación Típica $\sqrt{n-1}$	3,83	3,80
Varianza $\sqrt{n-1}^2$	14,65	14,46

- - o o o - -



T A B L A XIV

VALORES DE LAS MEDIAS \bar{x} , DESVIACIONES TIPICAS $\sqrt{n-1}$
Y VARIANZAS Δ_{n-1}^2 EN EL GRUPO TESTIGO.

	<u>SGPT</u>	<u>SGOT</u>
Media \bar{x}	16,06	31,26
Desv. t \acute{p} . $\sqrt{n-1}$	3,22	4,03
Varianza Δ_{n-1}^2	10,39	16,27

T A B L A XV

VALORES DE LAS MEDIAS \bar{x} , DESVIACIONES TIPICAS $\sqrt{n-1}$
Y VARIANZAS Δ_{n-1}^2 EN EL GRUPO 100 Krad.

	<u>SGPT</u>	<u>SGOT</u>
Media \bar{x}	24,20	28,94
Desv. t \acute{p} . $\sqrt{n-1}$	4,80	5,01
Varianza Δ_{n-1}^2	23,04	25,10

T A B L A X V I

VALORES DE LAS MEDIAS \bar{x} , DESVIACIONES TIPICAS $\sqrt{\sigma_{n-1}}$
Y VARIANZAS σ_{n-1}^2 EN EL GRUPO 200 Krad.

	<u>SGPT</u>	<u>SGOT</u>
Media \bar{x}	26,25	30,93
Desv. t \acute{p} . $\sqrt{\sigma_{n-1}}$	5,44	5,26
Varianza σ_{n-1}^2	29,59	27,67

T A B L A X V I I

VALORES DE LA DESVIACION TIPICA \sqrt{d} DE LAS DIFERENCIAS
INTERGRUPO, Y DIFERENCIAS d , EN SGPT

	<u>\sqrt{d}</u>	<u>d</u>
Control-testigo	1,58	7,53
Control-100 Krad	1,94	0,61
Control-200 Krad	2,10	3,06

T A B L A XVIII

VALORES DE LA DESVIACION TIPICA σ_d DE LAS DIFERENCIAS INTERGRUPO, Y DIFERENCIAS d , EN SGOT.

	σ_d	d
Control-testigo	1,74	4,12
Control-100 Krad	1,99	6,44
Control-200 Krad	2,05	4,45

T A B L A XIX

VALORES DE $\sigma_d \times t_{0,05}$ Y $\sigma_d \times t_{0,01}$ EN SGPT INTERGRUPO.

	$\sigma_d \times t_{0,05}$	$\sigma_d \times t_{0,01}$
Control-testigo	3,32	4,54
Control-100 Krad	4,07	5,58
Control-200 Krad	4,41	6,04

T A B L A XX

VALORES DE $\sqrt{d} \times t_{0,05}$ Y $\sqrt{d} \times t_{0,01}$ EN SGOT INTERGRUPO.

	$\sqrt{d} \times t_{0,05}$	$\sqrt{d} \times t_{0,01}$
Control-testigo	3,65	5,00
Control-100 Krad	4,18	5,72
Control-200 Krad	4,31	5,90

T A B L A XXI

VALORES DE $t_{0,05}$ Y $t_{0,01}$ PARA 18 GRADOS DE LIBERTAD

Grados de Libertad	$t_{0,05}$	$t_{0,01}$
18	2,101	2,878

T A B L A XXII

VALORES DE LA DESVIACION STANDARD S_m EN SGPT y SGOT
EN LOS DIFERENTES GRUPOS.

	SGPT	SGOT
Grupo control	1,28	1,27
Grupo testigo	1,07	1,34
Grupo 100 Krad	1,60	1,67
Grupo 200 Krad	1,81	1,75

T A B L A XXIII

VALORES ENCONTRADOS EN LOS DIFERENTES GRUPOS PARA LOS
INTERVALOS DE CONFIANZA DE LA MEDIA, EN SGPT y PARA -
LAS PROBABILIDADES DEL 95% y 99%.

	95%	99%
Control	20,69-26,48	19,43-27,75
Testigo	13,64-18,48	12,59-19,53
100 Krad	20,59-27,81	19,00-29,40
200 Krad	22,56-30,74	20,77-32,53

T A B L A XXIV

VALORES ENCONTRADOS EN LOS DIFERENTES GRUPOS PARA LOS -
INTERVALOS DE CONFIANZA DE LA MEDIA, EN SGOT y PARA LAS
PROBABILIDADES DEL 95 y 99%

	<u>95%</u>	<u>99%</u>
Control	32,50-38,25	31,25-39,50
Testigo	28,23-34,29	26,91-35,61
100 Krad	25,17-32,71	23,52-34,36
200 Krad	26,98-34,88	25,25-36,61

T A B L A XXV

VALORES DE $t_{0,05}$ Y $t_{0,01}$ PARA 9 GRADOS DE LIBERTAD

<u>Grados de Libertad.</u>	<u>$t_{0,05}$</u>	<u>$t_{0,01}$</u>
9	2,262	3,250

3. 4. 3.- Resultados histológicos.

Los resultados histológicos se muestran en las siguientes figuras, las cuales se describen a continuación.

La figura 8 es la fotografía de una preparación para el microscopio a 1.200 aumentos y teñida con hematoxilina-eosina, de un hígado perteneciente a una rata del grupo control, es decir, de la que fué alimentada con pienso comercial. En ella se puede ver una vena centrolobulillar, en cuyo interior hay cierta cantidad de hemetfies y en la que no se aprecia ninguna lesión - así como tampoco en el tejido hepático que la rodea.

La figura 9 es una fotografía de una preparación para el microscopio de un hígado de rata, teñido también con hematoxilina-eosina y a 120 aumentos, del grupo testigo, es decir, del alimentado con trucha liofilizada, sin irradiar; en ella se pueden ver dos venas centrolobulillares y en el centro de la fotografía un espacio porta, no preseptando ninguna de estas estructuras lesión, ya que no se aprecian focos de reorganización ni de degeneración y los sinusoides y las células de Kupffer (células estrelladas), son de apariencia normal.

La figura 10 nos muestra la fotografía a 1.200 aumentos, de una preparación microscópica del hígado de una rata, teñido con hematoxilina-eosina, del grupo llamado 100 Krad., por haber sido alimentado con trucha liofilizada e irradiada con esta dosis. En ella se puede ver una porción de una vena centrolobulillar en cuyo interior hay hematíes y en la que no se evidencia ninguna lesión, así como tampoco en el tejido hepático que aparece en dicha fotografía rodeando a la vena.

La figura 11 es una fotografía de una preparación microscópica a 1.200 aumentos de un hígado de rata, teñido también con hematoxilina-eosina, del grupo llamado 200 Krad., en la que aparece una porción de una vena centrolobulillar, en cuyo interior se pueden observar hematíes, no apreciándose ninguna lesión en la misma, así como tampoco en el tejido hepático que la rodea.



Fig. 8.- Vena centrolobulillar del hígado de una rata perteneciente al grupo Control. Hematoxilina-eosina 1.200x.

