

BACTERIAS PRODUCTORAS DE HISTAMINA EN TRES ESPECIES DE PESCADO

Histamine Producing Bacteria on Three Fish Species

Pedro Izquierdo¹, María Allara¹, Gabriel Torres¹, Andreína Fernández², Maryan Paulinkevicius² y Jenny Fuenmayor²

¹Unidad de Investigación Ciencia y Tecnología de Alimentos (UDICTA), Facultad de Ciencias Veterinarias.

²Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, La Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

E-mail poic@telcel.net.ve; allara@mipunto.com

RESUMEN

La presente investigación tiene como objetivo identificar las bacterias productoras de histamina, responsables de las escombrototoxicosis, en tres diferentes especies de pescado: armadillo (*Hipostomus watwata*), bocachico (*Pochilodus reticulatus*) y lisa (*Mugil curema*), de elevado consumo en Venezuela. A 36 muestras de las tres especies se les realizó la medición del pH por el método de Kelleger y col., así como un recuento de aerobios mesófilos (RTA), siguiendo la metodología propuesta por la Asociación Americana de Salud Pública (APHA). Las muestras se sembraron en los medios de Mc. Conkey (MC) y eosina azul de metileno (EMB), específicos para el aislamiento de Gram Negativos. Para la identificación de las bacterias Gram Negativas productoras de histamina se utilizó el medio de Niven modificado y las pruebas de bioquímica primaria y secundaria según la tablas de Zinsser. Los resultados mostraron valores promedio de pH muy similares entre las especies de pescado estudiadas (6,40–6,66). El RTA del armadillo no estuvo dentro de los límites recomendados por la ICMSF (10^5 - 10^7). Los géneros bacterianos productores de histamina fueron: *Escherichia coli*, *Aeromonas sp*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Plesiomona shigelloides*. Se observó un patrón común en bocachico y armadillo en relación con la producción de histamina por parte de *Escherichia coli* y en lisa y bocachico con el género *Aeromonas*. Se concluye que las bacterias productoras de histamina en las especies de pescado armadillo, bocachico y lisa, son de los géneros *Escherichia*, *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Plesiomona*, las cuales son similares a las reportadas en otras especies de pescado.

Palabras clave: Histamina, bacterias, pescado, Gram negativos.

ABSTRACT

The objective of this research was to identify the Gram negative histamine producing bacteria, responsible for scombroid intoxication in three fish species: armadillo (*Hipostomus watwata*), bocachico (*Pochilodus reticulatus*) and lisa (*Mugil curema*). All of these are highly commercial fish in Venezuela. Thirty six samples were taken and pH was measured, following the Kelleger et al. methodology. Aerobic mesophilic bacteria (RTA) were also determined using American Public Health Association (APHA) criteria. All strains were cultured in Mc. Conkey (MC) and eosin-methylene blue media (EMB), for specific Gram negative isolation. To identify Gram negative histamine producing bacteria, Niven's modified media by Yoshinaga et al. was used, as well as Zinsser's tables for primary and secondary biochemistry. Results showed similar values for pH in all species studied (6.40-6.66). Armadillo RTA was higher than values recommended by ICMSF (10^5 - 10^7). Histamine producing genera were: *Escherichia coli*, *Aeromonas sp*, *Enterobacter*, *Citrobacter* and *Plesiomona shigelloides*. A common pattern was observed in armadillo and bocachico in histamine production by: *E. coli*, and similar patterns were also observed in lisa and bocachico for *Aeromonas*. The conclusion of this work is that Histamine producing bacteria in armadillo, bocachico and lisa are *Escherichia*, *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Citrobacter* and *Plesiomona*, similar to those reported in other fish species.

Key words: Histamine, bacteria, fish, Gram negative.

INTRODUCCIÓN

Venezuela, como país costero del Atlántico Centro Occidental, tiene una ubicación favorable desde el punto de vista pesquero, que ha llevado al país a ocupar una posición importante entre los productores latinoamericanos [11]. Actualmente

te, este rubro ha registrado un progresivo crecimiento con una producción pesquera nacional para el año 1998 de 536.190,47 TM [13].

