



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**Unidad Iztapalapa**  
**Ciencias Biológicas y de la Salud**

---

## **Producción de Histamina en Escómbridos**

**Comité tutorial:**

**Dra. María Isabel Guerrero Legarreta, M. en C. Lorena Gómez Ruíz y  
M. en C. Paulina Lara Calderón.**

**T E S I S**

**Para obtener el grado de:**

**MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA**

**P R E S E N T A :**

**Ing. SILVIA GUILLEN VELASCO**

**Jurado Evaluador:**

**Dra. María Isabel Guerrero Legarreta  
M. en C. Lorena Gómez Ruíz  
M. en C. Paulina Lara Calderón  
Dr. José Luis Arredondo Figueroa**

**México, D. F. 23 de Enero de 1997**

## AGRADECIMIENTOS

Primero que nada quiero agradecer a Dios por haberme permitido llegar a donde he llegado, hacer lo que he hecho y ser lo que soy.

Quiero agradecer a la Institución que me dió formación y que me llevó a realizar algunos sueños, la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Izatapalapa, así mismo quiero agradecer al CONACyT por el apoyo otorgado durante la realización de éste trabajo de investigación.

Quiero también agradecer especialmente a la Dra. Isabel Guerrero L., quien, sin su apoyo y dirección no hubiera sido posible la culminación de este trabajo y por permitirme pertenecer primero, al grupo de carnes, ahora al Area de Bioquímica de Macromoléculas. Gracias también a la M. en C. Paulina Lara C. por haber confiado desde un principio en mí y haberme dado la oportunidad de conocerla. Agradezco la colaboración de la M. en C. Lorena Gómez R. por su apoyo y sus sugerencias cuando se las solicité. Agradezco la revisión y la crítica realizada por el Dr. José L. Arredondo F. para la mejor presentación de la tesis.

Gracias también a las Dras. Edith Ponce A., Arely Prado B., Gabriela Rodríguez S., a la M. en C. Ma. de Lourdes Pérez Ch. y al M. en B. Héctor Escalona B. por compartir sus conocimientos y escucharme en los momentos en los que me surgían algunas dudas y por su amistad.

Un agradecimiento muy pero muy especial a esa persona con la cual empecé esta aventura, con la que he compartido parte de mi vida y con el que quiero compartir el resto de la misma. Al amigo con el que cualquier persona desea tener y que la vida lo puso en mi camino, gracias Ernesto.

Gracias a toda la gente que de una u otra forma estuvo conmigo en los momentos en los que los necesité, a los compañeros del laboratorio, a los de la generación y a esos amigos en los cuales uno puede confiar.

Después quiero dedicar y agradecer a mis padres por haberme enseñado a valerme por mi misma y enseñarme buenas bases humanas, por haber hecho lo posible por comprender la vida de un investigador, en la cual no existe ninguna rutina, ningún horario, y sí muchas cosas por aprender y tratar de darles explicación. A mis hermanos y sobrinos por su apoyo moral y mil disculpas por no haber compartido el tiempo que a veces me requerían.

A todos ellos con mucho cariño expresando todo mi agradecimiento.

*Silvia.*

## INDICE

<b>1. Introducción.</b>	<b>1</b>
<b>2. Justificación.</b>	<b>5</b>
<b>3. Objetivos.</b>	<b>5</b>
3.1. Objetivo General.	5
3.2. Objetivos Particulares.	5
<b>4. Revisión Bibliográfica.</b>	<b>6</b>
4.1. Tipos de pescado.	6
4.2. Estructura física.	6
4.3. Subcomponentes de los tejidos.	7
4.4. Vida de anaquel del pescado.	9
4.4.1. Factores intrínsecos.	9
4.4.1.1. Composición.	9
4.4.1.2. Oxido de trimetilamina.	10
4.4.1.3. pH postmortem.	10
4.4.1.4. Metabolismo postmortem.	10
4.4.1.5. Actividad de agua (aw).	11
4.4.2. Factores extrínsecos.	11
4.4.2.1. Temperatura.	11
4.4.2.2. Humedad.	12
4.4.3. Factores de proceso.	12
4.5. Contaminación microbiana del pescado.	13
4.5.1. Fuentes de contaminación microbiana.	13
4.5.2. Microflora del pescado.	15
4.6. Formación de aminas biogénicas.	18
4.6.1. Importancia.	18
4.6.2. Formación de histamina en escómbridos.	21
<b>5. Materiales y Métodos.</b>	<b>26</b>
5.1. Preparación del pescado.	26
5.2. Cuenta de microorganismos.	26
5.3. Identificación de bacterias histaminogénicas.	27
5.4. Determinación de histamina.	27
5.4.1. Método enzimático.	27
5.4.2. Cromatografía de alta resolución (HPLC).	28

20/06/02

5.5. Cinéticas de crecimiento y formación de histamina .....	28
5.6. Análisis de resultados .....	29
<b>6. Resultados y discusión.....</b>	<b>30</b>
6.1. Cuentas microbianas .....	30
6.2. Identificación de cepas .....	31
6.3. Cinéticas de crecimiento y formación de histamina .....	35
6.3.1. Determinación del crecimiento de la población de <i>Morganella morganii</i> en medio NB y su producción de histamina, analizado por el método enzimático.....	36
6.3.2. Determinación del crecimiento de la población de C1 ( <i>Hafnia alvei</i> ) en medio NB y su producción de histamina, analizado por el método enzimático.....	39
6.3.3. Determinación del crecimiento de la población de C3 ( <i>Serratia liquefaciens</i> ) en medio NB y su producción de histamina, analizado por HPLC .....	40
6.3.4. Determinación del crecimiento de la población de <i>Morganella morganii</i> y <i>Serratia liquefaciens</i> y su producción de histamina en medio de proteínas sarcoplásmicas de atún, analizado por HPLC .....	43
<b>7. Conclusiones.....</b>	<b>45</b>
<b>8. Bibliografía.....</b>	<b>46</b>
<b>Anexo Técnicas utilizadas .....</b>	<b>51</b>
<b>Medios de cultivo.....</b>	<b>51</b>
Cuenta total.....	51
Cuenta e identificación de bacterias histaminogénicas .....	51
Medio de mantenimiento. Agar Triptisoya-caseína suplementado con histidina (TSAH).....	52
Medios para cuantificación de histamina .....	52
Medio NB .....	52
Medio de pescado .....	52
<b>Pruebas para la identificación de microorganismos. ....</b>	<b>53</b>
Tinción Gram.....	53
Prueba de catalasa .....	53
Prueba de oxidasa.....	54
Prueba de Oxidación-Fermentación .....	54
Medio básico de oxidación-fermentación (O-F): .....	54
Agar Hierro de Kligler (AHK).....	56
<b>Determinación de histamina.....</b>	<b>58</b>
Método enzimático .....	58
HPLC.....	59

## Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar el efecto del pH y la temperatura en la formación de histamina a partir de histidina por bacterias descarboxilantes aisladas de pescado utilizando medios sintéticos y un medio formulado con proteínas sarcoplásmicas de músculo de atún. El estudio se realizó con atún adquirido en el depósito central de pescados y mariscos de la ciudad de México "La Nueva Viga", procedente de Veracruz, el atún fue eviscerado, lavado y seccionado en rebanadas de 3 cm aproximadamente. Las secciones fueron mantenidas en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso, previo descongelamiento. La evaluación de las cuentas microbiológicas se llevaron a cabo a diferentes tiempos dependiendo de las condiciones de análisis. Se realizaron cuenta total en agar nutritivo y cuenta de microorganismos histaminogénicos en medio Niven.

El aislamiento de las cepas histaminogénicas se llevó a cabo en un frotis de piel inoculado en medio Niven, se seleccionaron colonias que presentaban halo morado (presuntas histaminogénicas) y se resembraron en el mismo medio hasta asegurar que fueran colonias puras. Se obtuvieron 4 diferentes cepas, las cuales posteriormente fueron identificadas con sistema API20 y con la ayuda de pruebas bioquímicas. Paralelamente se trabajó con una cepa control, *Morganella morganii*, proporcionada por la Universidad de Concepción, Chile, es una cepa aislada de pescado de aguas frías y ha sido reconocida por su alta actividad histaminogénica.

Los resultados mostraron que las cepas aisladas denominadas C1, C2, C3 y C4 presuntamente son: *Hafnia alvei*, *Serratia rubidaea*, *Serratia liquefaciens* y *Enterobacter agglomerans*, respectivamente, cepas que ya han sido previamente reportadas por ser histaminogénicas.

Las cepas aisladas se conservaron en tubos inclinados con TSA enriquecido con 0.1% de histidina a pH 6.0. La determinación de las cinéticas de crecimiento y producción de histamina se realizaron tanto para la cepa de *Morganella morganii* como para la cepa de *Serratia liquefaciens* aislada. Estas determinaciones se llevaron a cabo en caldo NB, a pH 5.3 y a pH 6.0 y a 19 y  $37^{\circ}\text{C}$  en 4 tratamientos: a) pH 5.3 a  $19^{\circ}\text{C}$ , b) pH 5.3 a  $37^{\circ}\text{C}$ , c) pH 6.0 a  $19^{\circ}\text{C}$  y d) pH 6.0 a  $37^{\circ}\text{C}$ . Se

tomaron muestras a varios tiempos (0, 2, 7, 11, 27, y 34 horas) en los que se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) y la concentración de histamina. La determinación de la concentración de histamina en el medio, para *Morganella morganii* a diferentes tratamientos se llevó a cabo por el método enzimático descrito por López-Sabater y col. (1994) al igual que para *Hafnia alvei* (una de las cepas aisladas) que se realizó a pH 5.3 y 37°C. Para la cepa de *Serratia liquefaciens* se determinaron las concentraciones de histidina e histamina en el medio con un equipo HPLC utilizando una columna de intercambio catiónico débil, de 5x50 mm CM-15 HR, con tamaño de poro de 1000 Å.

El poder histaminogénico de la cepa de *Serratia liquefaciens* (C3) es tan potente o más que la de *Morganella morganii* (cepa control). La temperatura jugó un papel muy importante en la velocidad de formación de histamina siendo mayor a una temperatura de incubación de 37°C que a 19°C, sin embargo, después de las 34 horas de cultivo, la concentración de histamina fué igual para ambas temperaturas. Se llegó a la conclusión de que la cepa C3 tiene un poder histaminogénico alto, se produjeron hasta 30 µmol/ml en el caldo NB en 34 horas y no se vió afectado ese resultado por las condiciones de cultivo. El pH no influyó en la formación de histamina. La cepa de *Hafnia alvei* presentó una actividad mucho menor, 1.2 µmol/ml en 24 h a pH 5.3 y 37°C.

En el medio de cultivo de atún a pH 5.3 y 37 °C la máxima producción de histamina por *Serratia liquefaciens* fué a las 7 horas de cultivo con 10 µmol/ml, en tanto que para *Morganella morganii* fué de 7-8 µmol/ml para ese mismo tiempo.

## 1. Introducción.

La descomposición de los alimentos es probablemente la consideración económica más seria de la industria alimentaria. Los alimentos están sujetos al ataque de microorganismos en una gran variedad de formas y éstos dañan la calidad del producto. Las características físicas y químicas determinan el grado de susceptibilidad, las clases de microorganismos que pueden afectarlo y la forma de descomposición que resultará.

El pescado y los mariscos son alimentos en los cuales la microflora varía cuantitativa y cualitativamente, dependiendo del tipo y cantidad de microorganismos del agua donde sean capturados. La composición de la flora microbiana de la piel depende de su origen (dulce-acuícola o marino), y de las condiciones climáticas (aguas tropicales o templadas) (Hurst y Collins-Thompson, 1979). Se ha demostrado que las bacterias asociadas a estos alimentos están generalmente distribuidas en la piel, las agallas y los intestinos. El interior del músculo de pescados sanos es considerada estéril (Shewan, 1971).

Entre los microorganismos en el pescado se encuentran aquellos capaces de producir enzimas descarboxilantes, la acción de éstos sobre el músculo de pescado promueve la formación de aminas biogénicas tales como: cadaverina, putrescina, ornitina, histamina, agmanatina, tiramina, triptamina, espermidina y espermina (White y Tabor, 1985). Los compuestos anteriores se consideran como sustancias que alteran la presión sanguínea (Martin y col., 1984; Aksnes y Brekken, 1988; Halász y col., 1994) y se forman por la descarboxilación de aminoácidos libres que se encuentran presentes o que son liberados como resultado de actividad proteolítica (Halász y col., 1994).

Las aminas biogénicas generalmente no representan ningún riesgo a la salud a menos que sean ingeridas grandes cantidades o el mecanismo natural para el catabolismo de éstas sea inhibido o genéticamente deficiente (Halász y col., 1994).

La histamina y tiramina juegan un papel importante en muchas funciones fisiológicas en humanos y en animales (Halász y col., 1994). La histamina o imidazoletilamina es considerada como



una hormona que contribuye a regular el tono de la musculatura lisa, se forma por descarboxilación de la histidina, ya sea en el intestino o en los tejidos donde se libera cuando son dañados (Martin y col., 1984).

Los efectos más importantes de histamina durante una intoxicación son: dilatación de los capilares sanguíneos, aumento de la secreción gástrica y estimulación del sistema nervioso autónomo (Ienistea, 1973). Es también un mediador primario de síntomas inmediatos resultantes de las respuestas alérgicas. En medicina la presencia de histamina ayuda a determinar el tipo de hiposecreción gástrica y por ser desensibilizante en las afecciones alérgicas también se utiliza en la artritis y en las úlceras indoloras (Martin y col., 1984).

Algunos alimentos que pueden contener histamina y no presentar signos de alteración son el pescado fresco, principalmente de la familia de los escómbridos y sus derivados (harina, concentrados, enlatados), quesos, carnes curadas y alimentos fermentados (Arnold y Brown, 1978; Stratton y col., 1991).

Los escómbridos son la familia de peces de musculatura roja, responsables a menudo de causar intoxicación por histamina debido a que presentan un alto contenido de histidina libre, la que puede ser descarboxilada por acción de microorganismos que posean alta actividad de histidín descarboxilasa.

Las temperaturas altas propician la formación de histamina, a temperaturas de 27-29.5°C la concentración de histamina puede aumentar a niveles tóxicos en 12 horas de almacenamiento lo cual puede ocurrir cuando la refrigeración es defectuosa o nula (Lerke y col., 1983).

Se ha confirmado que muchos microorganismos poseen la enzima histidín descarboxilasa pero sólo unos cuantos tienen la capacidad para producir grandes cantidades de histamina en períodos cortos de tiempo (Arnold y Brown, 1978; Taylor y Woychik, 1982). Esta enzima se encuentra en ciertas especies de la familia *Enterobacteriaceae* como *Morganella morganii* y *Klebsiella pneumoniae* (Ababouch y col., 1991) y en algunas especies de *Clostridium* y

*Lactobacillus* y algunas bacterias lácticas (Taylor y col., 1978). Se ha demostrado que *Morganella morganii* es un contaminante común del pescado durante su descomposición (Eitenmiller y col., 1982; Taylor y Woychik, 1982), hecho muy importante debido a que presenta una alta actividad histaminogénica.

Debido a la toxicidad de las aminas biogénicas formadas por la descarboxilación de aminoácidos, en especial de histamina a partir de histidina, la detección de las bacterias histaminogénicas, de histidín descarboxilasa y de histamina por métodos rápidos y confiables son objeto de estudio de varios laboratorios.

Las bacterias responsables de la descarboxilación de histidina pueden ser difíciles de detectar debido a que comprenden la minoría de la flora bacteriana. El medio de Niven es un medio de cultivo útil para detectar bacterias entéricas productoras de histamina, tales como *Morganella morganii* y *Klebsiella pneumoniae* en pescado, y facilitar su aislamiento debido a que se utiliza un indicador de pH. En las bacterias lácticas no se puede utilizar este método debido a que se produce ácido láctico al mismo tiempo que histamina, por lo que se anula la ventaja del cambio en el pH, tal es el caso de *Lactobacillus buchneri*, un lactobacilo productor potente de histamina, que no puede ser aislado por el método de Niven (Sumner y Taylor, 1989).

La identificación cualitativa de bacterias productoras de histamina en pescado, a través del uso del medio Niven se realiza fácilmente. Sin embargo, las evaluaciones cuantitativas también son muy importantes para estudiar la capacidad de producción de histamina. Los métodos más comunes para ésta valoración son: 1) el método tradicional de la AOAC modificado (Behling y Taylor, 1982; Smith y col., 1982) y 2) el método enzimático (Sumner y Taylor, 1989; López-Sabater y col., 1994).

Es también deseable la disponibilidad de un medio sencillo, barato, de ingredientes simples con una misma composición para la determinación cuantitativa de histamina. El primer medio reportado de este tipo para la determinación de histamina es el medio TFIB (Tuna Fish Infusion Broth) por Omura y col. (1978), posteriormente fué reportado el de caldo triptisoya caseína fortificada con 0.1% de histidina (TSBH) a pH 6.8 por Taylor y Woychik (1982). Actualmente López-Sabater y col (1994) propusieron el uso de otro medio líquido, el medio NB (Nutrient Broth)

a pH 5.3, en el cual se evita la interferencia de azúcares reductores que es de vital importancia, ya que la determinación de histamina se lleva a cabo por una reacción de desarrollo de color en la cual los azúcares reductores interfieren en la determinación. Dicho medio no contiene azúcares.

