

1 9 8 5 - 1

REG. No. 081068992

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS



SUSCEPTIBILIDAD AL SORBATO DE POTASIO Y BENZOATO DE SODIO DE BACTERIAS ASOCIADAS A LA DESCOMPOSICION DEL PESCADO CRUDO CONSERVADO A 20°

## TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

R A U L L O P E Z C R U Z

GUADALAJARA JALISCO. 1986

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL  
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA SANITA-  
RIA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMI  
CAS DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.

" SUSCEPTIBILIDAD AL SORBATO DE POTASIO Y BENZOATO  
DE SODIO DE BACTERIAS ASOCIADAS A LA DESCOMPOSI-  
CION DEL PESCADO CRUDO CONSERVADO A 20° "

## C O N T E N I D O

	<i>Página</i>
INTRODUCCION .....	1
OBJETIVOS .....	6
MATERIAL UTILIZADO .....	7
METODOLOGIA .....	13
ESQUEMAS .....	16
RESULTADOS Y DISCUSION .....	22
TABLAS .....	29
CONCLUSIONES .....	36
RESUMEN .....	37
BIBLIOGRAFIA .....	38

## INTRODUCCION :

En el renglón alimentario, la explosión demográfica trae consigo una serie de problemas, el más relevante es el poder brindar satisfactores a las necesidades alimentarias de la población lo cual es cada día más difícil. Una preocupación por el aumento desenfrenado de la población -- fue expresada por Thomas Malthus en 1790, hace más de 150 años en el sentido de que la población humana crece más rápidamente que los recursos necesarios para poderla sostener. (7)

A nuestra fecha se ha descartado esa teoría de crecimiento en favor de las teorías sociales. Es decir, creemos que el hombre puede controlar la población futura así como los recursos mediante sus propios esfuerzos. Uno de esos es la búsqueda de nuevas fuentes de recursos o en su defecto explotar los ya existentes de una forma más racional. En base a lo anterior sería razonable pensar en el océano como una gran alternativa alimentaria. Aunado a esto podríamos imaginar la magnitud de nuestros mares, la situación y espacio geográfico que presenta nuestro país, para darle fuerza a la posibilidad de explotar mayormente --- nuestros recursos marinos. Esto hace necesario buscar una tecnología adecuada o mejorar la que ya existe para la explotación de los productos pesqueros. Del mismo modo es importante saber que grandes volúmenes de alimentos incluyendo pescado, se pierden por causas diversas. La principal es la actividad microbiana. La consecuencia principal se traduce en una indisponibilidad de alimentos, por lo que es necesario investigar nuevas formas de manejo y preservación de los productos marinos, para evitar pérdidas económicas en nuestro país.

Cuando se examina de cerca la importancia de la mi

microbiología de los alimentos en la economía y en la salud pública, advertimos de inmediato un efecto de enormes dimensiones. Si se estima en un 15 a 25% el deterioro que por causas microbianas sufren los alimentos en todos los estadios de su manejo, el valor anual de las pérdidas, en todo el mundo rebasa fácilmente los 10 billones de pesos. Los gastos requeridos para evitar estos daños alcanzan cifras semejantes, resultando del empleo de almacenes y transportes refrigerados, uso de germicidas y de muchas otras medidas tendientes a evitar la contaminación y proliferación de microorganismos en los alimentos. Por otra parte, se sabe -- que el hombre es afectado por enfermedades debidas a diferentes tipos de microorganismos que utilizan como vehículo el agua y alimentos, así mismo los costos de las medidas para evitar, controlar y dar atención médica a las poblaciones y casos individuales son también extraordinariamente -- elevados.<sup>(8)</sup>

En nuestra población aunque no existen cifras estadísticas confiables, las pérdidas económicas por deterioro del pescado pueden estimarse en cuantiosas a lo largo de los diferentes estadios de su captura y comercialización. Entre las razones más importantes que conducen a estas mermas pueden mencionarse la falta de sistemas adecuados de -- preservación, transporte y distribución. Con frecuencia el pescado se mantiene a temperatura ambiente por períodos de tiempo prolongados.

Dada su composición química como son niveles altos de proteínas y otros compuestos nitrogenados solubles, tales como aminoácidos libres<sup>(13)</sup>, así como proporciones de -- grasa variables (dependiendo de la especie), el pescado es un producto con una corta vida de anaquel y entra rápidamente en descomposición por actividad enzimática, en especial la de naturaleza bacteriana.<sup>(13)</sup>

Las bacterias psicotróficas comprenden un grupo -- muy especial de microorganismos por su capacidad para desarrollar a temperaturas por debajo de 20°. La importancia de este grupo estriba en su facilidad de crecer en alimentos conservados en refrigeración, causando problemas principalmente en alimentos con alto contenido de proteínas como lo es el pescado. Son microorganismos muy activamente putrefactivos e incluso en algunos generan pigmentación indeseable.