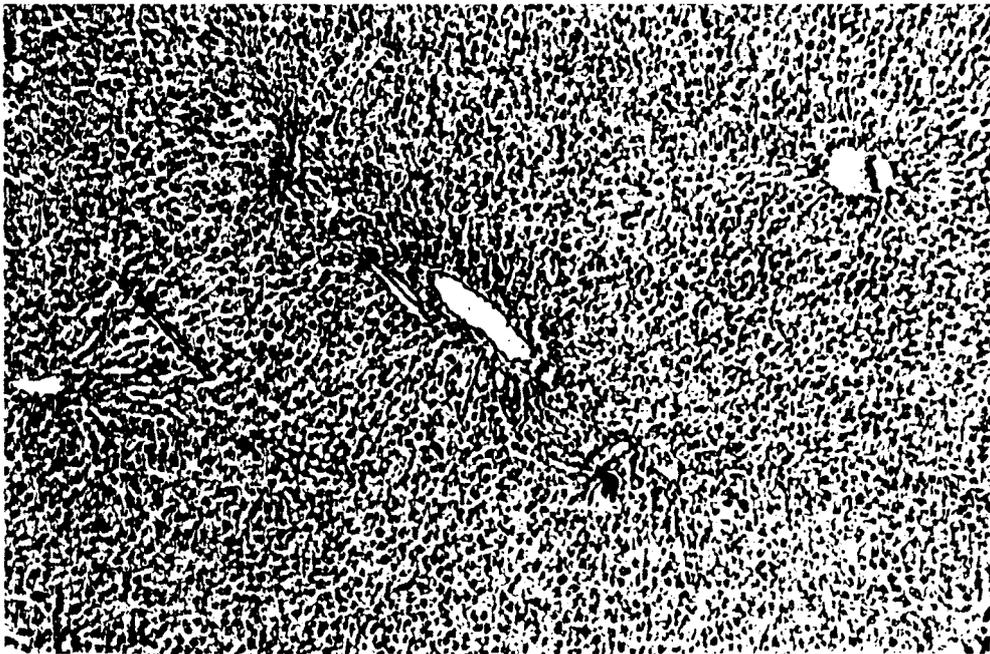


Fig. 9.- Hígado de rata perteneciente al grupo testigo. Hema
toxilina-eosina. 120 x.

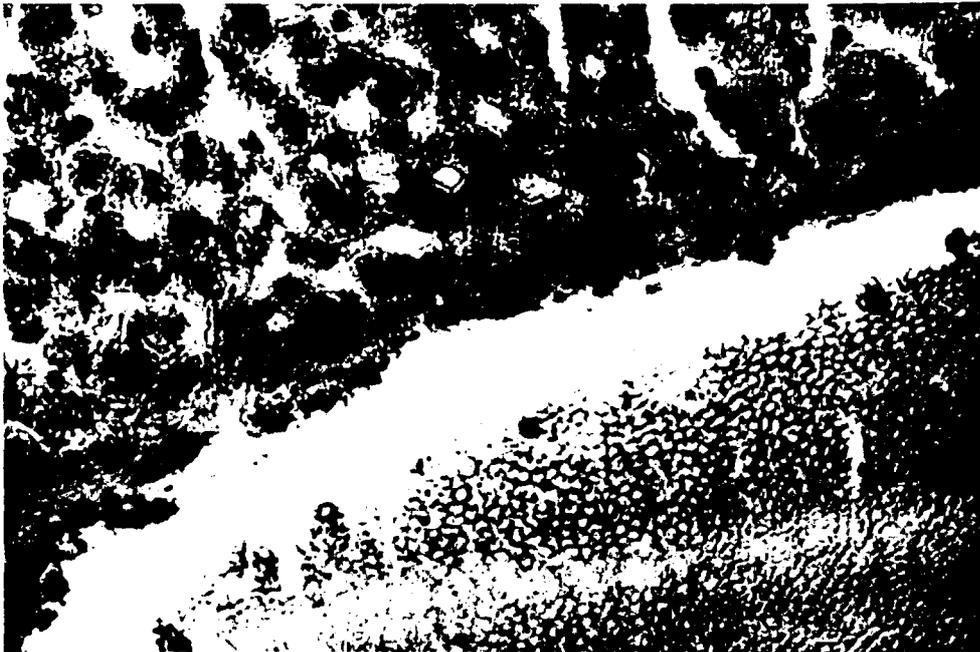


Fig. 10.- Vena centrolobulillar del hígado de una rata perteneciente al grupo 100 Krad. Hematoxilina-cosina. 1200x.

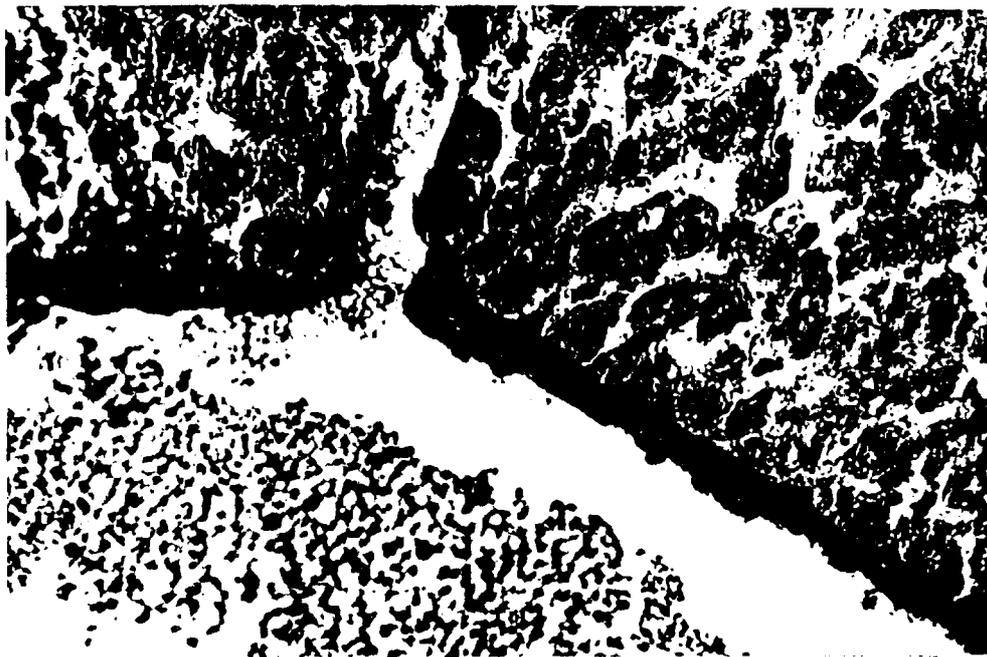


Fig. 11.- Vena centrolobulillar del hígado de una rata perteneciente al grupo 200 Krad. Hematoxilina-eosina - 1.200x.

Las figuras 12 y 13, son fotografías de preparaciones para el microscopio, a 1.200 aumentos, de riñones de rata, teñidos con hematoxilina-eosina, pertenecientes al grupo control, siendo la primera de la zona glomerular y la segunda de la zona tubular.

En la primera figura podemos observar dos glomérulos, con una densidad normal de células, apreciable por los núcleos teñidos, sin signos de inflamación, pudiéndose observar también las cápsulas de Bowman -- normales en cuanto a estructura, separación del glomérulo y tamaño.

En la segunda figura mencionada, se pueden apreciar los túbulos renales, con las células de los mismos y los núcleos de estas perfectamente teñidos; no hay desprendimiento de la capa epitelial que los tapiza, siendo los espacios de tamaño normal. No hay evidencia de inflamación ni de otra lesión.

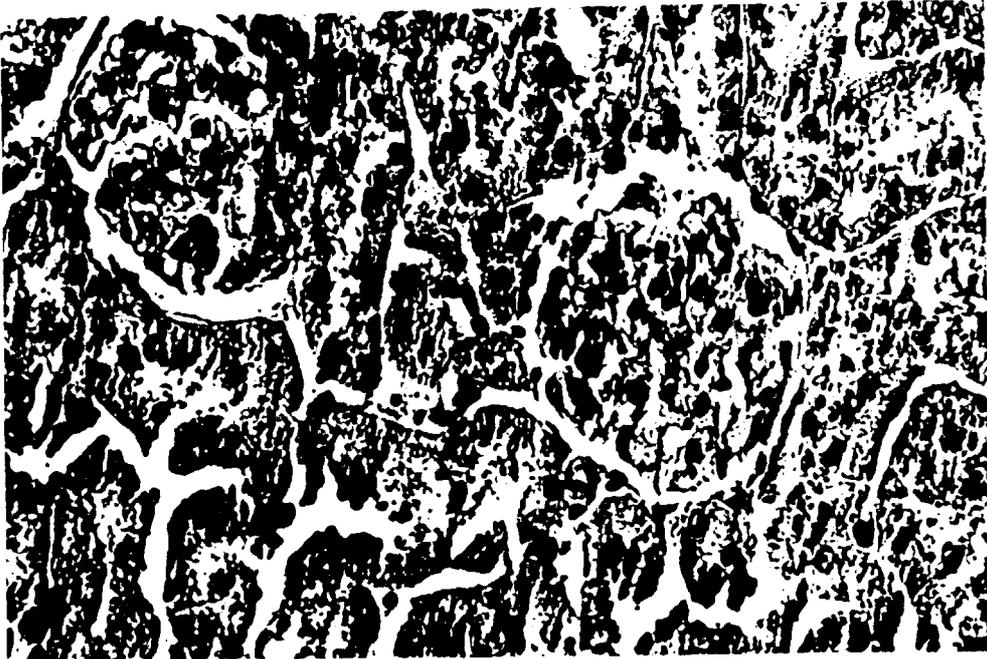


Fig. 12.- Glomérulos del riñón de una rata, perteneciente al grupo control.- Hematoxilina-eosina 1200x.