Finalmente, de los métodos instrumentales, el uso del HPLC da una serie de características favorables para la determinación de histidina e histamina tales como: exactitud, análisis de pequeñas cantidades y alta especificidad.

## **2. Justificación.**

Dada la importancia de la formación de histamina en los escómbridos, debida a las implicaciones que ésta tiene tanto para el consumo humano directo como para la industria, es de evidente interés estudiar las bacterias que producen la histidín descarboxilasa y la cinética de producción de histamina, los factores que influyen en su formación, así como la forma en que podría reducirse ya sea la formación de histamina o el desarrollo de las bacterias histaminogénicas, para mantener por un mayor tiempo un producto de buena calidad y que sea inocuo para el consumo.

## **3. Objetivos.**

### **3.1. Objetivo General.**

Mediante el estudio de los microorganismos contaminantes del atún (*Thunnus thynnus*) se pretende evaluar la presencia de bacterias productoras de histamina, así como también el efecto del pH y la temperatura en la formación de histamina por microorganismos aislados de esta especie marina.

### **3.2. Objetivos Particulares.**

- Conocer la presencia de microorganismos histaminogénicos contaminantes del pescado.
- Estudiar la cinética de crecimiento de bacterias histaminogénicas.
- Estudiar la formación de histamina en un medio sintético y en un medio formulado con proteínas sarcoplásmicas de músculo de atún.

## **4. Revisión Bibliográfica.**

### **4.1. Tipos de pescado.**

El término pescado cubre los más diversos grupos de animales en existencia, representando más de 20,000 especies y si los mariscos son incluidos, alcanzan algunos miles más. En término de fuentes de alimentos para el hombre, sin embargo, únicamente algunas docenas son de importancia comercial. Muchos peces son de la clase *Pisces*, pescados con huesos, los que se dividen en dos grandes grupos: a) Pelágicos y b) Demersales (Love, 1988).

El primer grupo, incluye especies de carne oleosa o grasosa como es el caso de los túnidos, que presentan un músculo oscuro ya que es el requerido para la rapidez de sus movimientos, sus reservas de grasas bajo la piel y dentro de la carne son mucho mayores a los demersales. Las especies demersales depositan sus reservas de grasa principalmente en el hígado; su carne, baja en grasa, es generalmente blanca. Una distinción adicional entre los dos grupos relaciona su conducta natatoria, los bancos, de especies pelágicas, se localizan mas bién cerca de la superficie y son generalmente capturados en redes obteniéndose gran número de peces de la misma talla (de tamaño uniforme) mientras que los peces demersales son capturados por rastreo en cantidades pequeñas, su conducta natatoria es solitaria, generalmente tienen diferentes tallas y especies, el manejo y clasificación de este grupo es consecuentemente mas complicada (Love, 1988; Mackie 1982).

### **4.2. Estructura física.**

La musculatura del pescado es un material no uniforme, que contiene diferentes proporciones de tres tejidos principales:

a) **Músculo blanco.** Es el principal componente del filete; observado a simple vista consiste de fibras del grosor de un cabello humano, cada célula está rodeada por una membrana muy delgada, que es la pared celular, cada fibra está compuesta de subunidades denominadas miofibrillas, que corren paralelas dentro de la célula. Las miofibrillas consisten de miofilamentos gruesos y

delgados, que son vistos únicamente con un microscopio. Los miofilamentos están compuestos de proteína y es en este nivel en donde se lleva a cabo la contracción muscular (Love, 1988).

**B) Músculo oscuro (rojo).** Cuando se hacen cortes, se observa claramente el músculo oscuro debajo de la piel. Aunque ultraestructuralmente es similar al músculo blanco, el color es debido a la presencia de pigmentos hemo, principalmente hemoglobina, es aquí donde se lleva a cabo el intercambio gaseoso cuando se requiere ejercicio continuado, mientras que el músculo blanco es usado intermitentemente para movimientos de poca duración o súbitos (Love, 1988).

**c) Tejido conectivo.** El tejido conectivo está constituido principalmente por la piel, es de difícil masticación o deglutirlo y generalmente es convertido a gelatina soluble a nivel industrial. Se encuentra también ampliamente distribuido en toda la musculatura, como el material que mantiene unido a las fibras musculares. Su principal componente es la fibra o proteína colágena (Love, 1988).

#### **4.3. Subcomponentes de los tejidos.**

**Agua:** El principal constituyente del pescado fresco es agua, constituyendo cerca del 80% del peso de un filete de músculo blanco, mientras que el del pescado oleoso contiene 70% (Pigott y Tucker, 1990). Entre especímenes individuales el contenido de agua puede variar entre extremos de 30 a 90%. El agua está firmemente unida a las proteínas en la estructura, de forma tal que no puede ser expelida con sobrepresión. Después de un congelado prolongado o almacenamiento en refrigeración, las proteínas son menos capaces de retener el agua, y en consecuencia las sustancias disueltas contenidas en el agua se liberan. El pescado refrigerado que es almacenado a altas temperaturas (mayor a 15°C) puede producir el goteo de grandes cantidades de agua y consecuentemente disminuir su calidad debido a que proporciona un medio húmedo para el crecimiento bacteriano y la salida de nutrientes del pescado (Pigott y Tucker, 1990).

**Proteína:** La cantidad de proteína en músculo de pescado es entre 15 y 20%, pero se pueden encontrar valores tan bajos como 10% o tan altos como 28% en algunas especies (Murray y Burt, 1989). Algunas especies como la macarela del Atlántico, un pescado de alto contenido en

grasa, contiene de 16-18% de proteína y varía de acuerdo a la estación (Pigott y Tucker, 1990). Los aminoácidos esenciales lisina y metionina son encontrados en grandes concentraciones en pescados en contraste con las proteínas de los cereales. Las proteínas del pescado tienen una buena combinación de aminoácidos lo que las hace proteínas completas nutricionalmente (Murray y Burt, 1989). En la Tabla 1 se presentan los aminoácidos esenciales de varias especies de pescado en comparación con la de carne de res.

Tabla 1. Composición de aminoácidos esenciales de las proteínas de diferentes pescados y carne de res (Valores dados en por ciento de proteína, N X 6.25) (Geiger ,1962)

Aminoácido	Macarela del pacífico	Sardina del Pacífico	Salmón	Atún	Carne de res
Arginina	5.5	5.1	5.8	6.4	5.3
Histidina	5.4	4.7	2.6	3.5	5.7
Isoleucina	5.0	4.2	4.9	4.9	4.7
Leucina	7.4	7.2	7.3	7.9	7.2
Lisina	8.5	8.4	8.0	8.9	8.3
Metionina	2.8	2.8	3.0	2.5	2.8
Fenilalanina	3.8	3.7	3.7	3.8	3.5
Treonina	4.5	4.3	4.4	4.2	4.5
Triptofano	1.0	1.0	0.9	1.0	1.0
Valina	5.2	5.2	5.6	5.4	5.1

**Lípidos:** El contenido de grasa puede variar más ampliamente que el del agua y de proteínas. Así, mientras disminuye el contenido de agua, aumenta el contenido de grasa y viceversa, aunque el contenido de grasa y agua es más o menos constante (Bennion, 1980; Pigott y Tucker, 1990).

Generalmente se encuentran concentraciones mayores de grasa en el músculo oscuro que en el blanco, llegando hasta el 15.1 %, variando según la especie. La carne del pescado alto en grasa como sardina, arenque y salmón generalmente es más pigmentada (Pigott y Tucker, 1990). En pescados como la macarela y el bacalao se encuentran altas concentraciones de lípidos en el músculo oscuro, sin embargo entre ambas especies difiere la forma en que se encuentran las reservas de energía en forma de triacilglicéridos. En el bacalao, son almacenados en el hígado mientras que en la macarela lo son en el músculo (Love, 1988).

Los alimentos derivados de fuentes animales (carnes, huevos, productos lácteos) contienen cantidades importantes de colesterol. En la carne de pescado el colesterol está en cantidades muy bajas, especialmente en pescados bajos en grasa. Los pescados altos en grasa, como la macarela, pueden contener más de 95 mg/100g comparable a la cantidad encontrada en carne de res (Pigott y Tucker, 1990).

**Carbohidratos:** El contenido de carbohidratos en el pescado es insignificante, pero algunos mariscos almacenan sus reservas como glucógeno, el cual contribuye a las características dulces de estos productos (Bennion 1980).

**Vitaminas:** Las vitaminas solubles en agua como las del complejo B y C presentan los mismos niveles que las carnes de animales terrestres. Las vitaminas solubles en grasa, como las A, D, K y E varían sus cantidades dependiendo de la especie de pescado (Pigott y Tucker, 1990).

**Minerales:** El cobre y el hierro constituyen nucleoproteínas las que se encuentran en cantidades considerables en el pescado, siendo mayores sus concentraciones en el músculo rojo que en el músculo blanco (Jacquot, 1961).

#### **4.4. Vida de anaquel del pescado.**

El pescado se descompone más rápidamente comparado con las canales de animales de sangre caliente por los factores que se describen a continuación.

##### **4.4.1. Factores intrínsecos.**

###### **4.4.1.1. Composición.**

Este factor ha sido mencionado antes, pero es muy importante recalcar que el pescado tiene una composición que lo hace uno de los nutrientes más completos para el crecimiento de microorganismos y por tanto es muy susceptible a la descomposición. Contiene una humedad muy alta, es rico en proteínas y a la vez contiene enzimas proteolíticas que aumentan la liberación de péptidos los cuales son mas fácilmente asimilados por los microorganismos. Es también una fuente



rica de vitaminas y minerales, todo ésto hace que el pescado sea un habitat muy adecuado para el crecimiento y la proliferación de microorganismos (ICMSF,1980).

#### **4.4.1.2. Oxido de trimetilamina.**

El tejido de pescado contiene óxido de trimetilamina (OTMA) el cual estimula el crecimiento de bacterias anaerobias de descomposición. Las bacterias ganan más energía por medio de la respiración anaerobia con OTMA que por fermentaciones anaeróbicas estrictas. Así el OTMA estimula la tasa e incrementa el crecimiento de bacterias bajo condiciones anaerobias (Strom y col., 1979). Sin embargo, las bacterias de descomposición usan el ácido láctico como fuente de energía si OTMA está presente. Este ácido no puede ser degradado en ausencia de OTMA por ninguna bacteria de descomposición. Durante la degradación anaerobia del ácido láctico se reduce el OTMA a trimetilamina (TMA) y se produce acetato y CO<sub>2</sub>. La TMA formada tiene un olor muy desagradable y se considera como un olor específico de pescado descompuesto (Raa, 1980).

#### **4.4.1.3. pH postmortem.**

El tejido de pescado tiene un pH postmortem mayor que el correspondiente a tejidos animales de sangre caliente. El descenso del pH postmortem es debido a la acumulación de ácido láctico como producto final de la degradación de glucógeno de animales muertos. El nivel de glucógeno en pescado es menor que el de animales de sangre caliente por ello se acumula menor cantidad de ácido láctico. El pH postmortem del bacalao está entre 6.2-6.5, en especies pequeñas pelágicas como el capelín (*Mallotus villosus*) el pH es de 6.7-6.9 y en cambio, para animales de sangre caliente el pH postmortem llega a descender hasta 5.5. El OTMA puede ser usado por bacterias de descomposición como un aceptor de electrones o un agente oxidante cuando el oxígeno ya está agotado (Raa, 1980).

#### **4.4.1.4. Metabolismo postmortem.**

Se considera que la contracción del músculo que sigue de la muerte, conocida como rigor mortis, difiere de la descomposición postmortem autolítica y bacteriana del pescado fresco. Se ha sugerido que el arranque y duración del rigor mortis predetermina la vida de anaquel del pescado

fresco. Se han discutido otras formas en las cuales el rigor mortis afecta el pescado, éstas incluyen la capacidad de ligar agua, la pérdida por goteo, la funcionalidad del músculo durante el procesamiento, la conveniencia de utilizar el pescado en operaciones de fileteado, la penetración de sal durante el curado, el color, la textura, etc. Así, el rigor mortis tiene consecuencias prácticas considerables para la tecnología del pescado. El fenómeno ha sido más estudiado en animales terrestres y en pescados de aguas frías y ha demostrado estar influenciado por factores intrínsecos y del medio ambiente. Los trabajos realizados en pescado de aguas dulces indican que las reservas de energía del músculo al igual que el método de captura son los principales factores intrínsecos. Un pescado exhausto tiene menor reserva de glucógeno y el inicio y la resolución del rigor mortis es mas rápida. En general, el rigor mortis del pescado es de menor duración que el de los mamíferos. Es universalmente aceptado que el factor ambiental más importante que influye en el rigor mortis de pescados es la temperatura, ya que a mayor temperatura a la cual el pescado es retenido después de la muerte más rápido es el inicio del rigor mortis y más corta es su duración (Poulter y col., 1982; Shewan, 1971).

#### **4.4.1.5. Actividad de agua ( $a_w$ ).**

Todas las carnes frescas tienen una  $a_w$  alta, aproximadamente de 0.99 lo que favorece en gran medida el desarrollo de microorganismos.

#### **4.4.2. Factores extrínsecos.**

##### **4.4.2.1. Temperatura.**

Una práctica común es enfriar al pescado para evitar el crecimiento de bacterias de descomposición. Para animales de sangre caliente esta práctica es eficiente, pero el pescado de aguas templadas tiene una alta carga de bacterias psicrótróficas las cuales son capaces de crecer y causar descomposición aún en pescado almacenado en hielo picado (Raa, 1980). Los pescados tropicales tienen una vida de "anaquel" más corta que las especies de aguas templadas o frías cuando se almacenan bajo las mismas condiciones de temperatura cuando son moderadamente altas (15°C)

debido a que las reacciones químicas y bacterianas responsables de la descomposición son más rápidas mientras mayor sea la temperatura. En climas tropicales (25-40°C) el pescado puede descomponerse antes de que hayan sido sacados del mar y dentro de las 24 horas siguientes. El pescado de aguas frías (10°C o menos) pueden permanecer con calidad aceptable hasta 3 días después de la captura. Sin embargo, los pescados tropicales tienen una vida de "anaquel" más larga en hielo que los de aguas frías (Poulter y col., 1982) esto probablemente es debido a las diferentes cargas microbianas de bacterias psicrófilas. El efecto benéfico puede ser disminuido si el hielo utilizado está fabricado con aguas contaminadas y las condiciones higiénicas son pobres (Raa, 1980).

#### **4.4.2.2. Humedad.**

La disminución de la temperatura se lleva a cabo generalmente con hielo o con agua de mar fría, lo que trae consigo que siempre se tengan condiciones muy húmedas y se ayude al transporte de los microorganismos cuando se escurre por las superficies.

#### **4.4.3. Factores de proceso.**

Aunque los cambios deteriorativos en el pescado ocasionados por las enzimas musculares son importantes en la calidad sensorial, los requerimientos esenciales para la producción de pescado de calidad satisfactoria y segura son: a) minimizar la contaminación bacteriana de fuentes exógenas y b) manejar y procesar el pescado de manera que se minimice la multiplicación de bacterias endógenas y exógenas. El desarrollo de gran número de bacterias en el pescado causan descomposición debido a la degradación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos por las enzimas de las bacterias presentes. Los productos de descomposición de todas estas reacciones pueden ser inaceptables de una u otra forma (sabor y olor). Además, si las bacterias son capaces de formar toxinas, la oportunidad de crecimiento puede permitir la producción de éstas y así provocar intoxicaciones alimenticias al igual que los patógenos pueden causar enfermedades cuando están presentes (Chichester y Graham, 1973).

La temperatura a la cual ocurren los cambios inducidos por calor en el músculo de pescado de aguas tropicales es diferente a los de aguas frías, lo que es debido a que las especies tropicales viven en aguas entre 25-30°C y es improbable que sus proteínas musculares comiencen a desnaturalizarse dentro de ese intervalo de temperatura. En los pescados de aguas frías, como el bacalao, a 43°C el músculo llega a ser algo traslúcido, debido a desnaturalizaciones, y a los cambios en la capacidad de ligar agua (Poulter y col., 1982), esto último es importante porque durante la colonización del pescado por microorganismos las proteínas desnaturalizadas son más fácilmente degradadas.

Después de la muerte el pescado se descompone rápida y fácilmente, vía interacción de enzimas presentes en el pescado, invasión por microorganismos, reacciones químicas, particularmente con oxígeno y procesos químicos. Para mantener la calidad del pescado es imperativo que los cambios de descomposición sean disminuidos. La forma más simple y conveniente es congelarlo o enfriarlo. La refrigeración es acompañada por adición de hielo picado o por inmersión en tanques de agua de mar refrigerada o conteniendo hielo. La congelación es llevada a cabo en varias formas y ayudan a conservar la temperatura entre -20 y -30°C. Estas formas de conservación son mejoradas si las vísceras son eliminadas antes de la reducción de temperatura (Connell y Hardy 1982).

Los cambios bioquímicos que pueden afectar la composición del pescado están influenciados por un gran número de factores a lo largo del ciclo comercial del producto.

#### **4.5. Contaminación microbiana del pescado.**

##### **4.5.1. Fuentes de contaminación microbiana.**

El ataque microbiano hacia el interior del pescado se inicia en las agallas, ya que son estructuras suaves, húmedas y ricas en sangre, y por tanto representan un espléndido lugar para el crecimiento bacteriano. Debido a que las bacterias crecen rápidamente en las agallas, producen olores desagradables, decoloraciones y limo; la condición de las agallas es frecuentemente usada como índice del grado de deterioro en pescado completo (Chichester y Graham, 1973).