En las diferentes etapas de su manejo el pescado se ve afectado por diferentes fuentes de contaminación. Quizá se piense que la principal fuente de contaminación o --- fuente de bacterias productoras de alteraciones en los pescados marinos frescos, radique en el propio océano. Al parecer esto no es así. Es cierto que cuando el pescado se extrae del mar las bacterias de la superficie externa de -- las agallas y del intestino son de origen marino<sup>(18)</sup>. Cuando los pescados marinos se evisceran, el agua de lavado, el contenido intestinal y otras fuentes contaminan el revestimiento de la cavidad corporal. Por otro lado, a bordo de los barcos de pesca el pescado suele conservarse en hielo. Este contacta directamente con el pescado, así como con los muros de las bodegas o las paredes de las cajas que lo contienen, que a su vez entran en contacto con el pescado<sup>(18)</sup>. Del mismo modo, el manipuleo que recibe el pescado en el -- barco por parte de los trabajadores representa también serias fuentes de contaminación o aportes de microorganismos.

Con frecuencia las facilidades para implementar -- sistemas adecuados de manejo principalmente en lo concerniente a la aplicación de bajas temperaturas, conlleva a -- las pérdidas por descomposición del producto o en su defecto a que el pescado que se expende para consumo humano, sea de baja calidad sanitaria. Esto crea una serie de proble --

mas que traen como consecuencia:

- A) Pérdidas económicas,
- B) Encarecimiento del producto, y
- C) Riesgos de enfermedades.

Esto último implica sufrimientos y elevados costos de atención médica y de manera colateral se asocia también con importantes pérdidas económicas.

Desde hace muchos años se han practicado métodos de conservación de alimentos por medio de conservadores conocidos como agentes químicos. Jacobs<sup>(11)</sup> los define como agentes químicos que sirven para retardar, evitar o enmascarar los cambios indeseables que sufren los alimentos.

Estas sustancias químicas inhiben el desarrollo de microorganismos, los cuales son los principales causantes de alteración de los productos alimenticios.

El sorbato de potasio así como el benzoato de sodio son inhibidores químicos mundialmente reconocidos que se han empleado como preservativos en alimentos humanos y de animales, productos farmacéuticos, cosméticos y material de empaque<sup>(15)</sup>. Originalmente, estos compuestos químicos eran utilizados exclusivamente para inhibir el desarrollo de mohos y levaduras<sup>(13)</sup>. Posteriormente se han realizado investigaciones<sup>(1,14,15,19,20,21)</sup>, donde se ha puesto de manifiesto su efectividad sobre diferentes grupos bacterianos y con ello su posible aplicación en la conservación de los alimentos.

Algunos trabajos han demostrado la efectividad que tiene el sorbato de potasio sobre bacterias catalasa positiva<sup>(15)</sup>. Haciendo una revisión de los géneros más frecuente



mente involucrados en la descomposición del pescado así como las características de éstos, encontramos que la mayor parte de la flora del pescado alterado, corresponde a microorganismos catalasa positiva. En otros estudios del sorbato de potasio sobre el crecimiento de Staphylococcus aureus en tocino, los resultados han sido satisfactorios<sup>(19)</sup>. De la misma forma se ha visto el efecto que tiene el sorbato de potasio en la preservación de la calidad microbiológica de diferentes alimentos como por ejemplo la mantequilla<sup>(14)</sup>. Se ha utilizado con éxito como agente fungistático en el procesamiento del jamón<sup>(11)</sup> y otros productos alimentarios<sup>(20)</sup>. También se ha demostrado un efecto sobre Pseudomonas putrefaciens<sup>(21)</sup>. A diferencia del benzoato, el sorbato de potasio es metabolizable por el organismo, de tal forma que en ningún momento requiere detoxificación en el hígado. Comparándolo con el cloruro de sodio presenta una toxicidad 50% menor<sup>(23)</sup>.

El sorbato de potasio no genera cambios en el olor o sabor de los alimentos. En base a lo anterior, el sorbato de potasio ofrece claras ventajas sobre el benzoato de sodio.

Considerando la magnitud de las pérdidas económicas e indisponibilidad de pescado por las dificultades de la aplicación de bajas temperaturas en el transporte y conservación del pescado, así como los problemas de salud pública que su consumo puede generar en nuestro país, se sugiere la utilización de otras medidas, tendientes a la inhibición de los microorganismos, se lograría una extensión de la vida de anaquel del pescado. De acuerdo a lo anterior hemos considerado pertinente evaluar la capacidad de algunos conservadores químicos para retardar el desarrollo de microorganismos involucrados en la descomposición del pescado.

El presente trabajo tiene como propósito identificar los géneros más frecuentemente involucrados en el proceso de descomposición del pescado crudo en condiciones precarias de refrigeración, así como determinar su susceptibilidad al efecto antibacteriano del sorbato de potasio y benzoato de sodio en medios de laboratorio.

## MATERIAL UTILIZADO

## MATERIAL DE VIDRIO:

Cajas de Petri 15 x 100 mm.

Tubos de ensayo de 13 x 100 mm. con tapón de rosca.

Tubos de ensayo de 15 x 125 mm. con tapón de rosca.

Perlas de vidrio.

Varillas de vidrio de 4 mm. de diámetro y 15 cm. de longitud con los tres últimos cm. doblados en ángulo recto y -- los extremos redondeados.

Porta objetos.

Cubre objetos.

Vasos de precipitado de 50 ml.