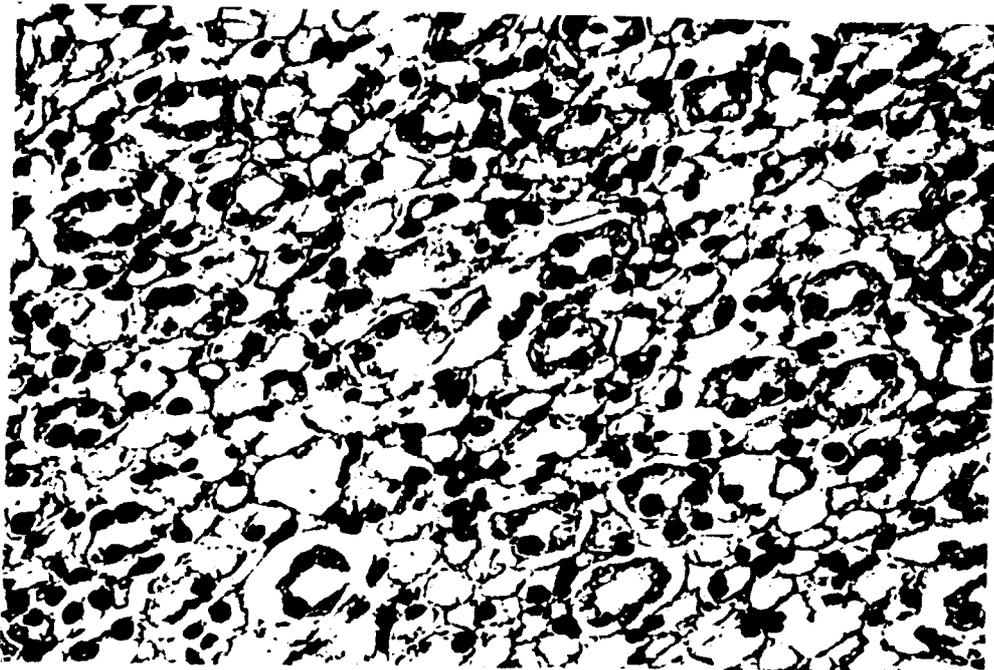


Fig. 13.- Zona tubular de un riñón de rata, perteneciente al grupo control. Hematoxilina-eosina. 1.200x.

La figura 14, es la fotografía de una preparación para el microscopio, a 1.200 aumentos, de un riñón de rata, teñido con hematoxilina-eosina, del grupo testigo, en la que aparece en el centro de la imagen un -- glomérulo mostrando una densidad normal de células, - apreciándose por los núcleos teñidos, una cápsula de Bowman normal en cuanto a tamaño y separación del glomérulo y no evidenciándose lesión en esta estructura ni en el resto del tejido que aparece en dicha fotografía de la preparación.

La figura 15, al igual que la anterior, es una - fotografía de una preparación para el microscopio, a 1.200 aumentos, de un riñón de rata, teñido con hematoxilina-eosina, del grupo denominado 100 Krad., también pertenece a la zona glomerular del riñón y al - igual que en la anterior, no se aprecian alteraciones patológicas, ya que hay una densidad normal de células en los glomérulos, separación normal de la cápsula de Bowman y resto del tejido normal, al no haber signos de inflamación, destrucción de estructuras ni alteración de las mismas.

La figura 16, es también una fotografía de una - preparación para el microscopio, a menos aumentos - que las anteriores, 120 x., de un riñón de rata, teñido con hematoxilina-eosina, perteneciente al grupo

denominado 200 Krad., en la que se nos muestra una zona glomerular, apreciándose que la densidad, tamaño, cápsula de Bowman y resto del tejido renal, son normales, ya que no aparecen signos de inflamación, reorganización, etc. en dichas estructuras.

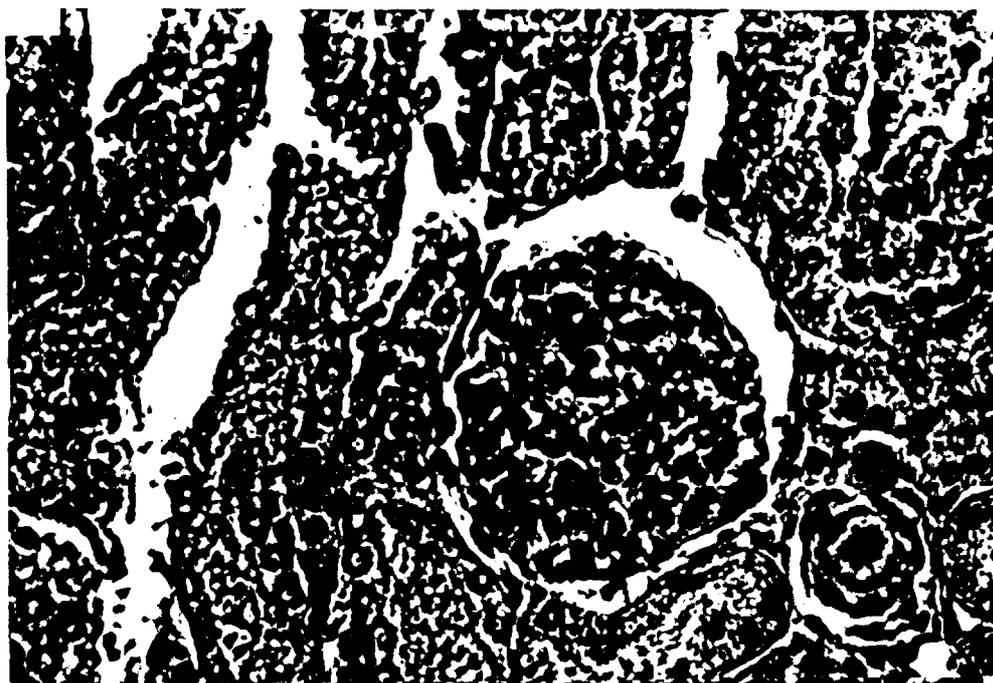


Fig. 14.- Glomérulo del riñón de una rata perteneciente al grupo testigo. Hematoxilina-eósina. 1.200x.