Una práctica común es retirar el intestino tan pronto como sea posible, la razón para esto es que las vísceras son ricas en enzimas y microorganismos, los que incrementan la velocidad de descomposición. El eviscerado puede llevarse a cabo mecánicamente, aunque es raro usarlo debido a que los tamaños de los pescados son muy variados, se realiza generalmente a mano a bordo (Connell y Hardy 1982). En general los pescados pequeños se alteran con más facilidad que los grandes y los eviscerados se autolizan más lentamente que los íntegros, pero éstos últimos son mucho más fáciles de atacar por las bacterias (Frazier, 1976).

Los peces no tienen un esfínter en el ano, la materia fecal suave escurre hacia afuera por un leve cambio de presiones; mientras el pez esté nadando en condiciones sin estrés la materia fecal se disuelve en el agua, pero cuando es capturado ésta se adhiere a la piel. Las heces están cargadas con bacterias de descomposición del pez y son la mayor fuente de bacterias contaminantes. Por tanto la eliminación de las agallas y el eviscerado se debe realizar tan pronto como sea posible (Chichester y Graham, 1973). Si el pescado no se ha eviscerado, los músculos no están contaminados por el contenido intestinal, pero pueden adquirir olor en virtud de la alteración sufrida por el alimento allí almacenado y por la difusión de los productos de descomposición; las bacterias pueden penetrar por las agallas a partir de las cuales se difunden, a través del sistema vascular, por todo el organismo (Frazier, 1976). Si se deja mucho tiempo el pescado sin eviscerar, las paredes del intestino pueden romperse liberando a las bacterias que se encuentran en la cavidad intestinal y colonizar todas las superficies. Cuando la descomposición ocurre desde adentro, se involucra una difusión de compuestos del contenido intestinal descompuesto dentro de las áreas adyacentes del filete (Chichester y Graham, 1973).

Después de que el alimento es parcialmente digerido por el pez, pasa al estómago y al intestino, el cual está cargado con bacterias creciendo activamente. Las enzimas digestivas propias del pez hidrolizan parte del alimento y los organismos de descomposición realizan la hidrólisis del resto de éste. El resultado es una sustancia semilíquida. Después de la muerte, mucho de este alimento semidigerido y las bacterias que lo descomponen permanecen confinadas en el intestino. Sin embargo, algo de los productos malolientes pueden difundirse del intestino, a través de la pared

intestinal y penetrar a la porción comestible del pescado. Esto puede originar olores, algunas veces acompañado por decoloración en la porción de la cavidad intestinal (Chichester y Graham, 1973).

Debido al alto contenido de enzimas proteolíticas en el tracto intestinal del pescado, el proceso autolítico ocurre rápidamente. Las enzimas en las agallas degradan el tejido a péptidos solubles y aminoácidos. El pescado autolizado es un buen medio para el crecimiento microbiano que tiene como resultado una disminución rápida y considerable en la cantidad total de aminoácidos (Bórquez y col., 1994).

Por otra parte las bacterias en la piel están mucho más cercanas al filete que las bacterias del intestino. Por ésta razón el ataque desde la superficie es el que ocurre primero. Además, la piel está en contacto con un área mucho más grande del filete que de la cavidad intestinal.

La importancia relativa de la descomposición proveniente desde afuera o del interior del pescado depende de dos factores principales, de acuerdo a Chichester y Graham (1973):

- Cuanto alimento descompuesto y materia fecal hay en el intestino y
- Como se contaminó la superficie con bacterias de descomposición.

#### **4.5.2. Microflora del pescado.**

Las bacterias que con mayor frecuencia participan en la alteración del pescado son las que forman parte de la flora que se encuentra en la capa mucosa que recubre la superficie externa del mismo y las de su contenido intestinal. Los géneros predominantes varían con la temperatura en la cuales se haya conservado el producto; a las temperaturas de refrigeración generalmente empleadas predominan poblaciones de bacterias psicrotróficas Gram (-) sobre la superficie externa, tales como especies de *Pseudomonas*, a las que siguen en importancia algunos miembros de los géneros *Alteromonas*, *Acromobacter* y *Flavobacterium*, los rangos de población, en piel de pescados recién capturados son: piel  $10^2$ - $10^7$  UFC/cm<sup>2</sup>, agallas  $10^3$ - $10^9$  UFC/g e intestino  $10^3$ - $10^9$  UFC/g (ICMSF, 1980).

Menos frecuentemente, y cuando las temperaturas de conservación son más elevadas se encuentran bacterias pertenecientes a los géneros *Micrococcus* y *Bacillus*. Se han citado casos en los que intervienen otros géneros, tales como *Escherichia*, *Proteus*, *Vibrio* y *Serratia* los cuales pertenecen a la familia *Enterobacteraceae* y *Clostridium*. La mayor parte de éstos crecen sólo a temperaturas ambiente (Frazier, 1976; Pigott y Tucker, 1991) pero se ha demostrado que dependiendo del tiempo y temperatura del transporte a las plantas procesadoras en hielo o agua marina la población bacteriana, debido a su naturaleza psicrótrófica, puede incrementar hasta  $10^4$ - $10^6$  células/cm<sup>2</sup> (Hurst y Collins-Thompson, 1979).

La manipulación frecuente del producto permite la contaminación con bacterias Gram(+), especialmente *Staphylococcus*, así como la introducción de bacterias coliformes fecales (Pigott y Tucker, 1991). Durante el almacenamiento congelado las cepas psicrótróficas se multiplican rápidamente, invaden los tejidos y eventualmente causan putrefacción. Los organismos de los grupos *Pseudomonas-Alteromonas* y *Proteus-Acinetobacter* aumentan en número más rápidamente que otros organismos y en tiempos prolongados de almacenamiento, estos microorganismos llegan a comprender hasta el 80% del total de la flora (Hurst y Collins-Thompson, 1979).

Otra de las fuentes que contribuyen a contaminar el pescado ya en tierra es el hielo ya que si está elaborado con agua contaminada llega a descomponer al pescado más rápidamente (Chichester y Graham, 1973). En la Tabla 3 se presenta un resumen de los cambios ocurridos durante la descomposición del pescado, mostrando los cambios en el tejido, los cambios sensoriales y químicos y la cuenta bacteriana total con respecto al tiempo durante el almacenamiento en hielo.

En la Figura 1 se observa el desarrollo de bacterias en el pescado mantenido en hielo durante 0, 5 y 10 días. Después de que el pescado es capturado y almacenado, la microflora está dominada por el género *Pseudomonas* debido a la temperatura de almacenamiento. Las cepas de *Pseudomonas* más importantes en la descomposición del pescado incluyen los que oxidan carbohidratos y los que producen pigmentos. Después de 5 días, el 20% de la flora está formado por *Pseudomonas* aumentando a los 10 días hasta más del 50%. Otros géneros importantes presentes son el de *Acinetobacter/Proteus* que aumentan de más del 20% de los primeros días a casi 80% después de 5

días, y disminuyen a 50% a los 10 días. Los otros microorganismos importantes presentes son *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Coryneformes* o *Bacillus* y *Coliformes*, que desaparecen rápidamente al final de los 10 días habiendo iniciado con cerca del 25% de la flora total (Hurst y Collins-Thompson, 1979).

Tabla 2. Cambios ocurridos durante la descomposición del pescado. (ICMSF, 1980).

Estado	Cambios en el tejido <sup>a</sup>	Cambios sensoriales	Cuenta bacteriana	Cambios químicos <sup>a</sup>
Estado I (0-5 días en hielo)	-Rigor mortis -ATP→inosina -Ligero incremento de TMA -Cambios en tipos bacterianos	-Ojos brillantes -Carne firme -Buen color -Agallas brillosas -Olor fresco	$10^2 - 10^3 / \text{cm}^2$	-TMA $\leq 1-1.5$ mg % -SRV $\leq 2-8$ unidades
Estado II (5-10 días en hielo)	-Crecimiento bacteriano llega a ser aparente -Inosina→hipoxantina -OTMA→TMA NH <sub>3</sub> incrementa	-Ojos comienzan a opacarse -Agallas palidecen -Piel palidece -Olor neutro o ligeramente a pescado -Textura suave	$10^3 - 10^6 / \text{cm}^2$	-TMA $\leq 5$ mg % -SRV 5-10 unidades -BVT $\leq 15$ mg %
Estado III (10-14 días en hielo)	-Crecimiento bacteriano rápido -Penetración de tejido -Hipoxantina→xantina, ác. úrico, etc. -TMA incrementa rápidamente -AVT y BVT incrementan	-Ojos hundidos -Agallas decoloradas y lamosas -Piel blanquecina -Olor agrio y a pescado -Textura suave	$10^6 - 10^8 / \text{cm}^2$	-TMA $\sim 10$ mg % -SRV $\sim 10-15$ unidades -BVT 20-30 mg % -AVT 15-20 mg %
Estado IV (Más de 24 días en hielo)	-Número de bacterias estacionario -Algunos cambios en especies -Deterioro general de la carne -AVT y BVT incrementan rápidamente -TMA incrementa a grandes niveles -Comienza la proteólisis -Se forman ác. sulfhídrico y otros	-Ojos opacos y sumidos -Agallas blancas y lamosas -Piel muy lamosa -Textura muy suave -Olor desagradable	$\sim 10^8 / \text{cm}^2$	-TMA $> 10$ mg % -SRV $> 10-15$ unidades -BVT $> 30$ mg % -AVT $> 60$ mg % -ác. sulfhídrico, indol, etc. detectables

<sup>a</sup>: TMA: trimetil amina, expresados como mg/100g de pescado. AVT: ác. volátiles totales expresadas como mg/100g pescado. BVT: bases volátiles totales expresadas como mg/100 g pescado. SRV: sustancias reductoras volátiles expresadas como mg/100g pescado.



La capacidad de las *Pseudomonas* para dominar a la microflora se debe en parte a su corta fase lag de crecimiento a bajas temperaturas. La diversidad de la actividad metabólica de este grupo causa los cambios bioquímicos mayores. Shewan (1961), sugirió que las *Pseudomonas* utilizan varios compuestos simples tales como creatina, óxido de trimetilamina, taurina y aminoácidos en una mayor tasa que otros géneros. Los compuestos resultantes asociados con el rompimiento de tejidos del pescado incluyen sulfuro, trimetilamina, indol y amonio (Hurst y Collins-Thompson, 1979; López-Sabater y col., 1994).

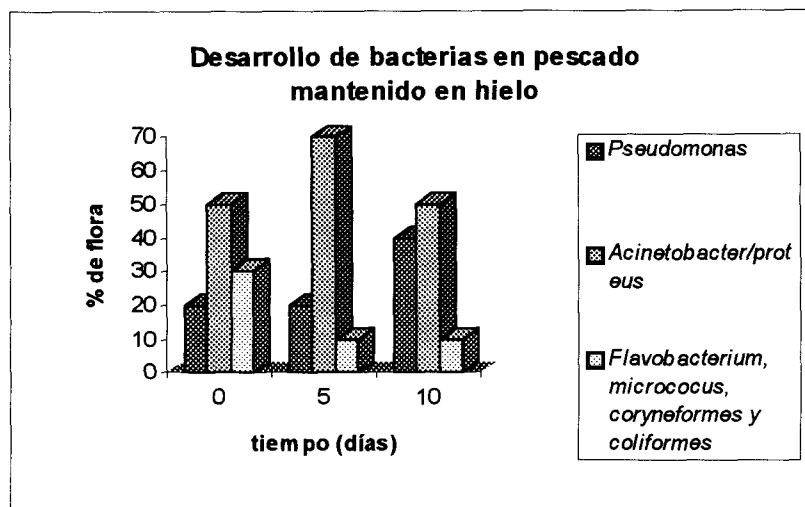


Figura 1. Desarrollo de bacterias en pescado mantenido en hielo. (Hursts y Collins-Thompson, 1979).

## 4.6. Formación de aminas biogénicas.

### 4.6.1. Importancia.

Los compuestos con varios grupos amino se denominan poliaminas, son moléculas policatiónicas que están implicadas en la síntesis de DNA, RNA y proteínas. El término de aminas biogénicas se refiere a las aminas volátiles y no volátiles tales como: putrescina, cadaverina, espermidina, histamina, triptamina, agmanatina, ornitina, tiramina y espermina (White y Tabor, 1985; Rawles y col., 1996). Estas aminas biogénicas son bases orgánicas de bajo peso molecular alifáticas, alicíclicas o heterocíclicas y poseen actividad biológica, son formadas y degradadas como resultado de la actividad metabólica normal en animales, plantas y microorganismos, las rutas de su formación se muestran en la Figura 2, adaptada de Hálasz y col. (1994).

Muchas aminas volátiles producen alteraciones en el aroma de los alimentos, otros dan olores amoniacales y putrefactos (putrescina y cadaverina), por esta razón su cuantificación se ha tomado como un índice de la calidad microbiológica del pescado (Gallardo y col., 1983; Sumner y Taylor, 1989). Se ha demostrado que la histamina se destruye con tratamientos severos de 116° C durante 90 min, lo que es una razón para considerarla como un índice de calidad de los alimentos (Ienistea, 1973).

Las monoaminooxidasas y las diaminooxidasas juegan un papel principal en la degradación de aminas en el cuerpo humano. Bajo condiciones normales en humanos, las aminas se absorben de los alimentos y son rápidamente detoxificadas por la acción de la enzima aminooxidasa o por conjugación, pero en el caso de individuos alérgicos o en presencia de inhibidores de la aminooxidasa las aminas biogénicas se pueden acumular. Las aminas secundarias (putrescina y cadaverina) pueden llegar a reaccionar con nitritos y formar aminas carcinogénicas (Halász y col., 1994), también pueden potenciar el aumento de la toxicidad de histamina en humanos por la depresión en la detoxificación de la histamina (Maga, 1978; Halász y col., 1994) ya que actúan sinérgicamente y como competidores para la diaminooxidasa bajo ciertas condiciones (Middlebrooks y col., 1988).

Los prerequisites para la formación de aminas biogénicas en alimentos son la disponibilidad de aminoácidos libres, la presencia de microorganismos productores de descarboxilasas y condiciones que permiten el crecimiento bacteriano y la actividad de la descarboxilasa (Chen y col., 1989). En los alimentos, la concentración máxima de histamina permitida por la Comunidad Económica Europea es de 200 mg/kg (López-Sabater y col., 1994).

Los efectos más importantes de la histamina son: dilatación de los capilares sanguíneos, aumento de la secreción gástrica, en humanos causa trastorno gastrointestinales, cutáneos y neurológicos (Arnold y Brown, 1978; Ienistea, 1973), en pollos por su parte, al ser incorporado a alimentos puede producir erosión de molleja o vómito negro (Osuna, 1984; Castro, 1987; Castro 1992) también provoca estimulación del sistema nervioso autónomo (Ienistea, 1973) y es un mediador primario de síntomas inmediatos notados en respuestas alérgicas.

Kimata y Kawai (1961) estudiaron la producción de histamina en condiciones asépticas durante el rompimiento autolítico de proteínas de algunas variedades (entre ellas macarela, atún, y bonito), encontraron que muy poca histamina fué formada por enzimas propias, la producción fué influenciada por el pH y la temperatura del medio ambiente, el pH óptimo a 35°C estuvo entre 3.5 y 4.5, éstos autores observaron que la histamina fué producida a partir de histidina de las proteínas por microorganismos putrefactivos o de descomposición.

Kimata (1961) menciona que desde 1939, ya se había reportado que grandes cantidades de histamina eran producidas en el tejido muscular de macarela (*Scomber japonicus*) aún cuando éste fué tratado con los siguientes antisépticos: 0.4% de cloro libre; 0.5% de  $\alpha$ -naftol y 0.5%  $\beta$ -naftol. El tratamiento fué continuado por 2 días a 24-25°C. Se concluyó que la histamina había sido producida por autólisis. En ese mismo trabajo el autor concluye que los extractos de pescado de la familia de los escómbridos presentan un sabor amargo o pungente y lo anterior está relacionado con la presencia de histamina, la pungencia aumenta con el avance de la descomposición. El sabor pungente es muy notorio en la carne de la zona dorsal (Yamanaka y col., 1982).

La proteólisis, autolítica o bacteriana, juega un papel muy importante en la liberación de histidina (Sumner y Taylor, 1989), se puede comprobar porque a medida que el proceso de descomposición transcurre la cantidad de histamina aumenta (Yamanaka y col., 1982). Lo anterior es reforzado por los estudios de López-Sabater y col (1995), en donde determinaron la cantidad de histamina formada en músculo de pescado y en un caldo enriquecido con histidina, los resultados fueron que en el primero la concentración de histamina fue considerablemente menor a la observada en el segundo, los autores concluyeron que los resultados anteriores se debieron a la baja disponibilidad de histidina en el tejido muscular. Al inocular un microorganismo histaminogénico potente tal como *Morganella morganii* en músculo estéril aunque fuera en alta concentración ( $10^5$  células/g) éstos no tenían un acceso fácil a la histidina y necesitaban la presencia de bacterias psicrotrofas tales como *Pseudomonas* o *alteromonas*, bacterias relacionadas a la descomposición y conocidos por ser proteolíticas haciendo disponible a la histidina.