La región zuliana cuenta con una red fluvial formada por un gran número de ríos de cauces permanentes, además del Lago de Maracaibo, cuya área es de 16.360 Km². Para el año 1998 la estimación pesquera regional fue de 56.300 TM, ocupando el tercer lugar después de los estados Falcón y Oriente con un aporte del 10,5% a la producción pesquera nacional [11].

En el estado Zulia la pesca se localiza principalmente en los municipios que circundan el Lago de Maracaibo y es llevada a cabo de manera artesanal. Dentro de las principales especies que se capturan en estas zonas se tiene: armadillo (*Hipostomus watwata*), bocachico (*Pochilodus reticulatus*) y lisa (*Mugil curema*), entre otras.

Luego de que el pescado es capturado comienza a sufrir una serie de cambios químicos, produciéndose variaciones en sus características organolépticas (sabor, olor, color), debido a procesos de autólisis, oxidación, hidrólisis de las grasas y crecimiento microbiano [3].

Uno de los métodos para retrasar estos procesos consiste en reducir la temperatura del producto, por refrigeración o congelación después de su captura [10,12]. Se ha reportado que la temperatura es el factor ambiental que más influencia ejerce en el mantenimiento de este producto [9, 10].

Una inadecuada manipulación y conservación del pescado influye favorablemente en el crecimiento bacteriano. Existen, además de estos factores extrínsecos de descomposición, otros definidos por Huss [5] como intrínsecos: alta actividad de agua, elevado pH post *mortem*, altas concentraciones de nitrógeno no proteico (NNP) y la condición del pescado como organismo poiquilotermo.

Dentro de la gran cantidad de especies que pueden crecer bajo estas condiciones, existe un conjunto de bacterias que generan producto de su metabolismo la endoenzima histidina descarboxilasa y por lo tanto pueden producir histamina a partir de la histidina libre [10, 12]. Esta amina biógena es la responsable de las escombrototoxicosis, cuando su concentración en el músculo del pescado sobrepasa las 200 partes por millón (ppm) [14].

Muchos de los expendios de la ciudad de Maracaibo y sus alrededores, se encuentran al aire libre y sin refrigeración, y sin condiciones sanitarias adecuadas; por lo tanto la calidad microbiológica del pescado que allí se expende es pobre, existiendo en éste alta posibilidad de encontrar bacterias formadoras de histamina.

En este trabajo se determinó el pH muscular, el recuento de aerobios mesófilos e identificación de los géneros productores de histamina, en tres especies de pescado que se expenden en la ciudad de Maracaibo, estado Zulia, Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de las muestras

Se recolectaron doce pescados de cada una de las siguientes especies: armadillo (*Hipostomus watwata*), bocachico (*Pochilodus reticulatus*), y lisa (*Mugil curema*). Los pescados previamente eviscerados tenían un peso aproximado de 350 a 450 g, fueron adquiridos en un centro de acopio que se caracteriza por expender sus productos pesqueros sin refrigeración a una temperatura promedio de 30°C. Los pescados fueron transportados en hielo al laboratorio, donde se realizaron los siguientes análisis.

pH muscular

Se determinó pesando 10 g de músculo y homogenizándolos en 50 mL de agua bidestilada desionizada durante 1 min en un homogenizador Virtis. La lectura del pH se realizó utilizando un potenciómetro marca Metrohm/620 [9].

Análisis microbiológico

El recuento de aerobios mesófilos se realizó siguiendo el método propuesto por la Asociación Americana de Salud Pública (APHA) [1]. Para ello se realizaron cortes en diferentes zonas del músculo del pescado: cabeza, lomo, cola, con la ayuda de un bisturí estéril. Se pesaron 11 g y se colocaron en 99 mL de agua peptonada estéril al 0,1%. Las muestras se homogenizaron en un aparato marca Virtis e 3500 r.p.m. por un tiempo de 2 min.