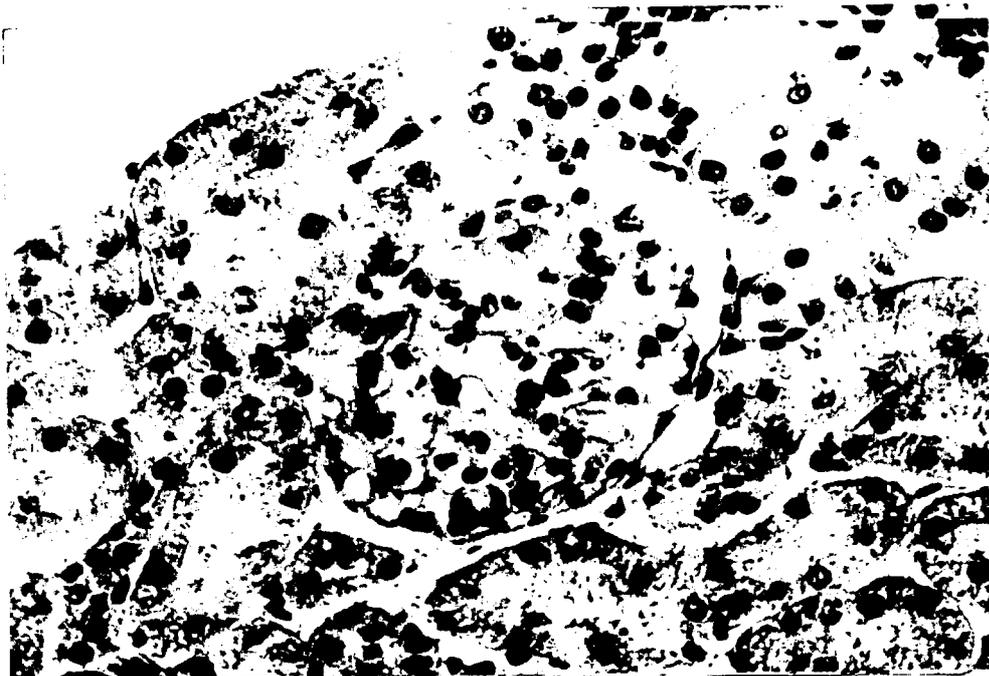


Fig. 15.- Glomérulo del riñón de una rata perteneciente al grupo 100 Krad. Hematoxilina-eosina. 1.200x.

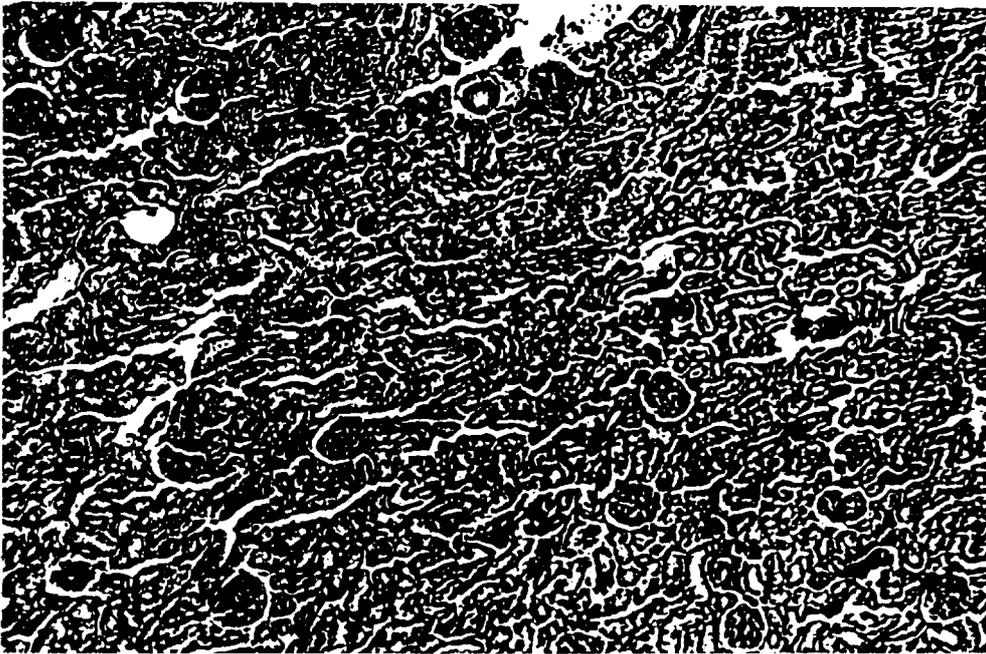


Fig. 16.- Zona glomerular del riñón de una rata perteneciente al grupo 200 Krad. 120x.

4.- DISCUSION.

4. 1.- DISCUSION DE LOS RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS.

A la vista de los resultados de las experiencias realizadas, podemos decir que la irradiación actúa frenando el crecimiento de gérmenes y la explicación es muy sencilla. Los gérmenes, que están en superficie, es decir sobre la piel, crecen en esta de forma rápida, para entretecerse su crecimiento a continuación, hasta que logran atravesar la barrera natural que forma dicha piel para después invadir el músculo y volverse a acelerar el crecimiento.

En la trucha irradiada, los gérmenes que no han perdido su capacidad reproductora, al tener menos competidores, pueden crecer en la piel sin problemas hasta atravesarla e invadir el músculo, habiendo pasado entonces un tiempo considerable, siendo precisamente este tiempo el que nosotros mantenemos la trucha fresca desde el punto de vista de carga microbiana, ya que estos gérmenes son los causantes de la putrefacción. Otros autores como Matutano, J.I. 1.968 y de la Sierra Serrano, D. 1.969, obtienen los mismos resultados en pescado blanco de mar.

Es interesante destacar, que la flora de los ejemplares no irradiados, estaba formada casi exclusivamente por Pseudomonas, Achromobacter y Proteus, con muy pocas colonias -

de Lactobacillus y Micrococcus, ocurriendo al revés en los irradiados, es decir, aparecían mas colonias de estos últimos que de los primeros, llegando a desaparecer incluso, - en algunas experiencias.

Las colonias de Proteus que han aparecido, han sido - sistemáticamente en los ejemplares adquiridos en el mercado, por lo que se podía considerar que la contaminación - por estos gérmenes es posterior a su captura, es decir -- que proviene del manejo. En los ejemplares de la misma procedencia, irradiados, no aparecían dichas colonias en los controles posteriores, por lo que podemos afirmar que este tipo de germen es sensible a la irradiación, hasta - el punto de ser destruído.

Otros gérmenes que aparecieron en alguna placa aislada consideramos que eran de contaminación exógena, ya que no se volvieron a dar en los cultivos posteriores.

En alguna ocasión hemos podido comprobar que los gérmenes encontrados eran los mismos que portaba el pienso, sobre todo en los ejemplares procedentes de la E.T.S. de Ingenieros de Montes, ya que se hizo análisis del agua y se encontraron los mismos gérmenes en el residuo de un - centrifugado de 20 cc. de dicha agua a 5.000 rpm. durante 30 minutos, que en los ejemplares y en el pienso, el cual tambien se analizó.

Otros autores, como Hussain, A y cols. 1.976, obtienen los mismos resultados en cuanto a la identificación de géneros que nosotros, los cuales hemos obtenido siguiendo a Pelczar, M.J. y Reid, R.D. 1.966. fundamentalmente y el - Technical reports series nº 104 de la I.A.E.A. 1.970, entre otros, mencionados en la bibliografía.

Por último, añadiremos que los resultados se muestran paralelos, debido a que el habitat natural y el artificial en las piscifactorías, es muy semejante como es lógico, ya que de lo que se trata es de producir sin problemas higiénico-sanitarios y por lo tanto la flora es igual en dichos medios pues de esta forma hay equilibrio.

4. 2.- DISCUSION DE LOS RESULTADOS DEL N. B. V. T.

Como ya se dijo en los resultados, paralelamente al crecimiento de gérmenes, aumenta la cantidad de N. B. V. T., como era de esperar, ya que está en función del grado de putrefacción de la trucha y éste en función del aumento de gérmenes.

Observando al figura 6, destacamos como interesante el que las gráficas de las truchas irradiadas con 100 Krad. (1 KGy) y con 200 Krad. (2 KGy) son prácticamente coincidentes, a pesar de que la dosis es del doble de la una con respecto a la otra, esto nos viene a demostrar que no se obtienen mejores resultados si se aumenta la dosis en esos límites, sin embargo el costo es mucho mayor y podría no ser económicamente rentable. Otros autores, Hussain, A. y cols. en 1.976; Ehlermann, D. y cols. en 1.969, obtuvieron prácticamente los mismos resultados que nosotros empleando dosis de hasta 400 Krad. (4 KGy), siendo con esta última dosis la diferencia un poco mayor, pero como demuestra Awad, A.A. y cols. en 1.975, aparecen cambios en los caracteres organolépticos que hacen que la trucha no sea aceptada como fresca por el test a que fué sometida.