Entre los primeros estudios acerca de la formación de histamina y de otras aminas se postuló que las bacterias las producían como una forma de protección contra el medio ambiente. Eitenmiller y col (1981)<sup>7</sup> citan una teoría propuesta desde 1928, en donde se postula la acción protectora por la formación de compuestos finales que remedian la condición microambiental del pH bajo; esto se corrobora cuando se obtiene la máxima actividad específica a niveles de pH que tienden a inhibir el crecimiento, por lo cual dicha teoría permite pensar la presencia de la inducción de ciertas enzimas que producen compuestos que remediarian el bajo pH tales como las enzimas amino descarboxilantes. El intervalo de pH para la inducción de histidín descarboxilasa es entre 5.0 y 5.5 (Ienistea, 1973). Se ha demostrado que a un pH inicial de 5.3 la formación de histidín descarboxilasa de cepas de *Klebsiella* y *Morganella* es mayor (Chen y col., 1989). Excepto para *Hafnia*, no se ha observado actividad apreciable a pH alcalino. La máxima actividad de la enzima es cercana a 6.5, disminuyendo considerablemente hacia ambos lados de este valor. El pH normal del músculo de pescado de la familia de los escómbridos (pH 6.5) corresponde a los niveles requeridos para la síntesis de enzima y para la actividad óptima de la enzima.

Las condiciones de temperatura que maximizan la síntesis de la enzima, la descarboxilación de histidina y el crecimiento celular son diferentes: a 24°C el crecimiento es mínimo mientras que a 37°C ocurre el máximo crecimiento, pero se ha observado la disminución de la producción de la enzima, especialmente a 42°C, probablemente dicha disminución sea el resultado de la termolabilidad de la histidín descarboxilasa, la máxima actividad se ha encontrado a 37°C. La temperatura de almacenamiento es un factor crítico que influye en la formación de histamina en el atún (Eitenmiller y col., 1981).

La histidina presente en el músculo actúa como un inductor y además es el medio ambiente ideal para la formación de histamina. *Morganella morganii*, puede sintetizar rápidamente histidín descarboxilasa y causar la acumulación de histamina a niveles que pueden ser tóxicos (Eitenmiller y col., 1981). La histamina es producida en grandes cantidades durante la fase final del crecimiento logarítmico y durante la fase estacionaria, la temperatura provoca una mayor acumulación de histamina la que también varía con la cepa y el tiempo de incubación (Behling y Taylor, 1982; Taylor y Woychic 1982).

## **5. Materiales y Métodos.**

### **5.1. Preparación del pescado.**

Se adquirió un atún en la Nueva Viga, con un peso de 8.6 Kg proveniente de Veracruz y capturado la noche anterior a la compra. El atún fue eviscerado, lavado y trasladado al laboratorio en la UAMI, se procedió a cortarlo con cuchillo y segueta en rebanadas de 3 cm aproximadamente, dichos cortes se realizaron a lo largo del atún, cada rebanada fue después dividida en dos secciones. Se obtuvieron 13 rebanadas, por lo tanto 26 secciones (1a, 1b, 2a, 2b.....13a, 13b). Las secciones fueron puestas en bolsas y selladas al vacío, manteniéndose en congelación a -20°C hasta su uso. Se asignaron numeros aleatorios a cada sección ya que se eligieron al azar para su análisis.

### **5.2. Cuenta de microorganismos.**

Cada sección del pescado se descongeló, se dividió en tres partes y se colocó cada una de ellas dentro de una bolsa, a diferentes condiciones especificadas en los resultados. Se realizó el análisis microbiológico en músculo, colocando 10 g de músculo en 90 ml de agua estéril, haciendo las diluciones necesarias. El análisis microbiológico también se realizó en la piel: frotando 1 cm<sup>2</sup> de la piel con un hisopo estéril, éste se colocó en un tubo con 10 ml de agua estéril (dilución 10<sup>-1</sup>), se sembraron diferentes diluciones. Se inoculó en cajas con agar nutritivo para cuenta total y en cajas con medio Niven modificado (Anexo) para cuenta histaminogénica.

Las cajas con agar nutritivo para cuenta total se inocularon a los diferentes días de almacenamiento, se incubaron a 37° C y durante 24 horas con las diluciones necesarias.

Las cajas con Medio Niven modificado para cuenta de bacterias histaminogénicas se inocularon a los diferentes días de almacenamiento, se incubaron a 37° C y durante 24 horas con las diluciones necesarias.

### 5.3. Identificación de bacterias histaminogénicas.

Las bacterias histaminogénicas se aislaron de la piel del atún, haciendo un frotis de piel con un hisopo e inoculado directamente en caja Petri con medio Niven. Cuatro cepas crecieron rápidamente, (antes de 24 h) en el mismo medio, presentando la coloración que indica su actividad histaminogénica. Se observó que el cambio de pH indicado por la coloración se difundió con gran velocidad. Se realizaron resiembras hasta tener la seguridad de que la colonia era pura. Las cepas histaminogénicas se conservaron en medio TSAH (Anexo), y se identificaron por los métodos bioquímicos reportados por Mac Faddin (1993). Paralelamente se utilizó un sistema API20E (Biomérieux, Marcy l'Etoile-Francia) específicamente para enterobacterias y otros bacilos Gram(-), que consiste en un conjunto de pruebas bioquímicas que posteriormente se contrastan con una base de datos la cual da la probabilidad que se trate de cierto género y especie.

Se realizaron las pruebas bioquímicas a las 4 cepas aisladas denominadas: C1, C2, C3 y C4, además de una cepa control de *Morganella morganii* (M3) proporcionada por la Dra. Cristina Martí de la Universidad de Concepción Chile. Las pruebas bioquímicas que se aplicaron fueron: Tinción Gram, Catalasa, Oxidasa, O-F (Hugh y Leifson), Movilidad, Fermentación de glucosa, Agar hierro de Kligler (AHK), crecimiento en cianuro de potasio (KCN), Ornitin descarboxilasa, Lisin descarboxilasa, Citrato de Simmons, Hidrólisis de Urea, Sacarosa, Sorbitol, Rafinosa, Indol, Rojo de Metilo (Anexo).

### 5.4. Determinación de histamina.

#### 5.4.1. Método enzimático. (López-Sabater y col., 1994)

La determinación de histamina se realizó en el caldo NB de cultivo a través del método enzimático (Anexo). El método consiste en la acción a pH de 6.8, de la enzima diaminooxidasa (DAO) sobre la histamina presente, ya sea en la curva patrón o en en caldo de cultivo. Como producto de la degradación de la histamina se forma acetaldehído, imidazol, amonio y peróxido de hidrógeno; se añade una segunda enzima, la peroxidasa, que reduce los compuestos anteriores y, posteriormente se añade leucocristal violeta (cromógeno) que en su forma reducida es incoloro, pasa a su forma oxidada (cristal violeta) que es la forma colorida; se mide la absorbancia a 596 nm;

interpolando en una curva patrón se determina la cantidad de histamina presente. A mayor concentración de histamina mayor es la cantidad de peróxido formado mayor la cantidad del cromógeno oxidado, por lo tanto se obtiene una coloración más intensa. Cada análisis fué comprobado con una curva patrón construida para ése análisis en particular, se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu. Se observó que se conservaba la linealidad entre las concentraciones de 0.027 y 0.180  $\mu\text{mol}$  de histamina/ml, obteniéndose siempre coeficientes de determinación mayores a 0.95.

#### 5.4.2. Cromatografía de alta resolución (HPLC). (Herman y col., 1995)

La histidina y la histamina fueron determinadas mediante el uso de un cromatógrafo de alta resolución (HPLC) marca Waters (Milford, MA) equipado con una bomba 626 y detector de fotodiodo 994 manejado por medio de un programa Millenium 2010, se utilizó una columna de intercambio catiónico débil de 5 x 50 mm CM-15 HR con tamaño de poro de 1000 Å (Waters; Milford, MA). La fase móvil fué una mezcla de amortiguador de fosfato de sodio 0.5 M, pH 5.0 y agua, al inicio y durante 10 min 10% del amortiguador; seguido de un aumento en forma exponencial al 60% del amortiguador durante los 15 min siguientes. Al término de ése tiempo se mantuvieron condiciones isocráticas al 60% del amortiguador durante 25 min más. La columna fué equilibrada durante 15 min con las condiciones iniciales. Las separaciones se llevaron a cabo a un flujo de 0.25 ml/min, se utilizó un volumen de inyección de 50  $\mu\text{l}$ . La detección se realizó a 210 nm. Los tiempos de retención de los patrones fueron de 5.50 y de 33.89 min para histidina e histamina, respectivamente. Se analizaron cultivos en medio NB y en el medio de proteínas sarcoplásmicas de atún (Anexo).

### 5.5. Cinéticas de crecimiento y formación de histamina.

Se realizaron tanto para *Morganella morganii* (M3) como para *Serratia liquefaciens* (C3) en caldo NB, se ajustó el pH 5.3 y 6.0 antes de esterilizar el medio. Los medios se inocularon con 1% de inóculo madre (se preparó inoculando 1 asada de la cepa en estudio en caja con medio TSAH, incubado por 24 h. Se inoculó 1 asada de este cultivo a un tubo con 9 ml de medio NB, y se incubó por otras 24 h, posteriormente se tomó 1 ml de cultivo y se incubó en un otro tubo con 9 ml

de NB durante 18 horas). Una vez inoculado el medio se colocaron 4 a 4.5 ml, en tubos de 13x100 mm con tapón de rosca previamente esterilizados. La mitad de los tubos se incubaron a 19°C y la otra mitad a 37°C. Por lo tanto se obtuvieron 4 tratamientos para el medio NB: A) pH 5.3 a 19°C, B) pH 5.3 a 37°C, C) pH 6.0 a 19°C y D) pH 6.0 a 37°C. Se tomaron muestras a varios tiempos (0, 2, 7, 11, 27, y 34 horas), por duplicado. Se determinaron las UFC/ml de cultivo para cada tiempo, se centrifugó a 4000 rpm 15 min y se filtró cada muestra en membrana Millipore (Bedford, MA) de 0.22  $\mu$ m, las muestras se congelaron hasta la posterior determinación de histamina. La determinación de histamina, para M3 a diferentes valores de pH se llevó a cabo por el método enzimático reportado por López-Sabater y col (1994) y para la cepa C3 por método de HPLC para histidina e histamina.

Las cinéticas de crecimiento y formación de histamina en medio de proteínas sacroplásmicas de atún (Anexo) se realizó únicamente a pH 5.3 y 37°C, tomando muestras a diferentes tiempos hasta las 35.5 h. Se determinaron histidina e histamina por el método de HPLC.

## **5.6. Análisis de resultados.**

Las curvas obtenidas para crecimiento, producción de histamina y degradación de histidina se analizaron por medio de un graficador Excel cargado en una computadora PC. Estas cinéticas fueron ajustadas a regresiones polinómicas.



## 6. Resultados y discusión.

### 6.1. Cuentas microbianas.

Como era de esperarse, la temperatura tuvo un efecto definitivo en el crecimiento y proliferación de microorganismos, reportados como cuenta total, tanto en músculo almacenado a 15°C (Tabla 4) como en la piel almacenada a temperatura ambiente, esto es, alrededor de 22°C (Tabla 5) empacados sin vacío. Se encontró una carga mucho mayor en piel que en el músculo. Estos resultados están en concordancia con lo observado por otros autores (Chichester y Graham, 1973) en el sentido de que la piel es contaminada directamente tanto por los desechos intestinales como por el manejo del animal después de la captura.

Tabla 4. Cuenta total de músculo. Mantenido a 15°C, durante 0, 3 y 6 días, sin vacío, agar nutritivo, incubadas a 35-37°C.	
Tiempo (días)	UFC/ g
0	$8.5 \times 10^3$
3	$2.2 \times 10^6$
6	$1.6 \times 10^7$

Tabla 5. Cuenta total de piel. Mantenido a temperatura ambiente, durante 0, 3 y 6 días, sin vacío, agar nutritivo, incubadas a 35-37°C.	
Tiempo (días)	UFC/ cm <sup>2</sup>
0	-----
3	$1.3 \times 10^{11}$
6	$3.9 \times 10^{15}$

En muestras de músculo almacenadas al vacío y a 4°C (Tabla 6) las cuentas totales fueron considerablemente menores (del orden de  $10^4$ ) debido al efecto del vacío sobre la proliferación microbiana, aunque sería de esperarse que las poblaciones de algunos microorganismos, como bacterias lácticas y otros anaerobios o microaerófilos, aumentarían. Obviamente, la temperatura de refrigeración también afectó al crecimiento microbiano.

Tabla 6. Cuenta total de músculo. Mantenido a 4°C, durante 0, 2 y 4 días, con vacío. Agar nutritivo, incubadas a 35-37°C.	
Tiempo (días)	UFC/g
0	1.4 x 10 <sup>4</sup>
2	3.2 x 10 <sup>4</sup>
4	9.12 x 10 <sup>4</sup>

La Tabla 7 muestra las cuentas de bacterias histaminogénicas en piel durante 6 días de almacenamiento. Es de hacerse notar que no se encontraron bacterias histaminogénicas en el músculo estudiado, lo anterior puede deberse al poco tiempo de almacenamiento, ya que en piel si se encontraron.

Tabla 7. Cuenta de bacterias histaminogénicas de piel. Mantenido a temperatura ambiente, durante 0, 3 y 6 días, sin vacío, Medio Niven (MN), incubadas a 35-37°C.	
Tiempo (días)	UFC/ cm <sup>2</sup>
0	0
3	2.1 x 10 <sup>6</sup>
6	4.1 x 10 <sup>9</sup>

La forma en la cual la piel llega a contaminarse es un factor de gran importancia. Las bacterias histaminogénicas son generalmente enterobacterias, por ello la fuente de contaminación principal son el contenido intestinal y las heces. Debido a que la piel del atún es muy gruesa y resistente, la penetración de bacterias a partir de la superficie es difícil, por lo que probablemente se requiera mayor tiempo del estudiado para detectar las bacterias histaminogénicas en músculo.

## 6.2. Identificación de cepas.

Las cepas histaminogénicas obtenidas de piel se identificaron como cuatro diferentes, las que se etiquetaron como C1, C2, C3 y C4. Como medio de comparación se incluyó en esta parte del estudio la cepa de *Morganella morganii* (M3) ya identificada y caracterizada.

Las pruebas bioquímicas realizadas para identificar a estas cepas se reportan en el Anexo. Los resultados de la identificación se muestran en la Tabla 8.

Tabla 10. Resultados de la identificación de bacterias histaminogénicas de atún

Prueba	C1	C2	C3	C4	M3
Tinción Gram	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Prueba de catalasa	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Prueba de oxidasa	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
O-F (Hugh y Leifson)	F	F	F	F	F
Movilidad	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Fermentación de glucosa	(A)	(A)	(A)	(A)	(A)
Agar hierro de Kligler (AHK)	A/A gas	A/A gas	A/A gas	A/A gas	Alc/A gas
Crecimiento en KCN	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Ornitina descarboxilasa	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
Lisina descarboxilasa	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
Citrato de Simmons	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)
Hidrólisis de urea	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
Sacarosa	(-)	A	A	A	(-)
Sorbitol	(-)	A	A	A	(-)
Rafinosa	(-)	A	A	A	(-)
Producción de indol	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
Rojo de metilo	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
Identificación final	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Serratia rubidae</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Morganella morganii</i>

Nota: ninguna cepa produjo SH<sub>2</sub>.

Las cepas de enterobacterias comparten ciertas características que las hacen fácilmente diferenciables de otras familias (Bergey's, 1992), tal como es la tinción Gram (-), catalasa (+), oxidasa (-), pero al mismo tiempo, es más difícil saber la cepa a la cual pertenece cada aislado, lo anterior se lleva a cabo más fácilmente mediante la utilización de baterías de pruebas bioquímicas. Dependiendo de los resultados se inoculan de nuevo las cepas objeto de estudio en otras baterías y así sucesivamente, estas pruebas secuenciadas se simplifican por el uso de galerías con medios de cultivo específicos deshidratados, fáciles de usar, en las que, a partir de una suspensión de una colonia aislada previamente, se inoculan las galerías con un mínimo de volumen como en el sistema desarrollado por Biomerieux, Inc. El sistema ApiRapiD20E da resultados en 4-6 horas, o en el caso de Api20E se obtienen los resultados en 24 h. Para algunas pruebas hay que añadir reactivos para

provocar el revelado. Los resultados se comparan con una base de datos. La desventaja de estas galerías es que son muy costosas y los resultados son solamente tentativos.

La cepa M3, se identificó con sistema Api20E, con una confiabilidad del 99% como *Morganella morganii*. La identificación de ésta cepa se complementó con pruebas de identificación bioquímica según reporta McFaddin (1993). Los medios individuales para éstas pruebas fueron preparados en el laboratorio. Con el mismo método se realizaron pruebas presuntivas identificándolas como: la cepa C1 como *Hafnia alvei*, la cepa C2 como *Serratia rubidaea*, la cepa C3 como *Serratia liquefaciens* y la cepa C4 como *Enterobacter agglomerans* (Ver tabla 8).

La descripción que da el Manual Bergey's (1994) para las diferentes géneros aislados es:

**Hafnia:** única especie *Hafnia alvei*: Bacterias alargadas, de 1µm de diámetro y 2-5 µm de longitud. Gram(-). Móviles. Anaerobias facultativas. Temperatura óptima: 30-37°C. D-glucosa y otros carbohidratos son catabolizados con la producción de ácido y gas. Son oxidasa negativos y catalasa positivos; indol negativos y no utilizan citrato de Simmons, la mayoría son rojo de metilo y Voges-Proskauer positivos. Lisina y ornitina descarboxilasa positivos y arginin dehidrolasa negativos. Ureasa negativo y no producen sulfhídrido, crecen en KCN. Presente en la heces humanas y de otros animales incluyendo pájaros, suelo, agua y productos lácteos. Son patógenos oportunistas.