Pipetas bacteriológicas estériles de 1, 2 y 10 ml.

Frascos de dilución de 250 ml.

## EQUIPO:

Incubadora a temperatura de  $20^{\circ} \pm 1$  con circulación de aire forzada.

Refrigerador.

Baño María a  $45^{\circ}$ .

Microscopio binocular.

Balanza granataria con sensibilidad de 0.1 gr.

Balanza analítica con sensibilidad de 0.0001 gr.

Agitador mecánico vortex.

Potenciómetro Corning 125.

Asas bacteriológicas de platino y nicromo.

Cuenta colonias Quebec.

Gradilla metálica.

Mechero Bunsen.

Autoclave olla de presión con manómetro.

Cilindros de acero inoxidable.

## MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS:

Agar nutritivo.

Caldo nutritivo.

Agar pescado<sup>(10)</sup>.

Agar Mc Conkey.

Medio O-F (Fórmula Facklam y Smith)<sup>(17)</sup>.

Agar arginina modificado<sup>(17)</sup>.

Reactivo para oxidasa (Solución acuosa al 1% de Diclorhidrato de dimetil-p-fenilendiamina).

Peróxido de hidrógeno.

Solución acuosa al 0.1% de peptona de caseína ajustado a un pH de 7.0 (diluyente de peptona) (Merck).

Agua destilada estéril.

Equipo de tinción de Gram.

Papel filtro.

Excepto los medios agar pescado, O-F y arginina, todos los medios empleados fueron productos comerciales de marca Bioxon y se prepararon de acuerdo con la metodología generalmente aceptada<sup>(9 y 12)</sup>.

## PREPARACION DEL AGAR PESCADO:

Infusión de pescado .....	1 000 ml.
Leche en polvo descremada .....	4 gr.
Agar .....	15 gr.

Previamente ajustar por separado a pH 7.2 la infusión de --  
pescado y la leche.

Esterilizar 15 minutos a 15 libras.

Infusión de pescado: 40% peso/volumen de carne molida de --  
pescado en agua destilada. Calentar 10 minutos a ebulli --  
ción.

Leche en polvo descremada: reconstituida al 10% peso/volumen en agua destilada.

PREPARACION DEL MEDIO O-F:

Peptona .....	2 gr.
NaCl .....	5 gr.
$K_2HPO_4$ .....	.3 gr.
Púrpura de Bromocresol .....	.01 gr.
Glucosa .....	10 gr.
Agar .....	3 gr.
Agua .....	1,000 ml.

Ajustado a un pH 7.2.

PREPARACION DE AGAR ARGININA:

Peptona de caseína .....	1 gr.
$K_2HPO_4$ .....	.3 gr.
NaCl .....	5 gr.
Arginina .....	3 gr.
Agar .....	3 gr.
Rojo de fenol .....	.01 gr.

Ajustado a un pH 7.2

PREPARACION DE AGAR NUTRITIVO:

Extracto de carne .....	3 gr.
Peptona .....	5 gr.
Cloruro de sodio .....	30 gr.
Agar .....	15 gr.
Agua destilada .....	1,000 gr.

## PREPARACION DE AGAR MAC CONKEY:

Peptona o gelisato .....	17 gr.
Proteosa peptona núm. 3 & polipeptona .....	3 gr.
Lactosa .....	10 gr.
Sales biliares .....	1.5 gr.
Cloruro de sodio .....	5 gr.
Agar .....	13.5 gr.
Rojo neutro .....	.03 gr.
Cristal violeta .....	.001 gr.
Agua destilada .....	1,000 gr.

## PREPARACION DE SOLUCIONES PARA TINCION DE FLAGELOS

## SOLUCION "A"

Cloruro de sodio Q.P. ....	1.5 gr.
AGua destilada .....	100 ml.

## SOLUCION "B"

Acido tánico .....	3 gr.
Agua destilada .....	100 ml.

## SOLUCION "C"

Fucsina .....	1.2 gr.
Alcohol 95% .....	100 ml.

Mezclar las 3 soluciones en proporciones iguales en orden ascendente.

TINCION DE FLAGELOS DE LEIFSON'S<sup>(22)</sup>

1. Porta objetos mantenidos una semana en solución limpiadora de dicromato, se extraen y lavan con agua y enjuagado con alcohol al 95%. Dejar secar.
2. Pasar porta objetos por la flama (ambos lados). Dejar enfriar a temperatura ambiente.
3. 2 ó 3 ml. de agua destilada estéril, remover el crecimiento de cultivo joven en agar inclinado (suave agitación).
4. Transferir la suspensión a un tubo de ensaye estéril.

5. Tomar una gota de la parte superior de la suspensión y transferir a un extremo del porta-objetos.
6. Inclinar el porta-objetos y permitir que el líquido deslice al lado opuesto.
7. Dejar secar a temperatura ambiente.
8. Mezclar las soluciones "A", "B" y "C" en iguales proporciones.
9. Con una pipeta añadir 1 ml. de la mezcla anterior sobre el porta-objetos y dejar teñir durante 10 minutos.
10. Enjuagar el porta-objetos con agua destilada. Dejar secar.
11. Observar bajo microscopio con objetivo de inmersión.