Otros autores como Matutano, J.I. y Alonso, M. en 1.970, hicieron estudios bromatológicos en filetes de merluza irradiados a altas dosis y detectaron también alteraciones en

los caracteres organolépticos, de modo que esto hizo que no empleásemos nosotros dosis altas de irradiación.

Por otro lado, observando la tabla III - bis, vemos que los valores individuales obtenidos en cada análisis tienen poca variación unos de otros, como lo demuestra el valor de la desviación típica y el coeficiente de variabilidad, por lo que no hemos creído oportuno someter las cifras a mayores estudios estadísticos, que solo servirían para recargar el trabajo y no obtener una mayor fiabilidad de las mismas.

Las desviaciones típicas son de un valor muy pequeño y los coeficientes de variabilidad tienen unos valores, que para material biológico, son extremadamente buenos.

4. 3.- DISCUSION DE LOS RESULTADOS BIOQUIMICOS.

Las experiencias realizadas nos demuestran que la composición de los aminoácidos protéicos del músculo de la trucha, no es alterada por las dosis de irradiación empleadas por nosotros, como se puede apreciar en las gráficas de la figura 7, con lo que podemos decir que no hay proteólisis ni desaminación ó destrucción de los aminoácidos protéicos del músculo.

Samuel A. Matz, 1.962, habla de cambios en la estructura de la proteína por grandes dosis de irradiación, pero utiliza proteínas simples y no lo detecta en pescados ni con dosis del orden de 1,86 Mrad (18,6 KGy) en merluza del Pacífico, considerando que esto no se produce por ser alimento complejo, sin embargo, John F. Kircher, en 1.964, habla de posibles cambios en la estructura protéica de los alimentos irradiados con dosis menores que la precedente.

Por otro lado, la composición de los aminoácidos protéicos que dan Fritz Braunsted y Margarethe Auerbach, del músculo de la trucha, no coincide con la nuestra en cuanto a proporciones, incluso es incompleta, no mencionando el procedimiento de obtención de esos análisis, ni el momento en que se hicieron; nosotros, por el contrario hicimos numerosos análisis, todos por duplicado, no encontrando diferencias significativas en los resultados, por lo que no los sometimos a estudio estadístico, pero lo que si que

remos hacer constar es que estos se llevaron a cabo inmedia
tamente de irradiarse los ejemplares, y además, estos habían
sido sacrificados recientemente, precisamente para evitar -
el que se pudiesen producir proteolisis por gérmenes, enzi-
máticas, etc. Podemos asegurar, por tanto, que nuestros re
sultados son fiables desde este punto de vista.

4. 4.- DISCUSION DE LOS RESULTADOS EN LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

Como se puede ver en los resultados, el lote control - tuvo mayor aumento de peso, esto es debido, a que a igualdad de cantidad de alimento, el pienso comercial era más - completo que el que llevaba trucha liofilizada, ya que en los lotes que comían este último, solo se utilizaba el pienso comercial como corrector vitamínico mineral, de ahí - que hubiese esas diferencias, que no son demostrativas de ninguna anomalía.

4. 4. 1.- Discusión de los resultados de las pruebas hemáticas.

Las cifras obtenidas no fueron sometidas a estudio estadístico porque los resultados eran muy próximos -- unos de otros, estando dentro de los límites normales, publicados por diferentes autores como Jacotot, H., - Cerdán, S. y cols. y Cascales, M. y cols., entre otros.

Al lote control no se le sometió a estos análisis, por considerar que sus cifras coincidirían con las publicadas, al no estar sometidos los animales a ningún tipo de stress y consumir únicamente pienso comercial.

4. 4. 2.- Discusión de los resultados de las pruebas bioquímicas.

Los valores obtenidos de las transaminasas SGOT y SGPT han resultado normales, pudiéndolos comparar con los obtenidos por otros autores como Cerdán, S. y cols. y Cascales, M. y cols.

El estudio estadístico a que fueron sometidos los datos de los valores obtenidos por nosotros, no da diferencias significativas, como se puede ver en las tablas VIII, IX, X y XI, ni en el estudio comparativo in tergrupo, como explicaremos a continuación.

En primer lugar, estudiamos el grado de apreciación de las medias por medio del coeficiente de variabilidad, que como se dijo, en material biológico no debe ser superior al 20% si la muestra es homogénea. En nuestros resultados solo dos valores lo superan, pero en un grado tan pequeño, que lo podemos considerar dentro de los límites de homogeneidad. Ver tabla XII.

En segundo lugar, estudiamos el grado de significación de la diferencia de dos medias por medio de la "t" de Student y nos encontramos con lo siguiente, ver tablas XIII a XXI.

En la SGPT, al comparar el control con la testigo, nos encontramos con que los valores son altamente significativos, pero es más alto el valor del control que el del testigo, con lo que esto nos demuestra que el grupo testigo tuvo menos actividad enzimática que el grupo control.

Al comparar el grupo control con el denominado 100 Krad., los resultados no son significativos en cuanto a la \bar{d} , por lo que se puede decir que el resultado es el mismo para un lote que para otro, es decir, son homogéneos.

Igualmente, al comparar el grupo control con el denominado 200 Krad., los resultados son similares y también se puede decir que son homogéneos.

En la SGOT, comparando el control con el testigo, el valor de la \bar{d} es significativamente diferente al nivel del 95% de probabilidad y no al 99%, es decir, las medias a esos niveles de probabilidad considerados son diferentes significativamente y no diferentes respectivamente, pero la actividad enzimática es mayor en el grupo control que en el testigo.

Cuando comparamos el grupo control con el denominado 100 Krad., nos encontramos que con respecto a la \bar{d}

los resultados son altamente significativos, pero ocurre igual que en el grupo anterior, el nivel de transaminasas es bastante mayor en el grupo control que en el 100 Krad., por lo que se ve una menor actividad enzimática en este último lote.

Al comparar el grupo control con el denominado 200 Krad., nos ocurre exactamente igual que con el grupo testigo, siendo también mayor la actividad enzimática en el grupo control que en el comparado.

En definitiva podemos decir, sin más que observar detenidamente las tablas anteriores, que los niveles más bajos de transaminasas se han obtenido en los grupos que han sido alimentados con trucha, y en especial trucha irradiada, sobre todo con relación a la SGOT. Con relación a la SGPT, salvo el valor del grupo testigo, los otros grupos han dado valores muy próximos, de lo que se desprende la no toxicidad para el hígado, de la trucha irradiada utilizada como alimento.

En tercer lugar, estudiamos los intervalos de confianza de la media, y comparándolos con los valores obtenidos en los análisis de la sangre de los animales, vemos que prácticamente todos los valores están comprendidos dentro del intervalo de confianza del valor medio. Tablas XXII, XXIII, XXIV y XXV.

Así tenemos que en el grupo control, en la SGPT, - para una probabilidad del 95%, solo se salen del intervalo dos valores en el límite inferior y otros dos en el superior. Para la probabilidad del 99% solo se salen dos valores del límite inferior, ya que la cifra - 27,75 es prácticamente igual a 27,83.

Los valores que se salen en el límite inferior, son valores bajos de actividad enzimática, de modo que nos sirven para asegurar, aún más, que esos animales no padecían lesión hepática.

En cuanto a los valores que se salen por el límite superior, son tan próximos al límite, que se puede decir que son iguales, pero comparándolos con el límite superior que se da para estos animales, 80 UI/l., son también bajos.

En el mismo grupo control, con relación a la SGOT para la probabilidad del 95%, se salen fuera del límite inferior cuatro valores, y del límite superior tres, sin embargo para el valor del 99% solo se salen dos valores en el límite inferior y uno en el superior, ya - que los valores 39,61 y 39,77 los podemos considerar - iguales al valor del límite que es 39,50, valiendo la discusión del apartado anterior.

En el grupo testigo y para la SGPT, tenemos que para la probabilidad del 95% se salen dos valores por el límite inferior, ya que los valores 13,64 y 13,59 son prácticamente iguales, y otros dos por el superior, pero con poca diferencia en sus valores.