**Serratia:** Bacterias alargadas, de 0.5-0.8 µm de diámetro y 0.9-2.0 µm de longitud. Gram(-). Móviles. Anaerobias facultativas. Temperatura óptima: 30-37°C. D-glucosa y otros carbohidratos son catabolizados con la producción de ácido y regularmente gas. Son oxidasa negativos y catalasa positivos; indol negativos (excepto *S. odorifera*) citrato de Simmons positivo, rojo de metilo varía y Voges-Proskauer usualmente positivos. Lisina descarboxilasa la mayoría de las veces positivo, arginin dehidrolasa negativo y ornitina descarboxilasa negativo. No produce sulfhídrido. La urea no es hidrolizada. *Serratia liquefaciens*: rojo de metilo, lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa positivo. Pocas veces crecen en KCN.

**Enterobacter:** Bacterias alargadas, de 0.6-1.0  $\mu\text{m}$  de diámetro y 1.2-1.3  $\mu\text{m}$  de longitud. Gram(-). Móviles. Anaerobias facultativas. Temperatura óptima: 30-37°C. D-glucosa y otros carbohidratos son catabolizados con la producción de ácido y gas. Son oxidasa negativos y catalasa positivos; indol negativos y utilizan citrato de Simmons. Varía en el resultado de rojo de metilo. Lisina descarboxilasa negativos y ornitina descarboxilasa la mayoría positivos. No producen sulfhidrilo. Ampliamente distribuido en la naturaleza en agua fresca, suelo, plantas, vegetales y heces de humanos y animales. Patógenos oportunistas. *E. agglomerans*: ornitina descarboxilasa negativos

**Morganella:** única especie *M. morganii*: Bacilos alargados, de 0.6-0.7  $\mu\text{m}$  de diámetro y 1.0-1.7  $\mu\text{m}$  de longitud. Gram(-). Temperatura óptima 37°C. D-glucosa y D-manosa son los únicos carbohidratos que cataboliza con producción de ácido y gas. Oxidasa negativos, catalasa positivos, indol y rojo de metilo positivos, Voges-Proskauer y citrato de Simmons negativos, lisina descarboxilasa y arginin dehidrolasa negativos y ornitina descarboxilasa positivo. Hidroliza urea, crece en KCN. No produce sulfhidrilo. Descompone tirosina, produce aclaramiento en un medio que contenga el aminoácido insoluble. Presente en heces de humanos, perros y otros mamíferos y reptiles. Son invasores oportunistas secundarios, se han aislado de bacteremias, tracto respiratorio, heridas e infecciones en vías urinarias.

Se observó que las colonias a nivel macroscópico de estas cepas eran pequeñas, crecían rápido a 37°C en agar nutritivo, la cepa C3, tuvo la particularidad de que sus colonias eran más grandes que de las otras, además de que eran del tipo mucoso. Las colonias de la cepa M3 fueron las más pequeñas, no fueron mucosas. El color de las colonias de las cuatro cepas fué crema opaco. Los bordes fueron continuos y únicamente cuando se conservan por períodos largos (más de dos meses) en el refrigerador, las colonias tomaban apariencia rugosa.

Las cepas histaminogénicas aisladas ya han sido reportadas por varios autores como se muestra en la Tabla 3. En los estudios reportados los investigadores han usado diferentes métodos para determinar la presencia de las bacterias histaminogénicas y su actividad. Los métodos reportados muestran gran heterogeneidad en la actividad histaminogénica de una cepa, por ejemplo, Ababouch y col., (1991) reportaron la formación de histamina (determinada mediante el método de

la AOAC) de varias cepas de *M. morgani* desde 11.75 hasta 17.43  $\mu\text{mol/ml}$  en un caldo de proteínas de sardina suplementado con histidina e incubadas a 35°C durante 24 horas, mientras que Eitenmiller y col., (1981) reportaron la formación de histamina (determinada por método espectrofluorométrico) para diferentes cepas del mismo microorganismo, aisladas de sardina, desde 0.3-1.0  $\mu\text{mol/ml}$  en medio sintético suplementado con histidina y de 2.3-24  $\mu\text{mol/ml}$  en un medio de proteínas de atún después de 12 horas de crecimiento a 35°C; ésto se debe a que las cepas varían su actividad al variar ligeramente las condiciones de cultivo, y es por ello la variabilidad en los resultados de formación de histamina al igual que el método utilizado.

### 6.3. Cinéticas de crecimiento y formación de histamina.

Primero que nada se realizó una prueba preliminar sobre caldo Niven (misma composición pero sin agar) en tubo, obteniéndose los siguientes resultados en la potencia histaminogénica.

Cepa	Potencia histaminogénica
C1	+
C2	++
C3	+++
C4	++
M3	+++

Mediante los resultados de la prueba anterior se concluyó que la cepa que mayor cantidad de histamina producía era C3 (*Serratia liquefaciens*) y la que menor producción tenía era C1 (*Hafnia alvei*). Por lo tanto se procedió a conocer el efecto de crecimiento y formación de histamina por la cepa C3 a las condiciones que siguen y además se comparó M3 como control. La cepa C1 se probó a las condiciones del tratamiento b únicamente.

Tratamiento	Condiciones
a	pH 5.3, temperatura 19°C
b	pH 5.3, temperatura 37°C
c	pH 6.0, temperatura 19°C
d	pH 6.0, temperatura 37°C

**6.3.1. Determinación del crecimiento de la población de *Morganella morganii* en medio NB y su producción de histamina, analizado por el método enzimático.**

Las Figuras 3a a 3d muestran el crecimiento de la población de *M. morganii* bajo los cuatro tratamientos de pH y temperatura, así como la formación de histamina. En los cuatro casos el crecimiento se ajustó a una regresión polinomial del tipo:  $Y = b_0 + b_1(x) + b_{11}(x)^2 + \epsilon$ , obteniéndose coeficientes de determinación ( $R^2$ ) superiores a 0.90.

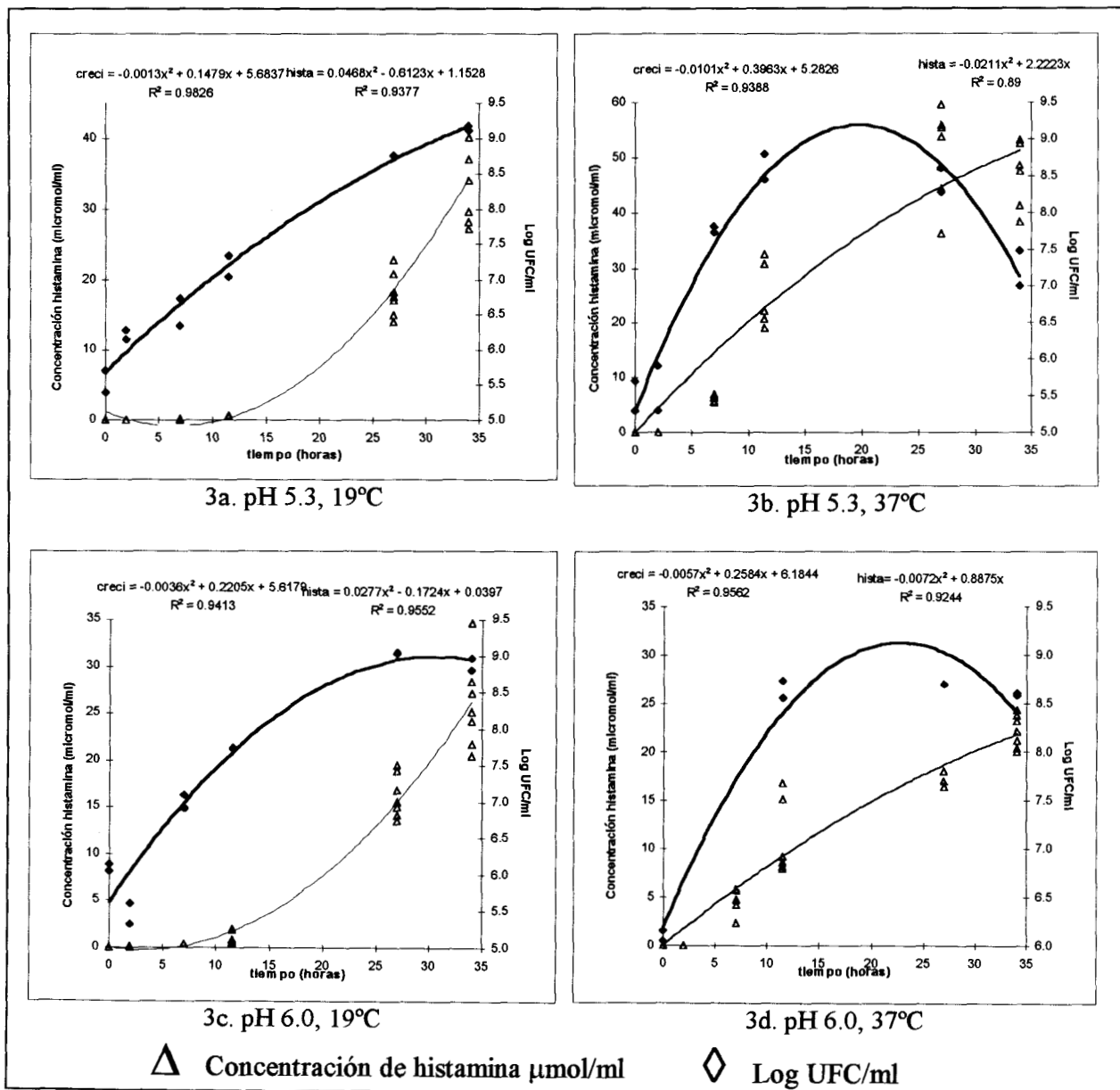


Figura 3. Crecimiento y formación de histamina por *Morganella morganii* en caldo NB.

A temperaturas de 37°C se observó un mayor efecto cuadrático en la población de bacteriana aproximadamente a las 20 horas, disminuyendo posteriormente. No así en el caso de almacenamiento a 19°C en donde la población aumenta consistentemente con un crecimiento menos pronunciado a partir de las 25 horas. Comparando las cuatro curvas de crecimiento (Figura 4) se obtuvo un máximo de crecimiento a las 18 horas a 37°C (9.2), si bien, las curvas de crecimiento a 19°C llegaron a valores de 9.3 y 9.5 a las 35 horas.

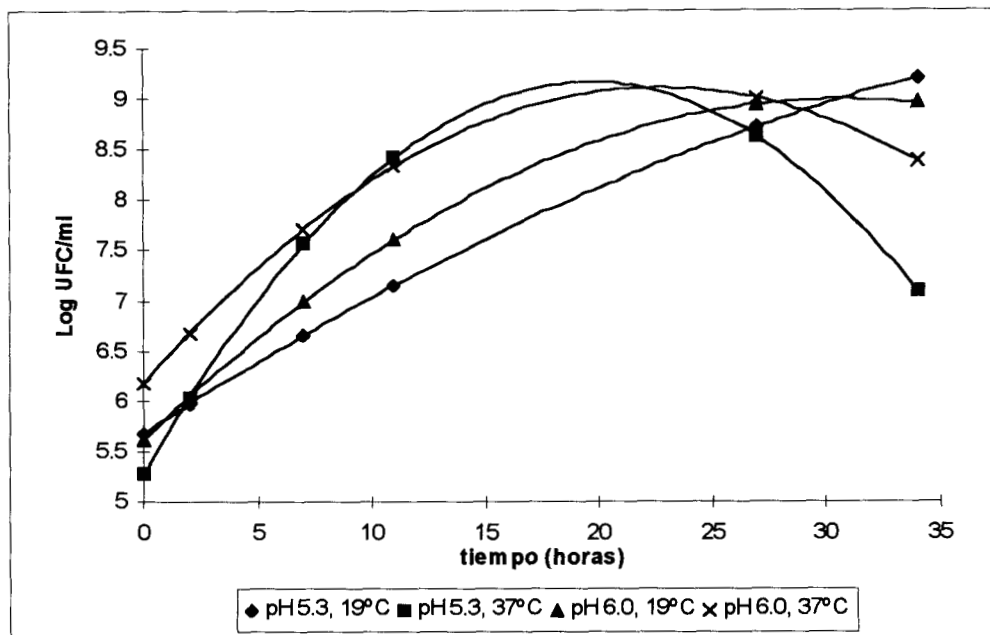


Figura 4. Comparación del crecimiento de *Morganella morganii* en los 4 tratamientos estudiados.

En cuanto a la formación de histamina en los cuatro tratamientos, los datos fueron ajustados también a una regresión polinomial del tipo de la indicada anteriormente, encontrándose de igual manera coeficientes de determinación ( $R^2$ ) superiores a 0.90

Se encontró que la concentración de histamina en el medio aumentaba con el tiempo de estudio, incluso en los tratamientos mostrados en las Figuras 3b y 3d, a 37°C en los que la población bacteriana disminuye a partir de las 20 horas.



Comparando las curvas de producción de histamina de los cuatro tratamientos (Figura 5), se observó que la incubación a 37°C y pH 5.3, propicia la mayor producción de histamina. Aunque la población de *M. morganii* disminuye a partir de las 20 horas, la producción sostenida de histamina se puede deber a que este microorganismo puede tener la habilidad de producir o liberar histamina durante la fase estacionaria o de muerte, este tipo de resultados también fueron obtenidos por Behling y Taylor (1982), en donde reportan una disminución en el crecimiento mientras que la histamina se acumula de 40-45  $\mu\text{mol/ml}$  a 30°C en 72 horas; dentro de los resultados obtenidos en el experimento estudiado se llegó a obtener hasta 50  $\mu\text{mol/ml}$  a 37°C en 34 horas a pH 5.3.

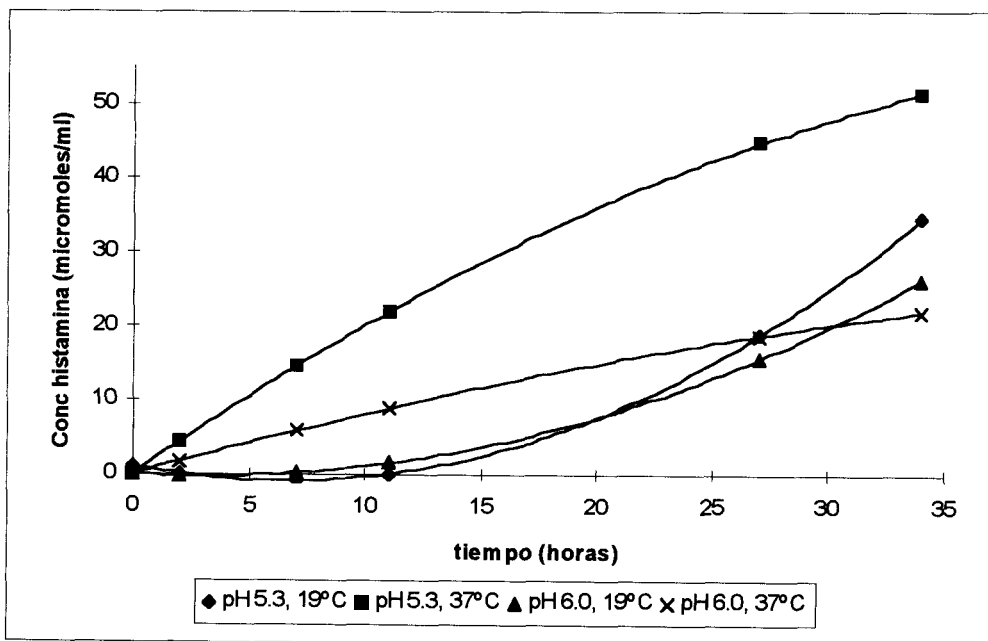


Figura 5. Comparación de la formación de histamina *Morganella morganii* en los 4 tratamientos estudiados.

Es posible que la producción de histidin descarboxilasa obedezca a un mecanismo de la célula para obtener energía a partir de la descarboxilación de histidina, por lo tanto, aunque la población disminuya la producción de histamina continúa como forma de obtener energía metabólica, aún en condiciones medianamente adversas, como es el caso de altas temperaturas en una cepa de aguas templadas.

### 6.3.2. Determinación del crecimiento de la población de C1 (*Hafnia alvei*) en medio NB y su producción de histamina, analizado por el método enzimático.

Para C1 (*Hafnia alvei*) se estudió solamente la combinación de temperatura y pH que favorecían la mayor producción de histamina en *M. morgani*, esto es, a pH 5.3 y 37°C. Los datos para cada variable de respuesta se ajustaron a una regresión cuadrática, obteniéndose para el crecimiento bacteriano un coeficiente de determinación de 0.89 y para la producción de histamina de 0.99. Se escogió esta cepa debido que era la menos productiva, según pruebas preliminares de producción de histamina hechas a las cepas aisladas de piel de atún. Su máxima producción de histamina fue de 1.25  $\mu\text{moles/ml}$ , en comparación a 50  $\mu\text{moles/ml}$  producidas por *M.morgani*(determinados por método enzimático). Tanto en la producción de histamina como en el crecimiento bacteriano se observó una tendencia creciente a lo largo del tiempo de estudio, según se muestra en la Figura 6.