De la suspensión se tomó 1 mL para realizar diluciones seriadas (10^{-2} - 10^{-6}) en tubos de ensayo que contenían 9 mL de agua peptonada al 0,1%. Luego se agregó 0,1 mL de cada dilución en las placas de Plate Count agar, Mac Conkey (MC), y Eosina Azul de Metileno (EMB), todos de la marca Merck®. Las diluciones fueron sembradas en placas por extensión e incubadas en una estufa marca Thelco a 37°C por 48 horas; una vez transcurrido este tiempo se realizó el conteo de microorganismos en un cuenta colonias marca Fisher Instruments, USA.

Se seleccionaron de las placas de MC, colonias fermentadoras y no fermentadoras de la lactosa y, del EMB, colonias verde metalizadas y violeta, y subcultivadas en el agar nutritivo en tubo (Merck®) a 37°C por 24 h.

Identificación de bacterias Gram negativas productoras de histamina

A partir del tubo de agar Nutritivo (AN) fueron sembradas las cepas en un medio selectivo formulado para la identificación de bacterias productoras de histamina denominado medio de Niven modificado propuesto por Yoshinaga y col. [15], incubado a 37°C por 24 a 48 h. Este medio tiene una composición de 0,5% de Triptona; 0,5% de extracto de levadura; 2% de L-Histidina; 0,5% de Cloruro de Sodio (NaCl); 0,02% de Rojo de Cresol. La positividad de la prueba se evidencia a tra-

vés de la formación de gas (tubo de Durham) y el viraje del indicador Roio de Cresol de nardo naranja a roio.

Las colonias aisladas que resultaron positivas a la producción de histamina, fueron inoculadas a partir del tubo de AN en el medio de Triple Azúcar Hierro (TSI) marca Merck® y en placas de AN para realizar la prueba de la oxidasa.

Dependiendo de los resultados del TSI y la oxidasa se realizaron los siguientes test para la identificación de las colonias: string-test, manitoi, inositol, lisina, arginina, ornitina descarboxilasa, indol, hidrólisis de la urea citrato de Simmons y motilidad. Las mismas fueron interpretadas empleando las tablas de Zinsser [16].

Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente aleatorizado y los datos analizados utilizando el análisis de varianza de una sola vía de clasificación, apoyados por el software estadístico Statistix. En caso de encontrar diferencias significativas por especies, las medias se compararon usando la prueba de Tukey con un nivel de significación de 0,05 [2].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

pH muscular

En la TABLA I se presentan los valores de pH del músculo de las especies estudiadas. Los mismos no presentaron diferencias (P<0,05) entre si. La especie con mayor pH fue el armadillo, con 6,66 y la de pH menor fue la lisa con 6,41. El pH del músculo se acercó a la neutralidad debido a la baja producción de ácido láctico, consecuencia de la escasa presencia de glucógeno en el músculo del pescado, menor al 0,5% [12]. Estos valores de pH favorecen el crecimiento de una gran variedad de microorganismos, entre los cuales se encuentran algunas especies bacterianas productoras de histamina [5, 12]; los valores de pH son óptimos para la actividad enzimática de la histidina descarboxilasa.

Recuento total de aerobios mesófilos

La TABLA I muestra los valores promedios del recuento de microorganismos aerobios mesófilos (RTA) expresados en log₁₀ UFC/g, presentes en el músculo de las diferentes espe-

cies de pescados estudiadas. La especie armadillo presentó un conteo de microorganismos de 6.62; mientras que en las especies lisa y bocachico fue de 5,69 y 5,62, respectivamente. El análisis de varianza demostró que no hubo diferencias significativas en el RTA de las especies estudiadas.

Al comparar los valores de RTA obtenidos, con los límites microbiológicos establecidos por la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (ICMSF) para pescado fresco [6], 6-7 log₁₀UFC/g, se encontró que las tres especies se ubican en los límites microbiológicos establecidos, lo que podría interpretarse como un valor aceptable, sin embargo la presencia de bacterias productoras de histamina indica una elevada potencialidad de riesgo de intoxicación si se considera que es un alimento expendido en precarias condiciones higiénicas.