Para la probabilidad del 99%, se siguen saliendo los dos mismos valores por el límite inferior y ninguno por el superior, considerando a los valores 19,99, 19,98 y 19,53 como iguales.

Con los valores de la SGOT, para la probabilidad del 95%, tenemos que se salen del límite inferior dos valores y otros dos del superior.

Para la probabilidad del 99%, se sale solo uno del límite inferior, al considerar que los valores 26,91 y 26,52 son iguales, y uno del límite superior; como puede verse, la misma discusión de los casos anteriores vale para este grupo.

En el grupo 100 Krad., con relación a la SGPT y para la probabilidad del 95%, se salen dos valores por el límite inferior y otros dos por el superior.

Para la probabilidad del 99%, del límite inferior se sale solo un valor y del superior dos.

Para la SGOT y para la probabilidad del 95%, del valor del límite inferior se salen tres valores y del límite superior dos valores.

Para la probabilidad del 99%, del valor del límite inferior no se sale ninguno y del superior dos, pero con pocas diferencias en los mismos con relación al límite, valiendo la misma discusión.

En el grupo 200 Krad., con relación a la probabilidad del 95% en la SGPT, se salen dos valores del límite inferior y otros dos valores del límite superior.

Con relación a la probabilidad del 99%, del límite inferior no se sale ninguno, y del superior dos valores.

En cuanto a la SGOT de este mismo grupo, en lo referente a la probabilidad del 95% del límite inferior se salen tres valores y del superior dos.

En la probabilidad del 99%, del límite inferior no se sale ninguno, ya que 24,99 es igual, prácticamente, a 25,21 y a 25,25, saliéndose del límite superior dos valores.

De todo esto se desprende, que los valores que se

salen por debajo de los límites inferiores, son favorables, ya que como dijimos, hay menor actividad enzimática y, por lo tanto, no hay evidencia de lesión en el órgano estudiado.

Hemos considerado que menos de media U.I. no era diferencia y por eso hemos igualado ciertos valores. Los valores que se salen de los límites superiores, son o con poca diferencia o con cierta diferencia los menos, aún inferiores a los límites dados para los valores de las transaminasas en estos animales, como dijimos anteriormente y que no llegan ni a la mitad del valor límite que figura en las publicaciones como valores normales.

Como consecuencia de estos estudios estadísticos, podemos asegurar que no había lesión detectable enzimática en el hígado de ninguno de los animales y que, por lo tanto, el alimento consumido no lesiona dicho órgano.

4. 4. 3.- Discusión de los resultados histológicos.

A la vista de los resultados obtenidos, no se aprecian diferencias entre las preparaciones de los órganos de los diferentes grupos, tanto en las de hígado, como en las de riñón, pudiendo afirmar que todas ellas son comparables entre sí.

De todos son conocidas las diferentes funciones del hígado y debido a ello, este órgano es el que preferiblemente se estudia para detectar posibles anomalías - en el metabolismo de ciertos alimentos, al poder presentar toxicidad al ser ingeridos, o por ser tóxicos al haber sido tratados con diferentes procedimientos.

Nosotros consideramos que la trucha era prácticamente protefina al estar liofilizada y como una de las funciones de este órgano es la de la síntesis y desdoblamiento de proteínas, en caso de ser nocivas, se podría producir la alteración correspondiente y nosotros la podríamos evidenciar, por medio de las pruebas de labilidad en el suero, ya expuestas, y por medio de las correspondientes preparaciones histológicas. El resultado ha sido rotundamente negativo, por lo que podemos asegurar que la trucha irradiada no es nociva para el hígado desde el punto de vista de nuestros experimentos.

A su vez, el riñón ha de eliminar todos los metabolitos que no son aprovechables por el organismo, o los que se producen al ingerir sustancias nocivas, las cuales pueden lesionar este órgano al eliminarlas, siendo detectables estas lesiones de diferentes formas, entre las que se encuentran las preparaciones histológicas.

En nuestras preparaciones, no hay evidencia de lesión en ninguna de ellas, de modo que los metabolitos que se han producido al ingerir las truchas, no han sido lesivos para estos órganos, por lo que podemos asegurar, también, que la trucha irradiada no lesiona los riñones de los animales de experimentación que se han empleado en esta experiencia.

5.- CONCLUSIONES.

De los resultados y discusiones expuestos en los diferentes apartados del presente trabajo, se pueden deducir las siguientes conclusiones:

1ª) Que la dosis de 100 Krad (1 KGy), es suficiente para reducir la carga microbiana de la trucha, en un grado tal, que permita conservarla fresca, sin congelar, durante un tiempo - aproximadamente de tres semanas, refrigerándola entre 0 y 4°C.

2ª) Emplear dosis mayores no es conveniente, desde el punto de vista económico, ya que no se obtienen resultados más - favorables a los obtenidos con la dosis administrada por nosotros.

3ª) Dadas las características del hábitat de estos animales en las piscifactorías, en las cuales se intenta aproximar al medio natural, los gérmenes encontrados no son patógenos, - aunque son suficientes para producir la putrefacción de la trucha.

4ª) El Proteus, germen encontrado en las truchas procedentes del mercado, y que se ha considerado de contaminación exógena, desaparece completamente con la irradiación, por ser muy sensible a la misma.

5ª) Los aminoácidos protéicos del músculo de la trucha, - no son alterados por la dosis de 100 Krad (1 KGy), ni por la - dosis doble, manteniéndose las cantidades de los mismos iguales en los tres grupos analizados.

6ª) Las truchas irradiadas no han producido ninguna enfermedad de tipo toxicológico en los animales de experimentación, detectable, ni por síntomas ni por los análisis correspondientes, quedando por ello probada la inocuidad de las mismas.

7ª) La energía nuclear aplicada a la conservación de los alimentos, puede ahorrar otras fuentes de energía.

6.- BIBLIOGRAFIA.

Abad Iglesias, R. Manual de Estadística Médica. FARMAES. 140. pág. 252. 1.977. Ed. C.E.P.A.S.A. Madrid.

Adamiker, D. A comparison of various methods for treating feed stuffs for laboratory animals. Food Irradiation Information. 5 pág. 19. Nov. 1.975. Published by International Project in the Field of Food Irradiation. Institut für Strahlentechnologie. 75 Karlsruhe. Alemania.

Addison, W.H.F. Histologic Methods Adapted for Rat Tissues, en The Rat in Laboratory Investigation. pág. 453. 1.971. Hafner - Publishing Company. New York.

Alonso, M y Matutano, J.I. Conservación de alimentos por irradiación. XV. Estudios bromatológicos, bioquímicos y organolépticos de filetes de merluza. 1.970. V Semana Nacional Veterinaria de Santiago de Compostela.

Amlacher, E. Rigor Mortis in Fish, en Fish as Food. I. pág.386 1.961. New York Academic Press.

Anónimo. Radiation Dosimetry. X Rays and Gamma Rays with Maximum Photon Energies Between 0,6 and 50 Mev. Report 14. ICRU. - sep. 1.969.

Anónimo. Recommended Methods for the Microbiological Examination of Foods. 1.966. 2th. Edition. American Public Health Association, Inc. New York.

Anónimo. Microorganisms in Foods. 1.968. University of Toronto Press. Canadá.

Anónimo. The OXOID Manual of Culture Media. 1.976. 3th. Edition.

Anónimo. DIFCO Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiological and Clinical Laboratory Procedures. 1.953. 9th. Edition.

Anónimo. Training Manual on Food Irradiation Technology and Techniques. Technical reports series, nº 114. 1.970. IAEA. VIENNA. Austria.

Anónimo. Progress in Food Irradiation. Food Irradiation Information. 4. pág. 38. Marzo 1.975. Published by International Project in the Field of Food Irradiation. Institut für Strahlentechnologie. 75 Karlsruhe. Alemania.