## M E T O D O L O G I A

El estudio se realizó en dos etapas:

- I. Aislamiento e identificación de microorganismos a partir de pescado deteriorado a 20°. (Figura 1).
- II. Determinación de la sensibilidad de estos microorganismos al sorbato de potasio y benzoato de sodio (Figura 6).

## PRIMERA ETAPA:

1. Se colectaron muestras de pescado del comercio, así como pescados recién capturados, ambos marinos y se transportaron al laboratorio preservados con hielo.
2. En el laboratorio se almacenaron a 20° en cámara húmeda hasta la aparición de los primeros signos de deterioro; las lecturas se registraron cada 4 horas.
3. Al inicio de período de almacenamiento y tan pronto se detectaron los primeros signos de alteración se efectuaron cortes de piel de 2.5 x 2.5 cm. haciendo uso de equipo de disección estéril.
4. Los cortes de piel se transfirieron a un frasco con --- 20 ml. de solución diluyente de peptona y perlas de vidrio.
5. Las muestras se agitaron y a partir de la suspensión -- original se efectuaron diluciones decimales.
6. 0.1 ml. de diluciones seleccionadas se inocularon en --

placas de agar pescado y se extendieron con varilla de vidrio.

7. Después de una incubación a 20° x 72 hrs. se efectuó el recuento de colonias y la descripción de las distintas variedades que aparecieron en la placa.
8. Cada variedad de colonias se transfirió a tubo de agar pescado inclinado y se incubó a 20° durante 48 horas para continuar con la identificación de la cepa.
9. El esquema de identificación utilizado se ilustra en -- las figuras 2, 3, 4 y 5, los cuales se encuentran basados en los esquemas de Vanderzant y Nickelson<sup>(26)</sup> complementando de acuerdo al manual de Bergey<sup>(4)</sup>.

Las pruebas aplicadas son las siguientes:

Morfología microscópica, reacción al Gram, oxidadas, catalasas, movilidad microscópica de cada cepa, pruebas de O-F, arginina deaminasa, pigmentación y tinción de -flagelos.

El estudio anterior se aplicó a 6 pescados frescos y alterados, de cuyo cultivo se aislaron 68 cepas, las cuales fueron identificadas finalmente hasta género.

#### SEGUNDA ETAPA:

Las cepas identificadas se cultivaron en caldo nutritivo a 20° durante 24 - 48 hrs. para alcanzar una turbiedad próxima a 10<sup>8</sup> bacterias/ml.

Para determinar la susceptibilidad a los conservadores químicos se procedió de la siguiente manera:

1. Se prepara agar nutritivo ajustado a pH de 5.8 adicionándose por separado de sorbato de potasio y benzoato de sodio a concentraciones finales de 0.1, 0.3 y 0.5%. Estudios previos mostraron que el pH mencionado no afectaba por sí solo el desarrollo de las bacterias en estudio y permitía aún la actividad del conservador.
2. Dividir cada placa en cuadrantes e inocular por la técnica de Miles y Misra diluciones decimales de una cepa en cada cuadrante.
3. Dejar secar a temperatura ambiente e incubar a 20° durante 48 hrs. Contar las colonias desarrolladas.
4. Seleccionar los inóculos que exhiban entre 10 y 50 colonias para el recuento final. Cuando el número de colonias exceda de 50, reportar los recuentos utilizando -- cruces para expresar su abundancia. Utilizar una cruz si el número se encuentra entre 51 y 100 colonias, dos cruces entre 101 y 500 colonias y tres cruces para más de 500 colonias.
5. Computar como mínima concentración inhibitoria para cada cepa y cada inhibidor, la concentración a la cual no se observó desarrollo bacteriano en cualquiera de las diluciones probadas, y que muestran franco desarrollo en la placa control (sin conservador).

FIGURA 1

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LOS MICROORGANISMOS EN EL -  
PESCADO FRESCO Y ALTERADO.

Recolección de muestras al comercio y extraídos -  
recientemente del litoral.

Almacenar pescado a 20° en la cámara húmeda hasta  
mostrar signos de alteración.

Corte de piel 2.5 x 2.5 cm. y suspenderla en un -  
frasco con 20 ml. de diluyente de peptona y pe-  
las de vidrio.

Diluciones decimales

Inocular en agar pescado (siembra por superficie)

Incubar 20°, 72 hrs.