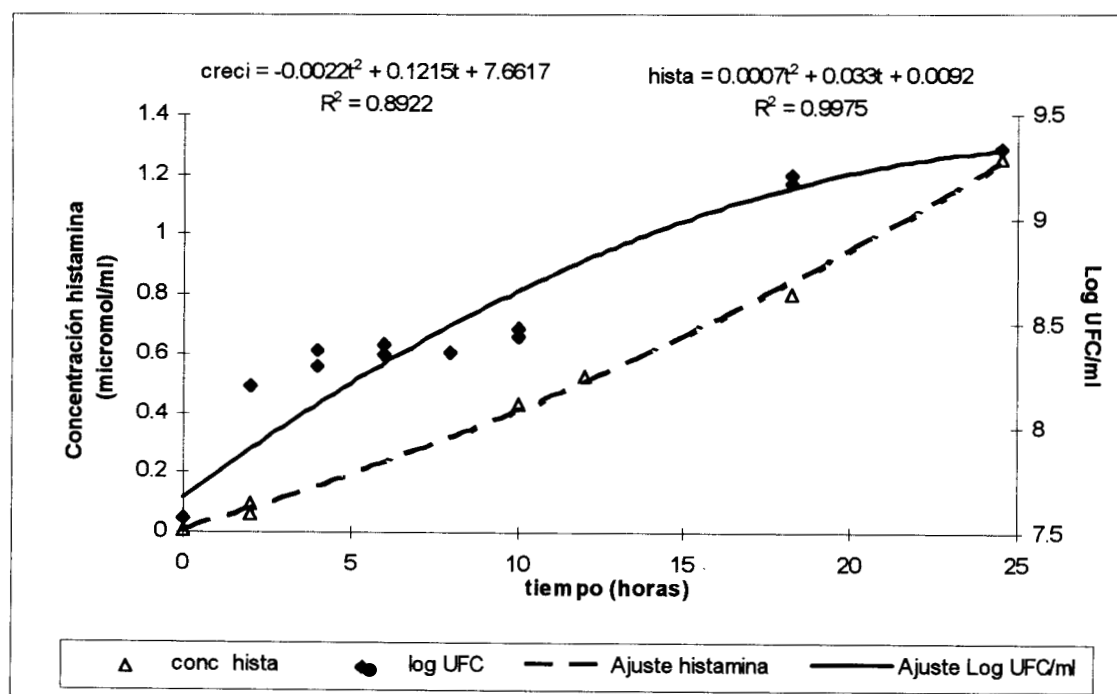


Figura 6. Crecimiento y formación de histamina de *Hafnia alvei* a pH 5.3 y 37°C

### 6.3.3. Determinación del crecimiento de la población de C3 (*Serratia liquefaciens*) en medio NB y su producción de histamina, analizado por HPLC.

De las cepas aisladas de piel de atún, la cepa C3 (*S. liquefaciens*) fue la que mayor cantidad de histamina produjo. La determinación de histamina e histidina para *S. liquefaciens* se llevó a cabo en un equipo de HPLC. Las curvas patrón empleadas se muestran en las Figuras 7 y 8.

Los tiempos de retención fueron de 5.50 y de 33.89 respectivamente para histidina e histamina y los coeficientes de determinación fueron superiores a 0.98.

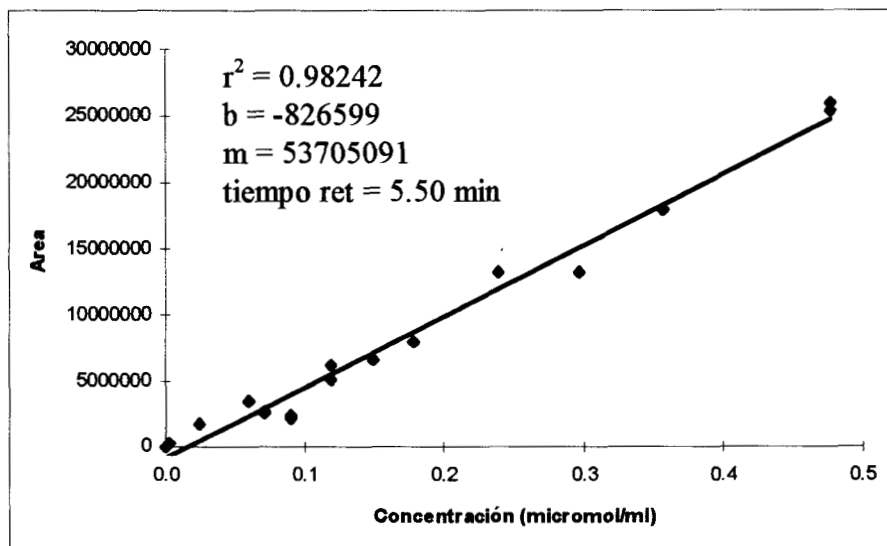


Figura 7. Curva patrón para histidina.

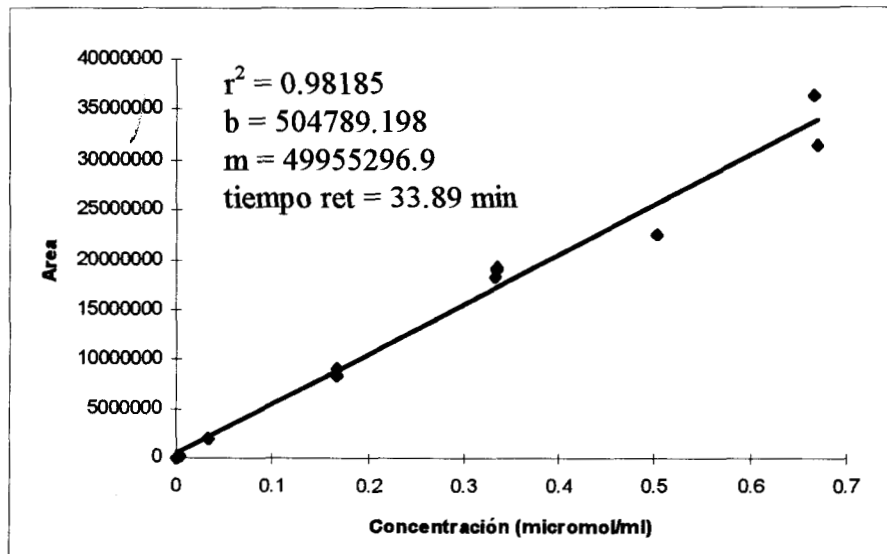


Figura 8. Curva patrón para histamina.

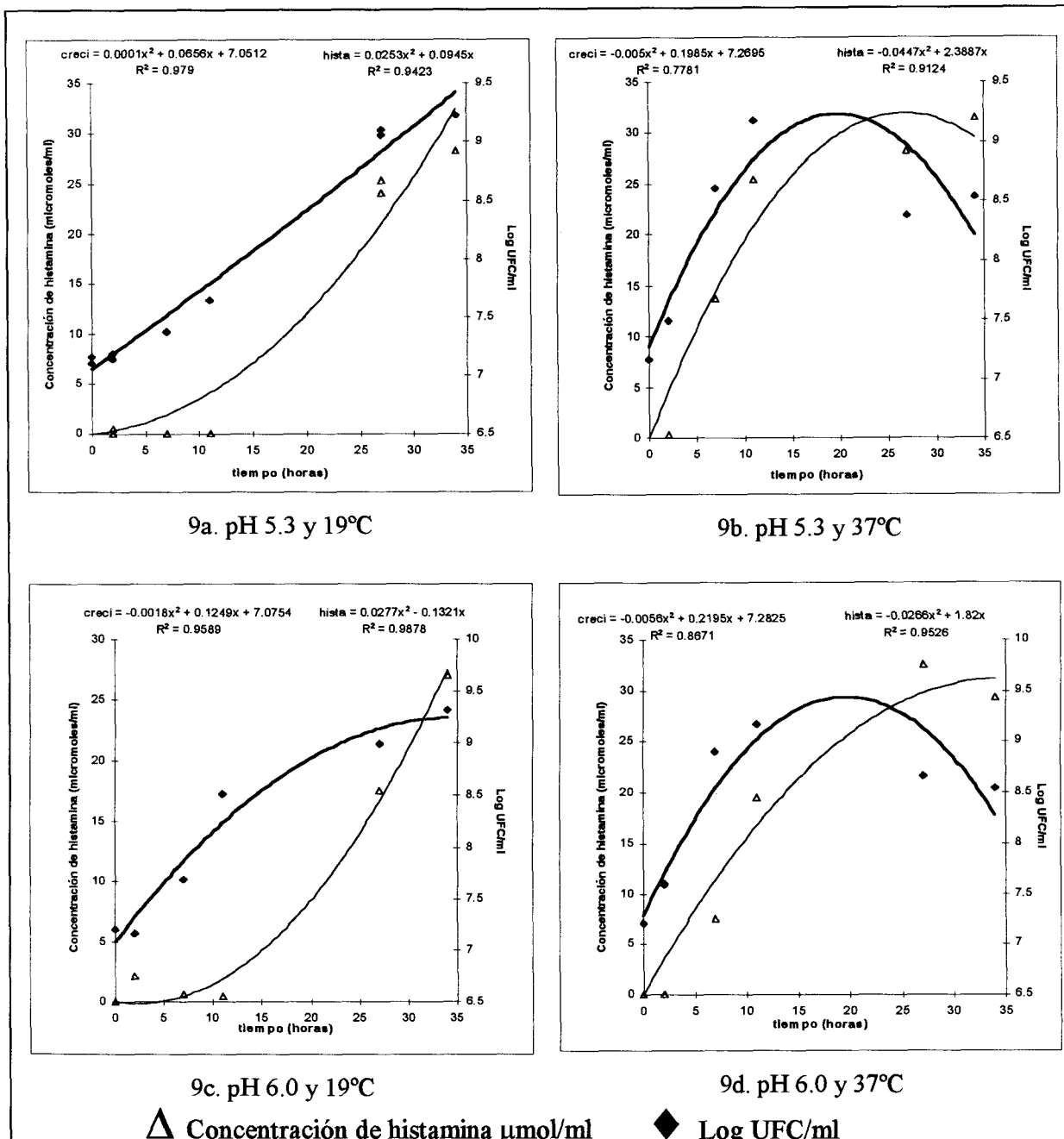


Figura 9. Crecimiento y formación de histamina por *Serratia liquefaciens* en caldo NB.

Las curvas de crecimiento a 37°C (Figuras 9b y 9d) mostraron la misma tendencia que para *M. morgani*, esto es, un máximo con posterior decrecimiento de la población, sin embargo, este máximo fué a menor tiempo, entre 15 y 16 horas, mientras que para *M. morgani* fué a 20-21 horas. La tendencia de crecimiento a 19°C (Figuras 9a y 9c) fué constante tanto a pH=5.3 como 6.0. Comparando las cuatro curvas de crecimiento (Figura 10) no se encontró un crecimiento

notablemente mayor a las 15-17 horas para cepas almacenadas a 37°C, que a las 35 horas para cepas almacenadas a 19°C, produciendo las mayores cantidades de histamina a esta temperatura.

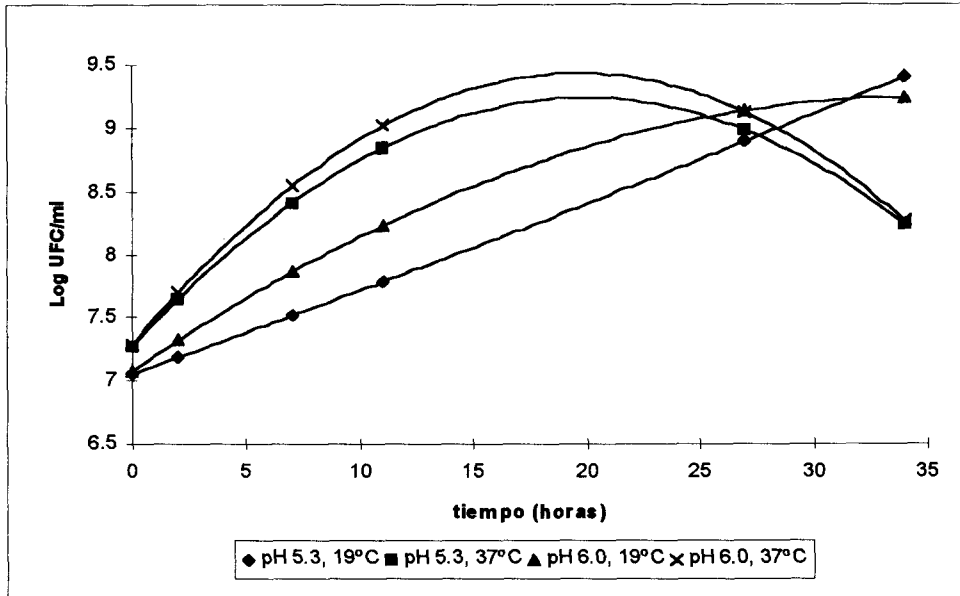


Figura 10. Comparación del crecimiento de *S. liquefaciens* en los 4 tratamientos estudiados.

Se observó que la variable que más influyó en el crecimiento fué la temperatura, ésto debido al tipo de curvas obtenidas, ya que a 19°C y a 37°C, repectivamente, las curvas se comportan de la misma forma.

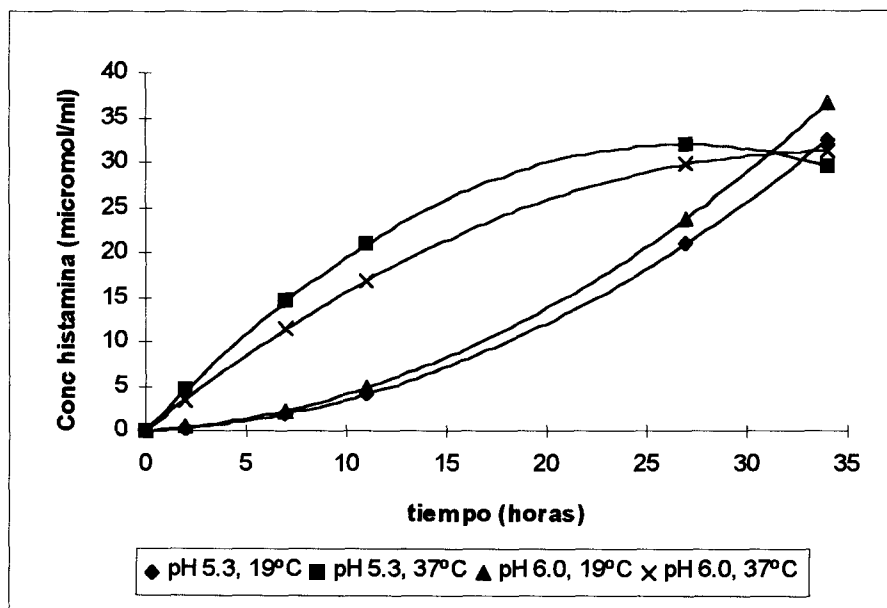


Figura 11. Comparación de la producción de histamina por *S. liquefaciens* en los 4 tratamientos estudiados.

Para la formación de histamina, la fuente de variación más importante fué también la temperatura, ya que se formó mas rápidamente a 37°C, pero se obtuvo la misma cantidad de histamina para los cuatro tratamientos al final del experimento (aproximadamente 30-35 µmol/ml en 34 horas) (Figura 11), en el que se observa la baja producción de histamina a lo largo del tiempo de estudio para 19°C.

#### 6.3.4. Determinación del crecimiento de la población de *Morganella morganii* y *Serratia liquefaciens* y su producción de histamina en medio de proteínas sarcoplásmicas de atún, analizado por HPLC.

Se emplearon las mismas curvas patrón reportadas en las Figuras 7 y 8. Se utilizaron las condiciones óptimas de crecimiento para otras cepas, esto es pH 5.3 y 37°C. Las curvas de crecimiento para *M. morganii* y para *S. liquefaciens* fueron similares en este medio que en el medio NB (Figuras 12 y 13), presentando un máximo alrededor de las 21 horas de almacenamiento y una subsecuente disminución. Los datos de crecimiento tuvieron un ajuste de 0.79 y 0.89 para *M. morganii* y *S. liquefaciens*, respectivamente. En ambos casos, la producción de histamina fué paralela al crecimiento bacteriano. Sin embargo, se alcanzaron valores mayores con *S. liquefaciens* (alrededor de 10 µmol/ml) mientras que con *M. morganii* llegó hasta 8 µmoles/ml.