Anónimo. Progress in Food Irradiation. Food Irradiation Information. 6. pág. 53. Junio 1.976. Published by International Project in the Field of Food Irradiation. Institut für Strahlentechnologie. 75 Karlsruhe. Alemania.

Anónimo. Food preservation by irradiation -report of an International Symposium. Food Irradiation Information. 8. pág. 41. Feb. 1.978. Published by International Project in the Field of Food Irradiation. Institut für Strahlentechnologie. 75 Karlsruhe. Alemania.

Anónimo. Progress in Food Irradiation. Food Irradiation Information. 9. pág. 75. Dic. 1.978. Published by International Project in the Field of Food Irradiation. Institut Strahlentechnologie. 75 Karlsruhe. Alemania.

Anónimo. Microbiological problems in food preservation by irradiation. 1.967. IAEA. VIENA. Austria.

Anónimo. Laboratory Training Manual on the Use of Nuclear Techniques in Animal Research. Technical reports series, nº 193. - pág. 297. 1.979. IAEA. VIENA. Austria.

Anónimo. Microbiological Specifications and Testing Methods -- for Irradiated Food. Technical reports series, nº 104. pág 180. 1.970. IAEA. VIENA. Austria.

Anónimo. Techniques in Amino-acid analysis. 1.971. Technicon - International Division. Ginebra. Suiza.

Anónimo. Tablas científicas. 1.965. 6ª edición. Documenta Geigy. Basilea. Suiza.

Anónimo. Selected Topics in Radiation Dosimetry. pág. 325. 1.961
IAEA. VIENA. Austria.

Attix, F. y Tochilin, E. Radiation Dosimetry. III. pág. 897. -
1.969. 2th. Edition. New York Academic Press.

Awad, A.A. and Diehl, J.F. Physical Changes in Irradiated Trout
(*Salmo gairdneri*). Journal of Food Science. 40. pág. 319. 1.975.

Bacq, Z.M. y Alexander, P. a) Fundamentos de Radiobiología. pág.
17. 1.964. Editorial Acribia. Zaragoza.

Bacq, Z.M. y Alexander, P. b) pág. 202.

Bacq, Z.M. y Alexander, P. c) pág. 272.

Baldrati, G. Porretta, A. Casolari, A. y Cagna, D. Impiego de-
lle radiazioni ionizzanti per la conservazione del pesce fres-
co. Radiopastorizzazione delle trote. Ind. Conserve. 47. nº 3.
pág 173. 1.972. Italia.

Blanc, D y Ambrosino, G. Eléments de physique nucléaire. pág.
83. 1.967. Masson et Cie., éditeurs. Paris.

Braunstedt, F. and Auerbach, M. The Spoilage of Fresh- Water -
Fish, en Fish as Food. I. pág. 616. 1.961. New York Academic -
Press.

Brynjolfsson, A. Energy and Food Irradiation. Food preservation by irradiation. II. pág. 285. 1.978. IAEA. VIENA. Austria.

Brosed, A. Nuevas unidades en Radiología. Rev. Energía Nuclear. Tomo 22, nº 116, pág. 411. Nov-Dic. 1.978. J.E.N. Madrid.

Cascales Angosto, M. Alteraciones bioquímicas producidas por in toxicación etflica. Anales de la Real Academia de Farmacia. - Vol. XLIII, nº 4. 1.977. Madrid.

Cascales, M., Feijóo, B., Cerdán, S., Robles-Chillida, E.M. y Santos-Ruiz, A. Effect des coenzymes UDP-Glc, CDP-Ch, SAM et CoA-SH sur le foie de rat traité avec de l'éthanol et dans régime lipidique. Annales pharmaceutiques françaises. Vol. 35. nº 11-12. pág. 447. 1.977. París.

Cassagne, M. Milieux de Culture. Collection Techniques de base. 1.967. 2ª ed. París.

Cerdán, S., Cascales, M., Chacón, P., Cascales, F. y Santos-Ruiz, A. Hepatotoxic effect of thioacetamide (TAM) on NADP-linked enzymes, aminotransferases and Glutamate Dehydrogenase. Public. del Dep. de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. 1.977.

Colęby, B. and Shewan, J.M. The Radiation Preservation of Fish, en Fish as Food. IV. pág. 419. 1.961. New York Academic Press.

Collins, C. Microbiological Methods. pág. 87. 1.967. 2th. Edition. London Butterworths.

Creskoff, A.J. Hematology of the Rat. Methods and Standards, en The Rat in Laboratory Investigation. pág. 406. 1.971. Hafner - Publishing Co. New York.

Cuellar Carrasco, L. y Díaz Yubero, M.A. Importancia de la sal_u monocultura intensiva continental en España. Rev. Vet. Española. II. nº 1. pág. 5. 1.976.

Chauhan, P. Assessment of irradiated foods for toxicological - safety. Food Irradiation Information. 2. pág. 20. Jun. 1.974. Published by the Project International in the Field of Food - Irradiation. 75 Karlsruhe. Alemania.

Chung, J.R. y Kim, S.I. Irradiation preservation of Korean - fish and shellfishery products. Final report, 1-1-1.970-31-12 1.972. IAEA. VIENA. Austria.

Davis, B. D. Tratado de Microbiología. pág. 266. 1.971. Salvat Editores, S.A. Barcelona.

Desrosiers, N. W. and Rosenstock, H.M. Radiation Technology - in food, Agriculture and Biology. pág. 283, 1.960. The AVI pu_blishing Co., Inc. West Port Connecticut.

Ehlermann, D. und Münzner. Zur Strahlenkonservierung von Fischen. II. Mitteilung, Forellen, en Preservation of Fish by Irradiation, Proceedings of a Panel, pág. 65, 1.970. IAEA, Viena, Austria .

Farkas, J. y Cols. Reduction of Radiation Dose Requirement of Food by Additives, and Microbiological Problems in Food Preservation by Irradiation. Panel Proceedings Series. pág. 123. -- 1.967. IAEA, VIENA, Austria.

Fornas, E. Dosimetría Fricke. Publicación J.E.N., Julio 1.965 IS. 3120/N-1.

Fornas, E. del Val, M. y de la Cruz, F. Unidad Nayade. Rev. - Energía Nuclear. Tomo 10. Número 43. Sep-Octubre 1.966. Publicación J.E.N. MADRID

Gaden, E. L. and Henley, E. J. Induced Resistance To Gamma Radiation in E. Coli. Jour. of Bacteriology. Vol. 65. pág. 727, 1:973. Columbia University. New York.

Garner, R. J. Toxicología Veterinaria. pág. 408. 1.970. Tercera Edición, Editorial Acribia, Zaragoza.

Glasston, S. Source Book on Atomic Energy. Pág. 113, 1.958, - segunda Edición. D.van Nostrand Company, Inc. Princeton, New Jersey.

Goresline, H. The Potentials of Ionising Radiation for Food -- Preservation. Food Irradiation Information. 2. pág. 20. Septiem bre de 1.973. Published by the International Project in the - Field of Food Irradiation. 75 Karlsruhe. Alemania.

Hannan, R. a) Research on the Science and Technology of Food Preservation by Ionizing Radiations. Pág. 46. 1.956. Chemical Publishing Co. Inc. New York.

Hannan, R. b) Research on the Science and Technology of Food Preservation by Ionizing Radiations. Pág. 49.

Hannan, R. c). Research on the Science and Technology of Food Preservation by Ionizing Radiations. Pág. 74.

Hannan, R. d). Research on the Science and Technology of Food Preservation by Ionizing Radiations. Pág. 142.

Hannesson, G. Objectives and Present Status of Irradiation of Fish and Seafoods. Food Irradiation Information. 1, pág. 28, 1.972. Published by the International Project in the Field of Food Irradiation. Institut für Strahlentechnologie. 75 Karlsruhe, Alemania.

Hansen, P. The effect of Ionizing Radiation and Antioxidant Treatment on the Quality and Storage Life of Vacuum Packed

Trout at 0°C. en Microbiological Problems in Food Preservation by Irradiation. Panel Proceedings series. pág.133. 1.967. IAEA VIENA. Austria.