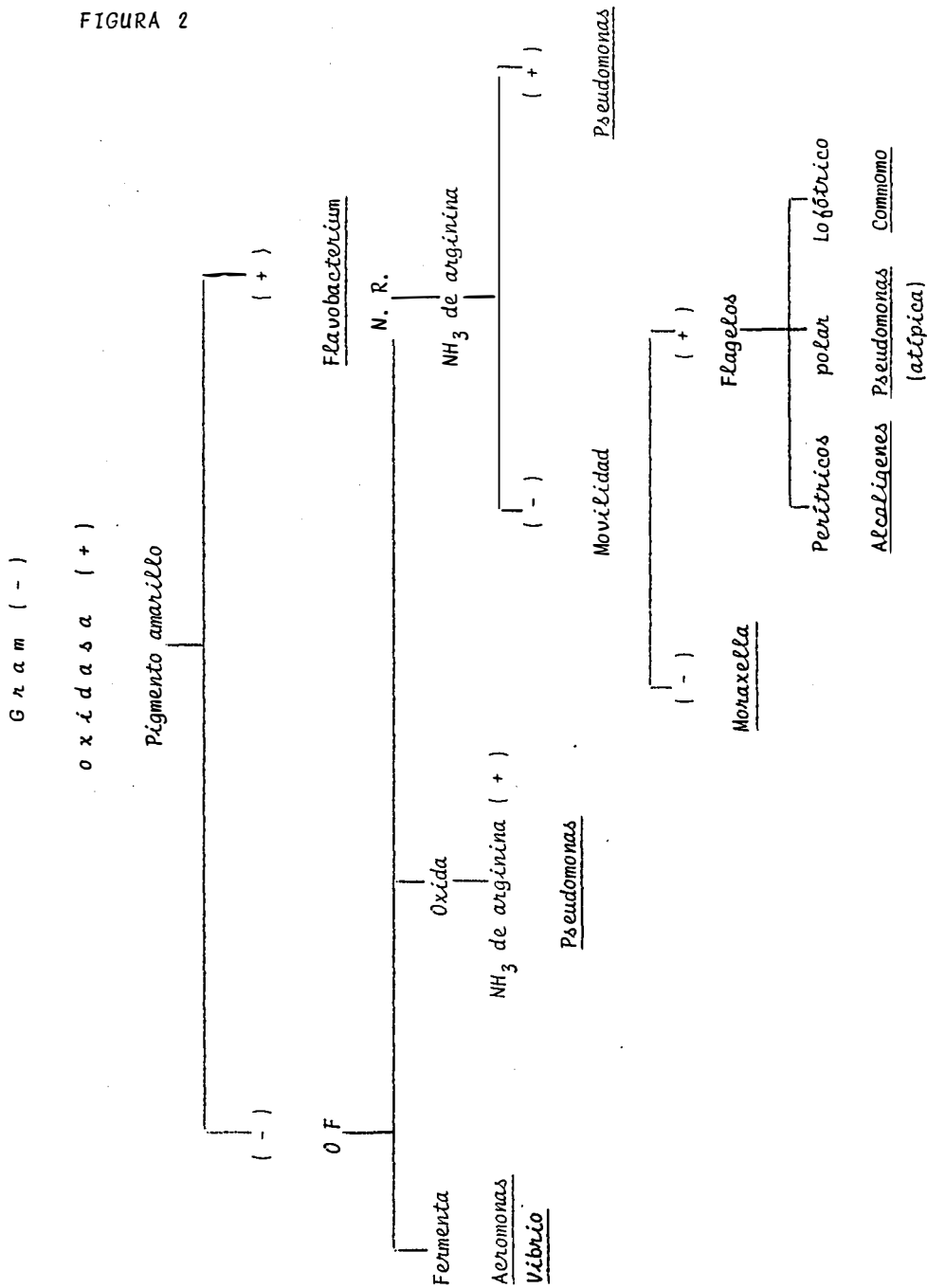
Recuento y observación de morfología colonial

Aislamiento en agar pescado.

Incubar 48 hrs. 20°.

Identificación (Esq. 2, 3, 4 y 5)

FIGURA 2



Gram ( + )