Al comparar los valores de RTA obtenidos en la presente investigación, con los límites establecidos por la APHA para este tipo de alimento [1], se observa que las tres especies de pescado presentaron recuentos por encima de la cifra establecida como máxima, que es de 5 log₁₀ UFC/g. Esto podría ocurrir por falta de una adecuada refrigeración y por la exposición a periodos de tiempo largos a temperatura ambiente [3, 12]; factores que favorecen el crecimiento acelerado de los microorganismo. Aunado a esto, la elevada humedad de las especies estudiadas, entre 70,49 y 72,47% [7], y la alta disponibilidad de aminoácidos libres favorecen la rápida proliferación bacteriana [12].

Identificación de géneros bacterianos

En la TABLA II se muestran los géneros bacterianos productores de histamina presentes en las especies de pescados estudiadas, identificadas con la ayuda del medio de Niven modificado por Yoshinaga y col. [15]. El género bacteriano aislado en la especie lisa fue Aeromonas sp., mientras que en la especie armadillo se aislaron los géneros Enterobacter sp y Escherichia coli y en la especie bocachico los géneros Plesiomona shigelloides, Citrobacter sp, Aeromonas sp. y Escherichia coli.

Dichos resultados son similares a los reportados por López y col. [10] en atún (Thunnus thynnus) almacenado a 0, 8 y 20°C, quienes encontraron microorganismos, tales como Aeromonas, Enterobacter, Citrobacter. Es importante destacar que el atún tuvo en común con la especie lisa analizada en esta investigación la presencia del género bacteriano Aeromonas; lo

TABLE I
VALORES DE pH MUSCULAR Y RECUESTO DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS (RTA) EN LAS ESPECIES DE PESCADO ESTUDIADAS

Especie de pescado	pH	RTA'	Norma ICMSF	Norma APHA
Armadillo	6,66	6,62		
Bocachico	6,53	5,69	6-7	5
Lisa	6,41	5,62		

*Log₁₀ UFC/g. Norma ICMSF [6]. Norma APHA [1].

que podría deberse a elevados niveles de histidina libre en el músculo de ambos pescados, siendo para atún 745 mg/g y para lisa 206 mg/g [8]. Hardy y col. [4], también reportaron el género *Escherichia coli* como productor de histamina en caballa (*Scomber scombrus*) y atún.

Las bacterias formadoras de histamina encontradas en las tres especies estudiadas no constituyen parte de su microflora natural, por lo que su presencia podría ser el resultado de la recontaminación post *mortem* [4]. El crecimiento de dichas especies se vio favorecido por la temperatura de almacenamiento. Pan y col. [12] reportan que la histidina descarboxilasa presenta una temperatura óptima de 37°C, lo que llevó a considerar que podría haber una alta probabilidad de encontrar histamina en concentraciones de riesgo para el consumidor [4, 10].

CONCLUSIONES

De las especies de pescado armadillo, bocachico y lisa que se expenden sin refrigeración en el mercado de Maracaibo puede concluirse que:

- El pH del músculo de las especies estudiadas es cercano a 7, lo que favorece el crecimiento bacteriano.
- El RTA, se encuentra por encima de los límites microbiológicos establecidos por la APHA.
- El RTA se encuentra por debajo de los límites establecidos por la ICMSF, sin embargo el aislamiento y detección de bacterias productoras de histamina tiene relación con el tiempo de almacenamiento, temperatura, pH y la seguridad de estas especies como alimento.
- Los géneros bacterianos productores de histamina identificados en la especie de pescado armadillo fueron: *Enterobacter* sp, *Escherichia coli*; en bocachico *Plesiomona shigelloides*, *Citrobacter* sp, *Aeromonas* sp, y *Escherichia coli*; en la especie lisa se identificó el género bacteriano *Aeromonas* sp.
- La exposición del pescado a la temperatura ambiental y su permanencia en ésta por largos periodos de tiempo favorece el crecimiento bacteriano y la actividad enzimática por parte de las bacterias que descarboxilan la histidina libre.