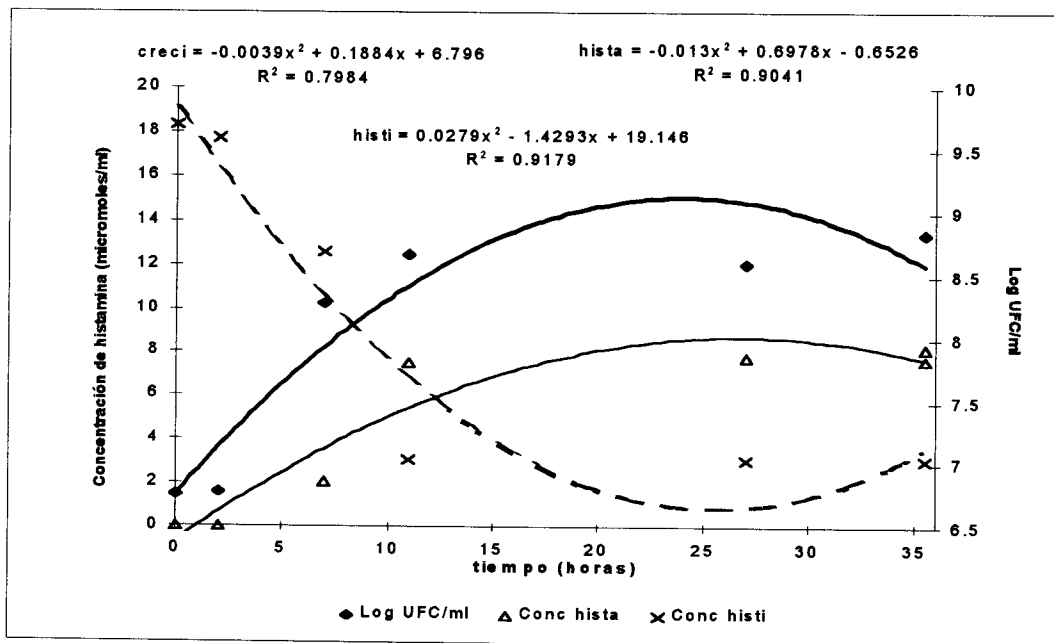


Figura 12. Crecimiento, degradación de histidina y producción de histamina y por *M. morganii* en medio de proteínas sarcoplásmicas de músculo de atún, pH 5.3 y 37°C.

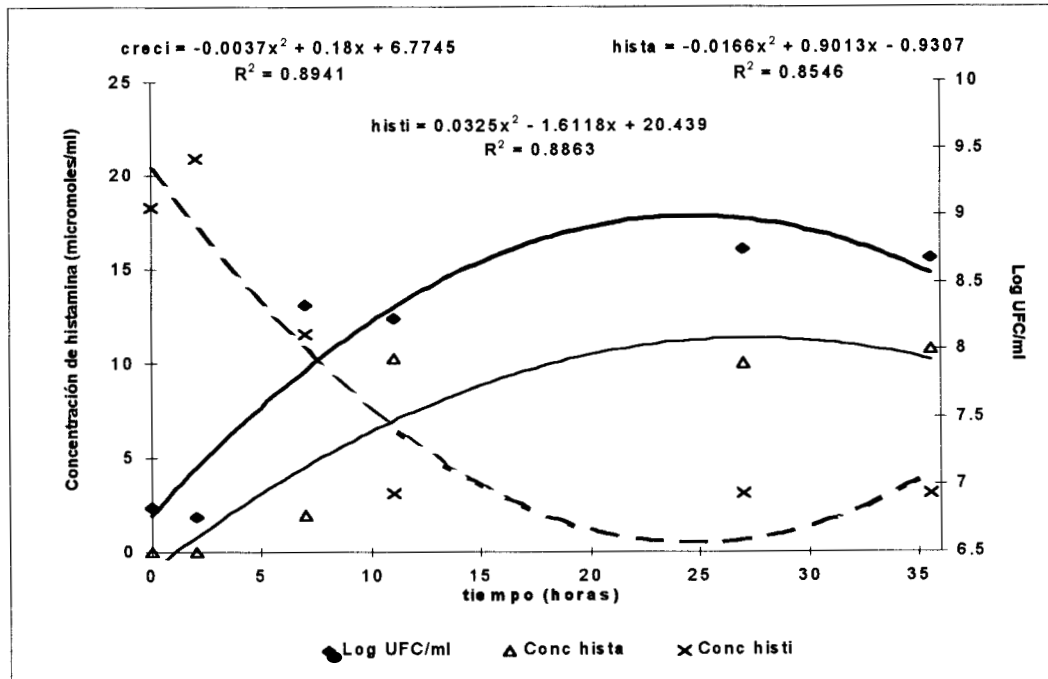


Figura 13. Crecimiento, degradación de histidina y producción de histamina por *S. liquefaciens* en medio de proteínas sarcoplásmicas de músculo de atún, pH 5.3 y 37°C.

Debido a que este crecimiento se llevó a cabo en proteínas sarcoplásmicas, éstas, al ser extraídas, llevaron consigo a la histidina libre, la cual fue posteriormente descarboxilada por las cepas empleadas. Se observó una disminución paralela de la cantidad de histidina libre presente en el sistema muscular, lo que corrobora los resultados de otros investigadores que indican que solo la histidina libre se transforma a histamina.

Hasta el momento no se sabe la razón por la cual las bacterias histaminogénicas no utilizan histidina como fuente de carbono teniéndola en altas concentraciones, no se ha encontrado ninguna referencia en la literatura revisada.

## 7. Conclusiones.

Del crecimiento y formación de histamina en medio NB a partir de cepas de *M. morganii*, *H. alvei* y *S. liquefaciens* se puede concluir que en las cepas muy productoras, *M. morganii* y *S. liquefaciens*, la temperatura tuvo una mayor influencia en la producción de histamina por *S. liquefaciens*, mientras que la combinación de pH y temperatura lo tuvo en *M. Morganii* ya que produjo cantidades mayores de histamina que *S. liquefaciens* (50 y 36  $\mu\text{mol/ml}$ , máximo respectivamente), aunque el crecimiento bacteriano en su punto máximo tuvo valores similares. La cepa de *H. alvei* es una cepa histaminogénicamente muy débil, su máxima producción fué de 1.25  $\mu\text{mol/ml}$  en 24 horas de cultivo.

En el caso de *M. morganii*, la producción de histamina aumentó notablemente a pH 5.3 y 37°C, siendo los otros tres tratamientos similares, mientras que en el caso de *S. liquefaciens* a pH 5.3 y 19°C la producción se disminuyó notablemente, quedando los otros tres tratamientos con tendencias similares. Lo que permite concluir que las condiciones que potencializa la producción de histamina en una cepa aislada de aguas frías (*M. morganii*), la disminuye para una cepa de aguas tropicales (*S. liquefaciens*).

La incubación a 37°C tanto para *M. morganii* como para *S. liquefaciens* hace que la población disminuya notablemente, después de alcanzar un máximo, si bien ésta disminución es más drástica en *M. morganii*, posiblemente debido a su carácter de bacteria de aguas frías. Sin embargo, al producción de histamina continúa, posiblemente debido a que la enzima posea aún actividad aunque ya se esté en la fase de muerte y aún se encuentre presente el sustrato (histidina).

En el medio de pescado se encontró que las cepas probadas, *M. morganii* y *S. liquefaciens*, seguían una curva similar para el crecimiento bacteriano, la producción de histamina y la desaparición de histidina, aunque *M. morganii* fué más potente productor de histamina, la diferencia con *S. liquefaciens* no es notable.



## 8. Bibliografía.

**Ababouch, L.; Afilal, M. E.; Rhafiri, S.; Busta, F. F.** 1991. Identification of Histamine-Producing Bacteria Isolated from Sardine (*Sardina pilchardus*) Stored in Ice and at Ambient Temperature (25°C). *Food Microb*, 8, 127-136.

**Aksnes, A.; Brekken, B.** 1988. Tissue Degradation, Aminoacid Liberation and Bacterial Decomposition of Bulk Stored Capelin. *J. Sci. Food and Agric.* 45 (1), 53-60.

**Alvarez, Manrique, C.; Mendoza Elvira, S. E.** 1994. Manual Básico de Bacteriología. UNAM, Facultad de Estudios Superiores, Cuautitlán. Cuautitlán Izcalli, México. 114-116.

**Arnold, S. H.; Brown, N. D.** 1978. Histamine: Toxicity from Fish Products. *Adv. Food Res.* 24, 113-154.

**Baldrati, G.; Fornari, M. B.; Spotti, E.; Incerti, I.** 1980. Influenza della Temperatura Sulla Formazione d'histamina in Pesci ad Elevato Contenuto d'histidina Libera. *Industria Conserve.* 55,114-122.

**Beheling, A. R.; Taylor, S.L.** 1982. Bacterial Production as a Function of Temperature and Time of Incubation. *J. Food Sci.* 47, 1311-1314, 1317.

**Bennion, M.** 1980. *Introductory Foods*. 7th ed. Macmillan, Nueva York, p. 226.

**Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.** 1994. Eds. John G. Holt Noel R. Krieg, Peter H. A. Sneath, James T. Staley y Stanley T. Williams. Williams y Wilkins. Baltimor, E.U. A. pp. 175-248.

**Bórquez, R., Espinoza, M. Ormeño, R.** 1994. Effects of Storage Time and Chemical Preservatives on the Total Volatile Basic Nitrogen Content en Chilean Mackerel (*Trachurus murphy*) prior to Fish Meal Production. *J. Sci. Food Agric.* 66, 181-186.

**Castro, E.** 1987. Erosiones de la Molleja y Vómito Negro Aviar: Su Prevención a Través del Control de Calidad a las Harinas de Pescado. *Avicultura Profesional*. Vol 5, 2, pp. 55-56.

**Castro, E.** 1992. Relación entre el Procesamiento de la Harina de Pescado, Su Contenido de Aminas Biogénicas y sus Posibles Efectos Sobre la Salud Avícola y Animal. III Simposio de Avances Tecnológicos Modernos. Ixtapa, Zihuatanejo, México. pp 2-13.

**Connell, J. J.; Hardy, R.** 1982. Cap. 3: Development of Conventional Methods. En: Trends in Fish Utilization. Fishing News Books. Inglaterra. pp 44-55.

**Chen, C. M.; Wei, C. I.; Koburger, J. A.; Marshal, M. R.** 1989. Comparison of Four Agar Media for Detection of Histamine-Producing Bacteria in Tuna. J of Food Protec. 52: 11; 808-813.

**Chichester, C. O.; Graham, H. D.** 1973. Microbial Safety of Fishery Products. Academic Press, Nueva York.

**Eitenmiller, R. R.; Orr, J. H.; Wallis, W. W.** 1981. Production of Histidine Decarboxylase and Histamine by *Proteus morgani*. J. of Food Protec. 44. 11. 815-820.

**Eitenmiller, R. R.; De Souza, S.C.** 1984. Enzymatic Mechanisms for Amine Formation in Fish. En: Seafood Toxins. Editor E.P. Ragelis, American Chemical Society Symposium Series, No. 262. Washington. pp 431-441.

**Fernández-Salguero, J.; Mackie, I.** 1979. Histidin Metabolism in Mackerel (*Scomber scombrus*). Studies on Histidin Decarboxylase Activity and Histamine Formation During Storage of Flesh and Liver Under Sterile and non-Sterile Conditions. J. Food Tech. 14, 131-139.

**Frazier, W.C.** 1976. Microbiología de los Alimentos. 2a. edición. Ed. Acribia. Zaragoza, España.

**Friedman, M.; Noma, A. T.** 1981. Histamine Analysis on a Single Column Amino Acid Analyzer. J. of Chrom., 219, 343-348.

**Gale, E. F.** 1946. The Bacterial Amine Acid Decarboxylases. Adv. Enzymol. 6, 1, 32.

**Gallardo, J. M.; Montemayor M. I.; Pérez-Martín R.** 1983. Formación de histamina en caballa (*Scomber scombrus*) y listado (*Katsuwonus pelamis*), especies de alto contenido en histidina libre. Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment. 23, (2), 269-275.

**Geiger, E.** 1962. Cap. 2: Fish Protein. Vol II. En: Fish as Food. Editor G. Borgstrom. Academic Press. Nueva York. pp 35-64.

**Halász, A.; Bárat, A.; Simon-Sarkadi, L.; Holzapfel, W.** 1994. Biogenic Amines and their Production by Microorganisms in Food. Trends in Food Sci. and Technol. 55, (2), 42-49.

**Herman, K.; Frank, G.; Ring, J.** 1995. High Performance Liquid Chromatography for the Separation of Histamine, its Precursor, and Metabolites: Application to Biological Samples. *J. of Liquid Chrom.* 18, 1, 189-204.

**Hurst, A.; Collins-Thompson D. L.** 1979. Cap. 3: Food as a Bacterial Habitat. En: *Adv. in Microbial Ecology*. Editor M. Alexander. Plenum Press. pp 79-134.

**ICMSF (The International Commission on Microbiological Specifications for Foods).** 1978. *Microorganisms in Foods: Their Significance and Methods of Enumeration*. Vol. 1. 2<sup>a</sup> ed. University of Toronto Press, Toronto. pp 434-493.

**ICMSF (The International Commission on Microbiological Specifications for Foods).** 1980. Cap. 20: Fish and Shellfish and Their Products. En: *Microbial Ecology of Foods. Food Commodities*. Vol. II. Academic Press. Londres. pp 567-605.

**Ienistea, C.** 1973. Significance and Detection of Histamine in Food. En: *The Microbiological Safety of Food*. Editor Hobbs, B. C. y Christian, J. B. Academic Press.

**Jacquot, R.** 1961. Cap. 6: Organic Constituents of Fish and Other Aquatic Animal Foods. Vol I. En: *Fish as Food*. Editor G. Borgstrom Academic Press. Nueva York. pp 152-209.

**Kimata, M.** 1961. Cap. 10: The Histamine Problem. En: *Fish as Food*. Editor. G. Borgstrom. Vol I. Academic Press. Nueva York. pp 329-352.

**Klaussen, K. N.; Huss, H. H.** 1987. A Rapid Method for Detection of Histamine-Producing Bacteria. *Int. Journal of Food Microb.*, 5, 137-146.

**Lerke, P. A. Porcuna, M. N.; Chin, H. B.** 1983. Screening Test for Histamine in Fish. *J. Food Sci.* 48, 155-157.

**López-Sabater, E. I; Rodríguez-Jerez, J. J.; Hernández-Herrero, M.; Mora-Ventura M. T.** 1994. Evaluation of Histidine Decarboxylase Activity of Bacteria Isolated from Sardine (*Sardina pilchardus*) by Enzymic Method. *Lett. Appl. Micro.* 19, 70-75.

**López-Sabater, E. I; Rodríguez-Jerez, J.J.; Hernández-Herrero, M.; Roig-Sagués, A. X.; Mora-Ventura M. T.** 1995. Sensory Quality and Histamine Formation during Controlled Decomposition of Tuna (*Thunnus thynnus*). *J. of Food Protec.* Vol.59, No. 2, 176-174.

**Love, M. R.** 1988. Cap 1: The Physical Structure of Fish Muscle and its Chemistry. En: *The Food Fishes, Their Intrinsic Variation and Practical Implications*. Farrand Press, Londres. pp 3-21.

**Mac Faddin, J.** 1993. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Panamericana. México D.F.

**Mackie, I. M.** 1982. Nueva Approaches in the Use of Fish Proteins. En: Developments in Food Proteins-2. Applied Science Publishers. Londres. pp 215-262.

**Maga, J. A.** 1978. Amines in Foods. CRC Critical Vol. 10. Reviews in Food Science and Nutrition. CRC, Press, E.U.A. pp 373-403.

**Martin, D.; Mayes, P.; Rodwell, V.** 1984. Bioquímica de Harper. 9ª edición. Ed. El Manual Moderno. México D.F.

**Middlebrooks, B. L.; Toam, P. D.; Douglas, W. L.; Harrison, R. E.; McDowell, S.** 1988. Effects of Storage Time and Temperature on the Microflora and Amine Development in Spanish Mackerel (*Scomberomorus maculatus*). J. of Food Sci. 53, 4, 1024-1029.

**Murray, J.; Burt, J. R.** 1989. The Composition of Fish. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Torry Research Station. Edimburgo. 3-15.

**Niven, C.F.; Jeffrey, M. B.; Corlett, D. A.** 1981. Differential Plating Medium for Quantitative Detection of Histamine-Producing Bacteria. Appl. Envir. Microb. 41,(1),321-322.

**Omura, Y.; Price, R. J.; Olcott, H. S.** 1978. Histamine-Forming Bacteria Isolated from Spoiled Skipjack Tuna and Jack Mackerel. J. Food Sci. 43, 1779-1781.

**Osuna, R.** 1984. Toxicología Aviar: Vómito Negro. La Histidina y la Mollerosina en la Harina de Pescado. Agricultura Profesional. 2, 111-115.

**Pigott, G. M.; Tucker, B. W.** 1990. Cap.2: Components of Seafood. En: Seafood: Effects of Technology on Nutrition. Editor Marcel Dekker, Inc. Nueva York. 32-65.

**Poulter, R. G.; Curran, C. A.; Rowlands, B.; Disney, J. G.** 1982. Comparison of the Biochemistry and Bacteriology of Tropical and Temperature Water Fish During Preservation and Processing. Session 6. Symposium on Harvest and Post Harvest Technology of Fish, Cochín.

**Raa, J.** 1980. Biochemistry of Microbial Fish Spoilage and Preservation by Lactic Acid Bacteria and Added Acid. Global Impact of Applied Microbiology IV (GLAM IV). 6<sup>th</sup> International Conference. Lagos, Nigeria. pp 3-16.

**Rawles, D. D.; Flick, G. J.; Martin, R. E.** 1996. Biogenic Amines in Fish and Shellfish. En: *Advances in Food and Nutrition Research*. Vol 39. Academic Press, San Diego, Cal. pp 329-361.

**Shewan, J. M.** 1961. Cap 14: The Microbiology of Sea-Water Fish. Vol I. En: *Fish as Food*. Editor G. Borgstrom. Academic Press. Nueva York. 487-560.

**Shewan, J. M.** 1971. The Microbiology of Fish and Fishery Products-a Progress Report. *J. Appl. Bacteriol.* 34, 299-315.