Cocos

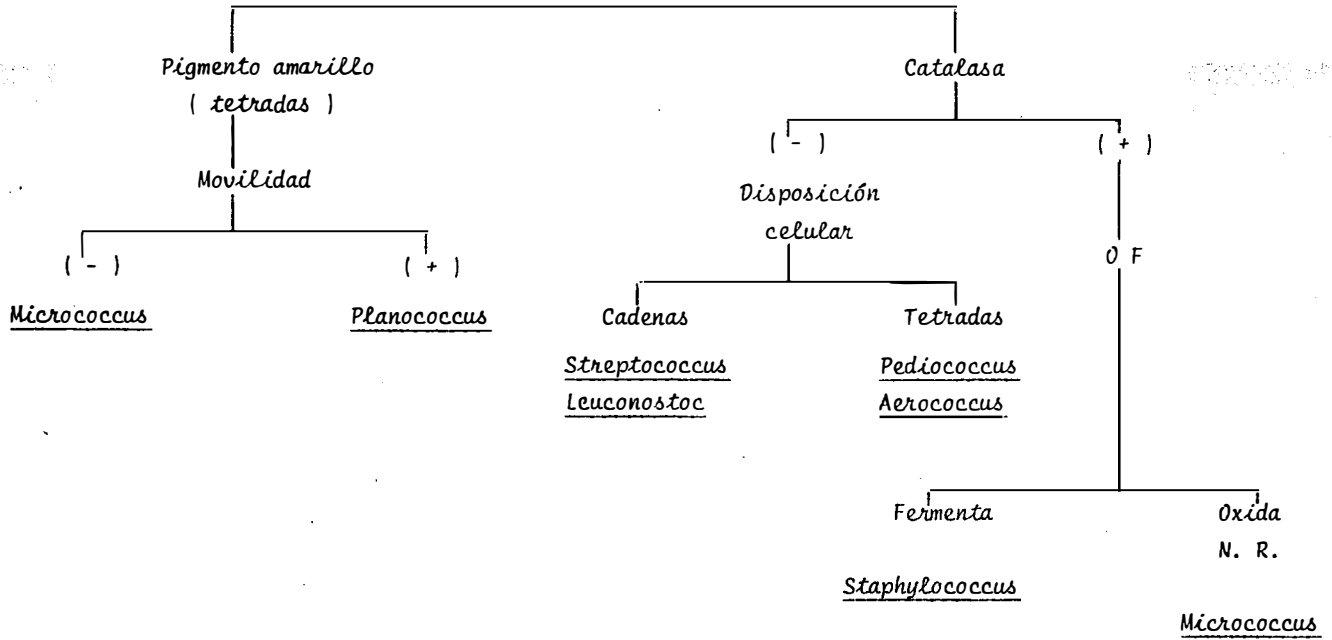


FIGURA 3

FIGURA 4

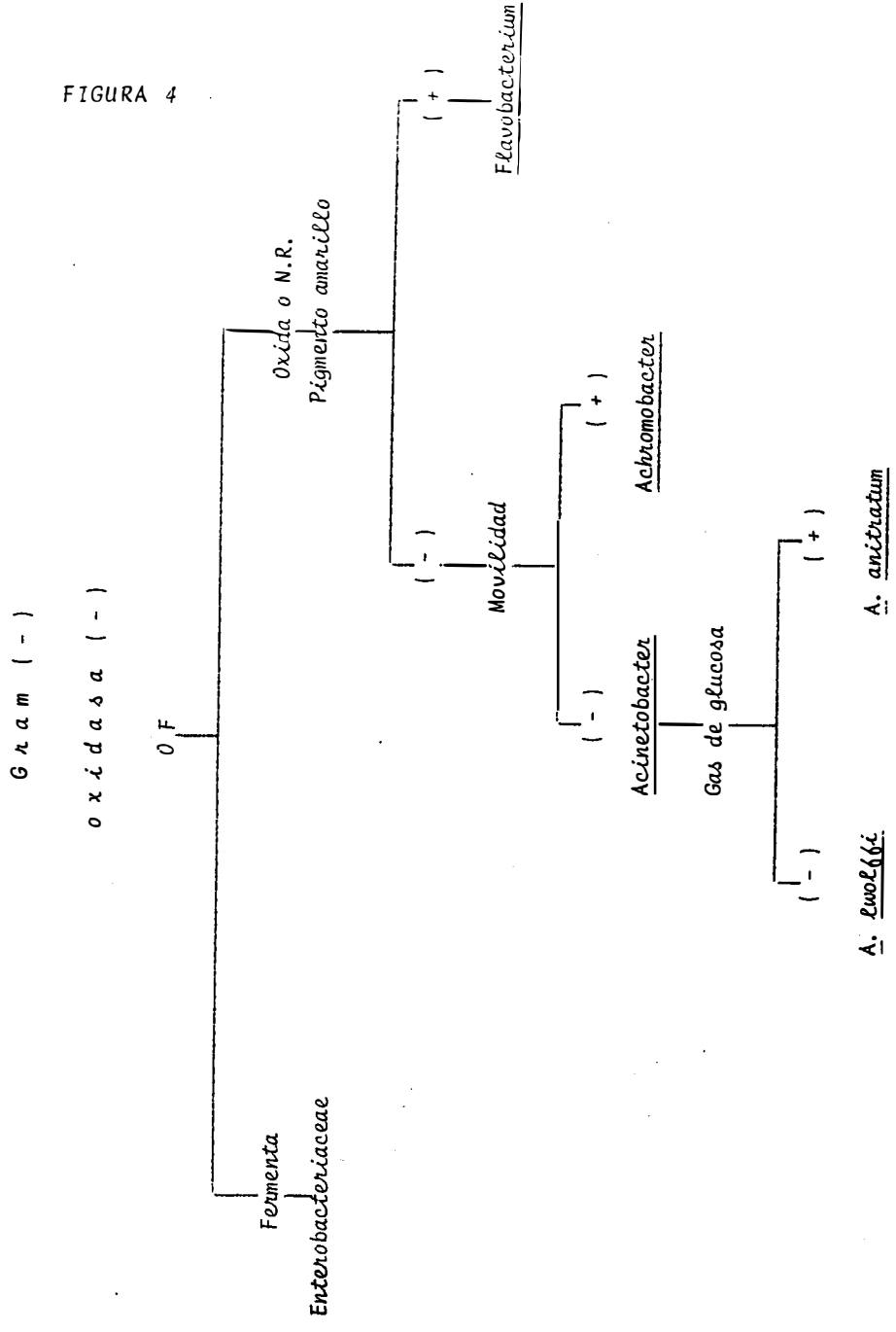


FIGURA 5

*Gram (+)*  
*Bacilos*

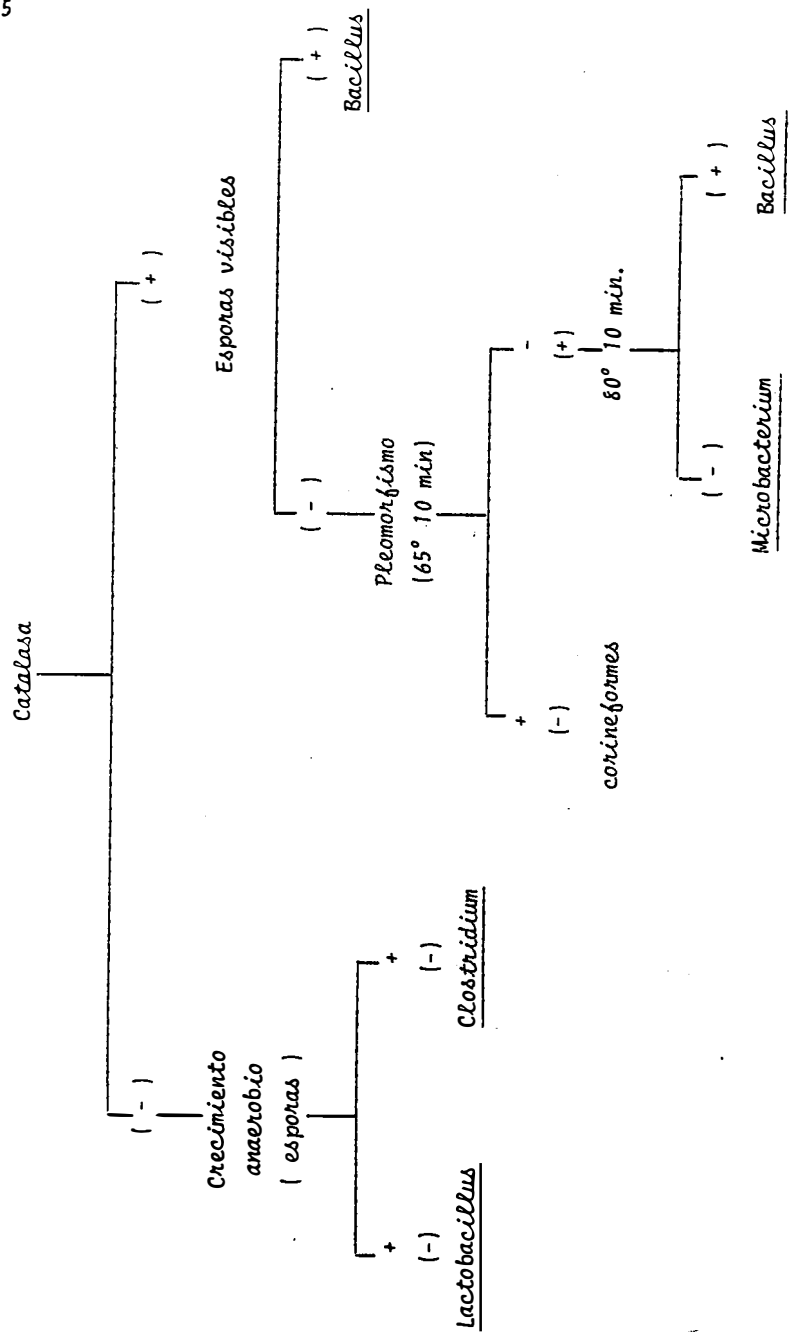
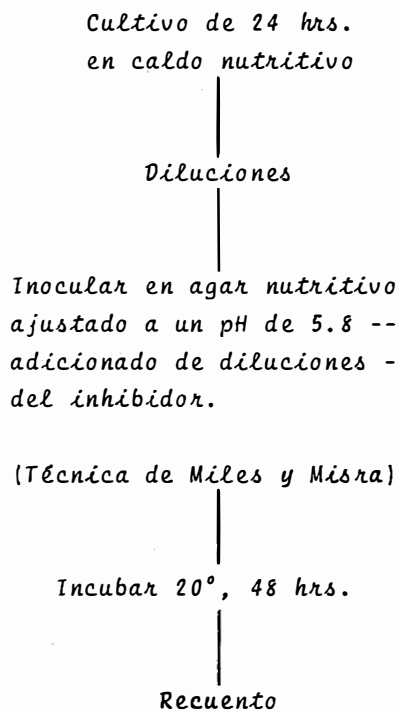




FIGURA 6

## SUSCEPTIBILIDAD DE LOS MICROORGANISMOS AL SORBATO DE POTASIO



## RESULTADOS Y DISCUSION:

La descomposición del pescado a 20° se acompaña de un incremento progresivo en la carga de bacterias psicrótroficas (Tabla 1). En nuestro caso el valor de la mediana en los 4 estudios se elevó unas 1000 veces partiendo de un producto que mostraba 23 000 colonias/cm<sup>2</sup>. El tiempo requerido para la aparición de los primeros signos de alteración oscilaron entre 24 y 36 hrs. Es interesante destacar la homogeneidad de las 4 muestras estudiadas, que se expresa en la proximidad de los valores mínimo y máximo del producto fresco ( $6.8 \times 10^3$  a  $3.2 \times 10^4$ ). En producto alterado las cifras de las 4 medidas de resumen están muy próximas, lo que es explicable por la condición de deterioro en el que se encuentra el producto.