RECOMENDACIONES

Ampliar el estudio de la producción de histamina en las especies estudiadas.

Cuantificar la concentración de histidina libre presente en el músculo de las especies de pescados analizadas mediante la realización de un perfil de aminoácidos.

Estudiar la presencia de histamina en especies de pescado de elevado consumo en la región zuliana que se expenden en similares condiciones.

TABLA II
GÉNEROS BACTERIANOS PRODUCTORES DE HISTAMINA EN LAS ESPECIES DE PESCADO ESTUDIADAS

Especie de Pescado	Generos Bacterianos
Armadillo	<i>Enterobacter</i> sp. <i>Escherichia coli</i>
Bocachico	<i>Plesiomona shigelloides</i> <i>Citrobacter</i> sp. <i>Aeromonas</i> sp. <i>Escherichia coli</i>
Lisa	<i>Aeromonas</i> sp.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de La Universidad del Zulia (CONDES-LUZ), por el financiamiento del presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods: 1 07-108. 1976.
- [2] DANIEL. W. Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. Editorial Limusa. México, pp. 415-455. 1991
- [3] FLICK, G.; MARTIN, E.; WARD, D. Chemistry biochemistry of marine food products. Washington, Avi Publishing Company, pp. 39-51. 1982.
- [4] HARDY, R.; SMITH, J. The storage of Mackerel (*Scomber scombrus*). Development of histamine and rancidity. J. Sci. Food Agric. 27:595-599. 1976.
- [5] HUSS, H.; DALGAARD, P.; GRAM, L. Microbiology of fish and fish products. Elsevier. Amsterdam, pp. 413-421. 1997.
- [6] INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). Vol 1. Ecología Microbiana de los Alimentos. 2da edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 422 pp. 1980.
- [7] IZQUIERDO, P.; TORRES, G.; BARBOZA, Y.; MARQUEZ, E.; ALLARA, M. Análisis Proximal, perfil de ácidos grasos, aminoácidos esenciales y contenido de minerales en doce especies de pescado de importancia comercial en Venezuela. Arch. Lat. Nut. 50 (2):187-194. 2000.
- [8] JIMÉNEZ, L. Comercialización e industrialización de atún en Venezuela y el mundo (1985-1996). Seminario

- de Grado. Lic. en Biología. Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Central de Venezuela. 52 pp. 1996.
- [9] KELLEHER, S.; BUCK, E.; HULTIN, H.; PARKIN, K.; LICCIARDELLO, J.; DAMON, R. Chemical and Physical Changes in Red Hake Blocks During Frozen Storage. *J. Food Sci.* 47:65-70. 1981.
- [10] LOPEZ-SABATER, E.; MORA-VENTURA, M.; RODRÍGUEZ-JEREZ, J.; PIX, S. Bacteriological quality of tuna fish (*Thunnus thynnus*). Destined of canning. Effect of tuna handling on presence of Histidina decarboxylase bacteria and histamine level. *J. Food Prot.* 57 (4):318-32. 1994.
- [11] MARCANO, L. La investigación en el área de la pesca y agricultura marina en el Fonaiap. *Fonaiap* 51:29-31. 1996.
- [12] PAN, B.; JAMES, D. Histamine in marine products: production of bacteria, measurement and prediction of formation. **FAO Fish. Tech.** Pap. Vol. 252, pag. 62. 1985.
- [13] ROBAINA, G. El potencial pesquero Venezolano. **Carta Ecológica.** 73:10-12. 1995.
- [14] U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Center for Food Safety & Applied Nutrition. Fish and Fishery products. **Hazard** and controls guide. Appendix 5. FDA and EPA guidance **levels.** 276 pp. 1998.
- [15] YOSHINAGA, D.; FRANK, H. Histamine-Producing bacteria in decomposing Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*). *App. Envir. Microb.* 44 (2):447-452. 1982.
- [16] ZINSSER, J. Microbiología. Ed. Panamericana. Buenos Aires. 20ª edición. Cap. 2. 1696 pp. 1992.