**Smith, A. M.; Hayden, M.; McCay, S.; Zapartka, F.; Hamdy, M.** 1982. Detection and Confirmation of Histamine-Producing Bacteria. *Bull. Environm, Contam. Toxicol.* 29, 618-623.

**Stratton, J. E., Hutkins, R. W.; Taylor S. I.** 1991. Biogenic Amines in Cheese and other Fermented Foods: a Review. *J. Food Protec.* 54, 6, 460-470.

**Strom, A., Olafsen, J. A.; Larsen, H.** 1979. Trimetilamine Oxide: A Terminal Electron Aceptor in Aerobic Respiration of Bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 112, 315-320.

**Sumner, S.; Taylor , S. L.** 1989. Detection Method for Histamine-Producing, Dairy-Related Bacteria Using Diamine Oxidase and Leucocrystal Violeta. *J. of Food Protection.* 52, 105-108.

**Taylor, S.; Guthertz, L. S.; Leatherwood, M.; Tillman, F.; Lieber, H.** 1978. Histamine Production by Food-Borne Bacterial Species. *J. of Food Safety,* 1, 173-187.

**Taylor, S.; Woychik, N.** 1982. Simple Medium for Assessing Quantitative Production of Histamine by *Enterobacteriaceae*. *J. of Food Protection.* 45, (8), 747-751.

**White, T. C.; Tabor H.** 1985. Polyamines in Microorganisms. *Microbiological Reviews.* pp 81.

**Yamanaka, H.; Shiomi, K.; Kikuchi, T.; Okozumi, M.** 1982. A Pungent Compound Produced in the Meat of Frozen Yellowfin Tuna and Marlin. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries.* 48, (5), 685-689.

**Yamani, M.; Untermann, F.** 1985. Development of a Histidine Decarboxilase Medium and its Application to Detect Other Amino Acid Decarboxilases. *Int. Journal of Food Microb.,* 2, 273-278.

**Yoshinaga, D.; Frank, H.** 1982. Histamine-Producing Bacteria in Decomposing Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Applied and Envir. Microbiol.* 44, (2), 447-452.

## Anexo Técnicas utilizadas.

### Medios de cultivo.

#### Cuenta total.

Medio: agar nutritivo, ampliamente conocido.

#### Cuenta e identificación de bacterias histaminogénicas.

Medio: Medio Niven (Niven y col, 1981). Selectivo para bacterias histaminogénicas.

La detección de bacterias histaminogénicas por este medio se basa en el cambio de color del indicador púrpura de bromocresol, cuando la enzima histidín descarboxilasa actúa se forma histamina y aumenta el pH, ésto provoca la formación de un halo de color púrpura, por otro lado las bacterias no histaminogénicas no provocan este cambio de color.

Composición Medio Niven Modificado

Ingredientes	cantidades
peptona de carne	0.5%
extracto de levadura	0.5%
L-histidina·HCl·H <sub>2</sub> O	2.0%
Cloruro de sodio	0.5%
carbonato de calcio	0.1%
agar	2.0%
solución de púrpura de bromocresol (solución al 0.6% en etanol al 95%)	1.0%

Se disolvieron los reactivos en agua destilada en el orden indicado. El medio se esterilizó a 121°C por 15 min y se agregó ácido clorhídrico estéril en condiciones estériles hasta la obtención de un pH de 5.0-5.3 usando observación visual, viraje a ligero color rojo-amarillo, se llenaron las cajas y se dejaron enfriar antes de su uso. Se inocularon 0.1 ml de diluciones adecuadas. Se incubaron por 24 h a 37°C. Las colonias púrpuras o con halos púrpuras son las histaminogénicas las cuales son más grandes que las que no lo son.

225558

**Medio de mantenimiento. Agar Triptisoya-caseína suplementado con histidina (TSAH).**

Se resuspenden 30 g/l de triptisoya caseína (TSH), se agrega 1.5% de agar y se suplementa con 0.1% de L-histidina·HCl·H<sub>2</sub>O, se ajusta el pH a 6.0, se distribuye en tubos con tapón rosca, se esteriliza a 121° C por 15 min; los tubos se inclinan y se dejan enfriar.

**Medios para cuantificación de histamina.****Medio NB (López-Sabater y col., 1994).**

El medio NB no contiene azúcares reductores y por ello se evita la interferencia de azúcares reductores en el momento de la determinación de color.

Ingredientes	Cantidades
Peptona de caseína	0.5%
NaCl	0.5%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.25%
L-histidina·HCl·H <sub>2</sub> O	1.0%

Los reactivos se disuelven en agua destilada o desionizada. Se ajusta el pH a 5.3. Se esterilizan 9 ml del medio en tubos con tapón de rosca a 121°C por 15 min. Se inocula un cultivo puro.

**Medio de pescado (Omura y col., 1978).**

Se homogeniza músculo de atún con 2 veces su peso en agua, se calienta en baño maría a ebullición por 1 h, se centrifuga a 3500 g por 15 min, se filtra, se enriquece con 1% de glucosa y se ajusta el pH a 5.3, se esteriliza a 121°C por 15 min en un matraz. Se inocula el matraz con cultivos puros y se colocan porciones de 4-4.5 ml de ésta infusión en tubos de 13x100 mm y, se incuban a 37°C, se van tomando tubos a los diferentes tiempos establecidos. Se examina la histamina formada.

**Pruebas para la identificación de microorganismos.**

Nota: Todas las pruebas se llevaron a cabo sobre cultivos jóvenes (máximo 24 h).

**Tinción Gram (Alvarez y Mendoza, 1994).**

Reactivos: Solución A: disolver 2 g de cristal violeta en 20 ml de alcohol etílico al 95%. Solución B: disolver 0.8 g de oxalato de amonio en 80 ml de agua destilada. Mezclar las dos soluciones anteriores. Solución de lugol: Triturar 1g de iodo, 2g de yoduro de potasio y añadir algunos mililitros de agua destilada hasta conseguir la disolución, almacenar 24 horas y luego filtrar con papel. Almacenar en recipiente opaco. Solución decolorante: solución de alcohol etílico-acetona 1:1. Solución de safranina: 10 ml de safranina al 2.5% en alcohol etílico al 95% diluirlo con 100 ml de agua destilada.

Método: En un portaobjetos se prepara un frotis de un cultivo de 18-24 h. Se fija y ya frío se añade una gota de cristal violeta-oxalato de amonio durante 60 seg (la muestra debe quedar cubierta), se lava con agua, luego se añade solución de lugol durante 30 seg, al término de éste tiempo se lava con agua. Se decolora con alcohol-acetona hasta que ya no se obtenga color violeta. Finalmente se añade la solución de safranina y se deja durante 30 seg. Se enjuaga con agua, se espera a que se seque y ya se puede ver al microscopio. Las bacterias que se ven azul-moradas son gram positivas y las que se ven rojas son gram negativas.

**Prueba de catalasa (Mac Faddin, 1993).**

Reactivos: Peróxido de hidrógeno, 30%. Se conserva en frasco ambar y se evita la innecesaria exposición a la luz. Se mantiene en refrigeración cuando no se utiliza.

Método del portaobjetos: Con una aguja de inoculación se recoje la colonia pura de 18 a 24 h a ser probada y se coloca sobre un portaobjetos. Se agrega una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% sobre la colonia, se puede usar un gotero o una pipeta Pasteur. Observar la inmediata formación de burbujas (liberación de gas) y registrar el resultado.



**Prueba de oxidasa (Mac Faddin, 1993).**

Reactivo de Kovacs: Disolver 1 g de diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina en menos de 100 ml de agua destilada, calentar suavemente hasta la disolución, aforar a 100 ml. Dejar descansar 15 min antes de su uso. Se guarda en frasco color ambar, tapado. Evitar la exposición innecesaria a la luz.

Método indirecto de Kovacs sobre papel: Colocar un trozo de papel filtro Whatman en una caja Petri, agregar de 2 a 3 gotas del reactivo de Kovacs en el centro del papel. Extender con un asa la colonia a ser probada. La reacción de color positiva se produce a los 5 ó 10 seg.

**Prueba de Oxidación-Fermentación (Mac Faddin, 1993).****Medio básico de oxidación-fermentación (O-F) de Hugh y Leifson:**

Ingredientes	Cantidades
Peptona	2 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g
Fosfato de potasio dibásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0.3 g
Agar	2-3 g
Azul de bromotimol	0.03-0.08 g
Agua destilada	1000 ml

Indicador de pH: azul de bromotimol:

ácido: color amarillo, pH 6.0

alcalino: color azul de Prusia intenso, pH 7.6

Medio no inoculado: color verde, pH 7.1

Se esteriliza el medio básico en autoclave a 121°C, 15 libras por 15 min. Se enfría hasta 40-45°C. Se agrega una solución acuosa concentrada del carbohidrato deseado (en éste caso glucosa), previamente esterilizado por medio de membranas Millipore de 0.45 micras. Se debe tomar en cuenta el volumen que se añadirá de solución concentrada al medio básico. Se distribuye asepticamente en tubos estériles con tapón de rosca, 5 ml aproximadamente en cada uno.

Prueba común en dos tubos: De un cultivo de 18-24 h se inocula un par de tubos O-F de Hugh y Leifson para cada organismo en estudio. Se inoculan por picadura hasta aproximadamente 0.6 mm del fondo. Uno de los dos tubos se le agrega de 1 a 2 ml de parafina estéril para excluir el oxígeno. Se rotulan uno abierto y otro cerrado o sellado. Se incuba a 35°C durante 48 h o más.

Interpretación: Esta prueba ayuda a registrar la utilización de un carbohidrato, la producción de gas y la motilidad. Se deben utilizar las siguientes abreviaturas:

**Reacciones con carbohidratos:**

Acido: **A**

Acido y gas: **AG**

Sin cambio o reacción alcalina: **SC ó (-)**

**Determinaciones O-F:**

Fermentativa: **F**

Oxidativa: **O**

Ni oxidativa ni fermentativa: **(-)**

**Motilidad:**

Con motilidad: **(+)** (crecimiento que se aleja de la línea de punción)

Sin motilidad: **(-)** (crecimiento limitado a la línea de punción)

**Formas de utilización de los hidratos de carbono:**

	Tubo abierto	Tubo cubierto
Oxidación (O)	Amarillo (A)	Verde (-)
Fermentación (F) (anaerogénica)	Amarillo (A)	Amarillo (A)
Fermentación (F) (aerogénica)	Amarillo (AG)	Amarillo (AG)
Ni fermentación ni oxidación (-)	Azul o verde (-)	Verde (-)
Fermentación y oxidación (O+F)	Amarillo (A)	Amarillo (A o AG)

**Agar Hierro de Kligler (AHK) (Mac Faddin, 1993).**

Se utiliza generalmente para la identificación de miembros entéricos. Se observan 3 formas básicas de fermentación: 1) fermentación de glucosa *solamente*, 2) fermentación tanto de glucosa como de lactosa y 3) no fermentación de glucosa ni de lactosa.

Ingredientes	Cantidades
Extracto de carne	3 g
Extracto de Levadura	3 g
Peptona	15 g
Peptona de caseína	5 g
Lactosa	10 g
Dextrosa	1 g
Sulfato ferroso (FeSO <sub>4</sub> )	0.2 g
Cloruro de sodio	5 g
Tiosulfato de sodio	0.3 g
Rojo de fenol	0.024 g
Agar	12 g
Agua destilada	1000 ml

Indicador del pH: rojo de fenol:

Alcalino: rojo

Acido: amarillo

Medio no inoculado: pH=7 anaranjado rojizo.

Indicador de SH<sub>2</sub>: Tiosulfato de sodio

Sulfato ferroso

Se pesan las cantidades deseadas y se rehidrata, se calienta hasta su disolución y se distribuyen 5 ml en tubos con tapón de rosca. Se esteriliza en autoclave a 121°C ó 15 lb por 15 min. Se deja enfriar en posición inclinada con una capa basal profunda. Se inocula por estría y por picadura el mismo tubo con una colonia aislada con 18-24 h de crecimiento. Se incuba a 35°C de 18-24 h, ni antes ni después.

**Interpretación:****A) Utilización de carbohidratos:****I.-Fermentación de la glucosa:**

a) En estría. Reacción alcalina: color rojo

b) Capa profunda: Reacción ácida: Color amarillo

Si también se produce gas  $\text{SH}_2$  un precipitado negro puede ocultar la acidez.

**II.-Fermentación de glucosa y lactosa:**

a) En estría: reacción ácida: color amarillo

b) Capa profunda: Reacción ácida: color amarillo

**III.-No fermentación de glucosa ni lactosa:**

a) En estría. Reacción alcalina: color rojo

b) Capa profunda: **Organismo aeróbico:** No se observa crecimiento. No hay cambio de color es el mismo del tubo no inoculado (anaranjado rojizo).

**Organismo facultativo:** Reacción alcalina: color rojo

**B) Producción de gas:**

**-Aerogénico:**

Producción de gases  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2$ . Se manifiesta por lo siguiente:

Una sola burbuja de gas

Burbujas en el medio

Desdoblamiento del medio

Desplazamiento completo del medio en el fondo del tubo

Ligera muesca del medio en el costado del tubo

**-Anaerogénico:**

Producción de ácido sulfhídrico ( $\text{SH}_2$ ): Se presenta un precipitado negro (sulfuro ferroso) se manifiesta por:

Un color negro distribuido por la capa profunda

Un anillo negro cerca de la parte superior de la capa profunda

Cuando se interpreta el resultado del Agar Hierro de Kligler (AHK) puede observarse la combinación de cualquiera de las reacciones antes mencionadas. Siempre se buscan las 3 características principales: a) Fermentación de los carbohidratos, b) Producción de gases y c) Producción de  $\text{SH}_2$ .

## Determinación de histamina.

### Método enzimático (López-Sabater y col, 1994).

La técnica se basa en la acción a pH de 6.8, de la enzima DAO sobre la histamina presente, ya sea en el patrón o en en caldo de cultivo. Como producto de la actividad de la DAO (rompimiento de la histamina) se forman acetaldehído, imidazol, amonio y peróxido de hidrógeno; una segunda enzima la peroxidasa reduce los compuestos anteriores y, el LCV (cromógeno) que en su forma reducida es incoloro, pasa a su forma oxidada cristal violeta que es la forma colorida; por medio de curva patrón se puede conocer la cantidad de histamina presente. Se lee el color a 596 nm. A mayor concentración de histamina mayor es la cantidad de peróxido formado e indirectamente se oxida mayor cantidad del cromógeno y por lo tanto se obtiene una coloración mas intensa.

La actividad de histidina descarboxilasa se realiza en caldo NB (ya que se evita la interferencia de azúcares reductores en el medio de cultivo). Se inocula una asada en 9 ml de medio NB, obtenida de un cultivo puro de 24 h en medio TSAH. Se incuba sin agitación a 37°C por 24 h. Después 1 ml se transfiere a otro tubo que contenga 9 ml de caldo NB y se incuba a 37° C por 18 h. (inóculo equivalente a  $10^8$  cfu/ml). Cinco mililitros de este caldo se toman con una jeringa estéril y se esterilizan por filtración a través de membrana (Millipore) 0.22 micras. Los filtrados se almacenan a -26°C. El objetivo de la filtración es detener la formación de histamina y evitar la turbidez causada por las células. Al mismo tiempo se realiza una cuenta total en el caldo remanente no filtrado, se realiza en diluciones apropiadas en 0.1% de agua peptonada, se inocula 1 ml sobre (TSA) suplementada con 0.1% de L-histidina-HCl y pH ajustado a 6.0, y se incuba a 37°C.

### A) Soluciones

- Amortiguador de fosfatos 0.15 M, pH 6.8 (mezcla de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), agua desionizada.
- Solución de diaminoxidasa (DAO): se prepara en agua desionizada con 0.35 UI/ml. Se prepara diariamente
- Solución de peroxidasa de rábano (HRP): se prepara en agua desionizada con 17.24 UI/ml. Se prepara diariamente.
- Solución de Leucocristal violeta (LCV): se prepara en una solución de HCl 0.5% ( en agua desionizada con una concentración de 0.5 mg/ml. Se puede mantener a 0-2° C protegido de la luz.

**B) Metodología**

- 1.- En un tubo se coloca 0.5 ml de la muestra o patrón a ser analizado.
- 2.- Se añade 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8.
- 3.- Se añade 0.5 ml de DAO, 0.5 ml de HRP y 0.1 ml de LCV.
- 4.- Se incuba a 37° C por 2 horas.
- 5.- Se lee en un espectrofotómetro a 596 nm.

**HPLC (Herman y col., 1995).**

La histamina es separada de su precursor y sus metabolitos 1-metil-histamina y ácido acético metilimidazol en una columna de intercambio catiónico TSK SP-5 PW utilizando como fases móviles agua y amortiguador de fosfatos de sodio 0.5 M pH 5.0. La columna se equilibra con 10% de la solución amortiguadora durante 20 min; las separaciones se llevan a cabo a un flujo de 0.6 ml/min. Se inicia con 9 min de 10% de amortiguador y se sigue con un aumento exponencial hasta 60% durante los siguientes 16 min; se mantienen condiciones isocráticas durante 25 min más. La detección se lleva a cabo a 210 nm con una sensibilidad de 0.1 unidades de absorbancia. La columna se calibra con soluciones de histamina, histidina, 1-metil-histamina y ácido acético metilimidazol. Para nuestro caso se tuvo que modificar la técnica para la optimización de los picos de histidina e histamina.

225558