Hobbs, G. Clostridium botulinum in irradiated fish, en Food - Irradiation Information. 7.pág. 39. Abril 1.977. Published by the International Project in the Field of Food Irradiation. - Institut für Strahlentechnologie. 75 Karlsruhe. Alemania.

Hollaender, A. et al. X-ray sensivity of E. coli as modified - by oxygen tension. Nature. Vol 167. pág.103. 1.951. London.

Hollaender, A. et al. The roløe of enzymatic oxygen removal in chemical protection against X-ray inactivation of bacteria. - Jour. of Bacteriology. Vol. 63. pág. 805. 1.952. London.

Huber, W. et al. Effect of processing conditions on organoleptic changes in foodstuffs sterilized with high intensity electrons. Food Technology. Vol. 7. pág. 109. 1.953. New York.

Hussain, A.M., Ehlermann, D. and Diehl, J.F. Effect of radurization on microbial flora of vacuum-packaged trout (*Salmo gairdneri*). Archiv für Lebensmittelhygiene. Vol. 27. pág. 223. Nov-Dic. 1.976. Karlsruhe. Alemania.

Ingram, M. and Roberts, T.A. Microbiological principles in - Food Irradiation. Food Irradiation. Panel Proceedings series.

pág. 267. 1.-66. IAEA. VIENA. Austria.

Jacotot, H. Animaux de Laboratoire. pág 62. 1.962. Collection Techniques de base. Editions de la Tourelle Saint- Maude. París.

Jacquot, R. Organic Constituents of Fish and other Aquatic Animal Foods, en Fish as Food. Vol I. pág. 158. 1.961. New York Academic Press.

Jorgensen, B.V. and Hansen, P. Storage Life of Vacuum-Packed - Iced Trout. II. Influence of Radiation Pasteurisation. Journal Science Food Agriculture. Vol 17. pág. 140. Mar. 1.966. USA.

Kaplan, I. Física Nuclear. pág. 359. 1.962. Ed. Aguilar. Madrid.

Kennard, H. The electron accelerator economics in radiation - preservation of food, en Food Preservation by Irradiation. II. pág. 273. 1.978. IAEA. VIENA. Austria.

Kircher, J.F. Dosimetry. Effects of Radiation on materials and components. pág. 49. 1.964. Reinhold Publishing Corporation. New York.

Kolb, E. Fisiología Veterinaria. Vol. II. pág. 616. 1.975. 2ª edición. Editorial Acribia. Zaragoza.

Kolb, E. Fisiología Veterinaria. Vol. II. pág. 674. 1.975.

Lamotte, M. Estadística Biológica. pág. 137. 1.970. 5ª edición
Ed. Toray-Masson. Madrid.

Lea, D.E. et al. Actions of radiations on living cells. Journal
of Hygiene. Tomo 41. pág.1.1.946. University Press. Cambridge.

Ledesma, D.A. Estadística Médica. pag. 285. 1.972. Editorial -
Universitaria de Buenos Aires.

Mann, H. Fish cultivation in Europe, en Fish as Food. I. pág.
80. 1.961. New York Academic Press.

Matutano, J.I. Conservación de alimentos por irradiación. IX.
Filetes de pescado blanco. Inf. Int. JEN. IS-2340/I-17. 1.968.

Matutano, J.I. Conservación de alimentos por irradiación. X. -
Filetes de pescado blanco. Inf. Int. JEN. IS-2340/I-18. 1.968.

Matutano, J.I. y Alonso, M. Use of low doses of gamma radiation
for the preservation of white fish fillets. Preservation of -
fish by irradiation. 1.970. IAEA. VIENA. Austria.

Matutano, J.I. y Alonso, M. Efectos de la radiación gamma so-
bre los índices bioquímicos y organolépticos del pescado blan-
co. Inf. Int. JEN. IS-2340/I-39. 1.971.

Matz, S.A. Food Texture. pág 223. 1.962. The AVI Publishing -

Co., Inc. Westport. Connecticut.

Moos, W.S. A 2 MeV X-ray and cathode ray irradiation of Pseudo
monas aeruginosa. Experientia. Vol. 8. pág. 103. 1.952.

Pantaleon, J. et Rosset, R. Controle de la qualité et de la sa
lubrité du poisson et des coquillages. 1.962. Association Vét-
térinaire d'hygiene Alimentaire. París.

Pelczar, M.J. y Reid, R.D. a). Microbiología. pág. 89. 1.966.
2ª ed. Ediciones del Castillo, S.A. Madrid.

Pelczar, M.J. y Reid, R.D. b). Microbiología. pág. 307.

Pelczar, M.J. y Reid, R.D. c). Microbiología. pág. 557.

Pelczar, M.J. y Reid, R.D. d). Microbiología. pág. 615.

Ramón y Cajal, S. y Tello y Muñoz, J.F. a). Elementos de Histo
logía normal y de técnica micrográfica. pág. 48. 1.956. 14ª ed.
Editorial Científico-Médica. Madrid.

Ramón y Cajal, S. y Tello y Muñoz, J.F. b). pág. 615.

Ramón y Cajal, S. y Tello y Muñoz, J.F. c). pág 628.

Rindorf, H. Economics of Food Irradiation. Food Irradiation. -

pág. 865. 1.966. Panel Proceedings series. IAEA. VIENA. Austria.

Romeis, B. Guía formulario de técnica histológica. pag. 198. -
1.936. Editorial Labor. Barcelona.

Shewan, J.M. Food Poisoning Caused by Fish and Fishery Products,
en Fish as Food. II. pág. 451. 1.961. New York Academic Press.

de la Sierra Serrano, D. La energía nuclear y la profesión ve-
terinaria. Noticias Neosan. nº112. pág. 135. Nov. 1.966. Barce
lona.

de la Sierra Serrano, D. Pruebas de radurización de filetes de
pescado fresco y arenques ahumados a diferentes temperaturas.
Revista del Patronato de Biología Animal. Vol. XI, nº 2. pág.
49. 1.967. Madrid.

de la Sierra, D., Alonso, M. y Matutano, J.I. Contrato de in -
vestigación IAEA.- JEN nº 731/RB. Radiosensibilidad de la mi -
croflora del pescado blanco. 1.969. Madrid.

de la Sierra, D., Alonso, M. y Matutano, J.I. Prolongación de
la vida comercial del pescado mediante radiaciones ionizantes.
Inf. Int. JEN IS 2340/I-34. 1.971. Madrid.

Spiers, F.W. Radiation Units an Theory of Ionization Dosimetry,
en Radiation Dosimetry. pág. 7. 1.962. New York Academic Press.

Strettan, J.S. Radiaciones ionizantes. pág. 165. 1.967. Editorial Alhambra, S.A. Madrid.

Tanarro, A. Instrumentación Nuclear. pág. 152. 1.970. Servicio de publicaciones de la JEN. Madrid.

Taplin, G. Chemical and Colorimetric indicator. Radiation Dosimetry. pág. 358. 1.956. Academic Press Inc. New York.

Tarr, H.L.A. Changes in Nutritive Value through Handling and Processing Procedures, en Fish as Food. II. pág. 235. 1.961. New York Academic Press.

Tarr, H.L.A. Chemical Control of Microbiological Deterioration, en Fish as Food. I. pág. 664. 1.961. New York Academic Press.

Timofeeff-Ressovsky, N.W. and Zimmer, K.G. Das Trefferprinzip in der Biologie. Hirzel. Leipzig. 1.947.

Tsuchiya, T. Biochemistry of Fish Oils, en Fish as Food. I. pág. 242. 1.961. New York Academic Press.

del Val, M. y Ortín, N. Conservación de alimentos por irradiación. 1.965. Report JEN 158/I-15. Madrid.

Zaytsev, A.N., Shillinger, Yu. and Kamaldinova, Z.M. Wholesomeness studies on irradiated foods. Food Irradiation Information

5. pág.43. Nov. 1,975. Published by the International Project
in the Field of Food Irradiation. Institut für Strahlentechno-
logie. 75 Karlsruhe. Alemania.