Los géneros identificados en las muestras de pescado recién capturado, cuando éste se encuentra fresco y cuando se ha dejado alterar, se muestran en la Tabla 2. En el primero, más de la tercera parte (37%) de las cepas identificadas corresponden al género Moraxella, seguido de Acinetobacter (18%) y Micrococcus (12%). En el pescado alterado Acinetobacter y Micrococcus ocupan el primero y segundo lugar de frecuencia, a diferencia de la información consignada en la literatura (11, 13 y 18). La incidencia de Micrococcus en el pescado fresco fue más bien baja; en cambio la de Pseudomonas resultó tan baja en el producto alterado que no parece haber jugado papel importante en la descomposición del alimento. De la misma manera encontramos que los géneros Moraxella, -- Acinetobacter y Flavobacterium conocidos como activos participantes en la descomposición del pescado, (11 y 13) cubrieron el 66% de las cepas en el alimento fresco y 53% en el alterado; no incrementaron su número.

Esta situación se puede explicar por el hecho de --

que el estudio que consignamos se realizó en muestras almacenadas a 20°, en tanto que la temperatura de conservación en la casi totalidad de los casos reportados en la literatura se han efectuado sin abuso de la temperatura, esto es a temperatura inferior de 6°.

Se identificaron en total 11 géneros. 12% de las 111 cepas sometidas al estudio taxonómico no pudieron ser identificadas con los esquemas utilizados en el pescado --- fresco.

En el producto alterado la identificación fue casi total.

En un total de 68 y 46 cepas se determinó la susceptibilidad al sorbato de potasio y al benzoato de sodio - respectivamente, a pH de 5.8 en ambos casos.

Estas sustancias exhiben un acentuado efecto bacteriostático en tanto la molécula se encuentra sin ionizar<sup>(12)</sup>. Ello implica el funcionamiento en un sustrato con pH francamente ácido. Cuando el pH es de 7, tan sólo el 0.48% de -- las moléculas de ácido sórbico se encuentran sin disociar; a pH 6, 4.1%, a pH 5 el 30% y a pH 4 el 82%<sup>(12)</sup>. En otras palabras, la actividad manifiesta a pH de 4 requiere aproximadamente de 200 veces una mayor concentración que a pH de 7.

El pH de benzoato de sodio es de 4.20 y a pH de -- 4.0 el 60% del compuesto no está disociado, mientras que a pH de 6.0 solamente está sin disociar el 1.5%. Esto da como resultado una restricción en la aplicación del benzoato de sodio como preservativo a los alimentos muy ácidos.

Por otra parte, ensayar la actividad de estas subs

tancias en un medio de cultivo a pH por abajo de 5 ó menos, presenta 2 inconvenientes: En primer lugar no refleja la - situación que se da en el pescado, cuyo pH se aproxima a la neutralidad y más aún tiende a alcalinizarse conforme se al macena y los microorganismos entran en actividad. En segun do lugar esa cifra de pH ya resulta bacteriostática por sí sola para muchos microorganismos.

Un estudio preliminar nos mostró que la cifra de - pH que interfería menos con el desarrollo de las bacterias que estábamos interesados en inhibir estaba próxima a 5.8 . Por tal razón, y aún reconociendo que el sorbato y benzoato en tales condiciones sólo exhiben parte de su capacidad bac teriostática, procedimos a estudiar la susceptibilidad de - los cultivos aislados a ese pH. Es conveniente señalar que durante la preservación de los alimentos perecederos no sólo suele recurrirse a un mecanismo de inhibición de microor ganismos, sino que, ante todo, se recomienda la aplicación de medidas que contribuyan a prolongar su frescura. Por -- ejemplo, una carga bacteriana inicial baja, requiere efec - tos menos drásticos de preservación que un producto con car ga inicial elevada, lo que es posible conseguir cuando se - siguen prácticas sanitarias de fabricación.

En la Tabala 3 se muestra el porcentaje de cepas - inhibidas a las diferentes concentraciones probadas de los conservadores.

El 31% de 68 cepas mostraron susceptibilidad al -- sorbato de potasio a la menor concentración probada (0.1%), mientras que para el benzoato de sodio fue el 41% entre 46 cepas. Al aumentar la concentración de los inhibidores a - 0.3%, el 46% y 78% de las cepas probadas al sorbato de pota sio y benzoato de sodio respectivamente, no desarrollaron - en el medio.

Cuando la concentración de inhibidores probada fue de 0.5%, el porcentaje, como es de esperar, se incrementó - dando un valor de 63% para el sorbato de potasio y de 91% - para el benzoato de sodio.

En otras palabras, la tercera parte o más de las - cepas se inhibieron con la menor concentración, y más de -- dos terceras partes con la mayor concentración. Por otra - parte el 37% (25 cepas) y el 9% (6 cepas) fueron resisten - tes al sorbato de potasio y benzoato de sodio respectivamen - te.

Esta frecuencia de cepas resistentes es relativa - mente elevada para el sorbato de potasio y podría interpre - tarse como que no tiene aplicación el uso de inhibidores en la conservación del pescado; sin embargo, es posible que es - to no sea una conclusión acertada, dado que en asociación - con otras medidas podrían tener mayor significado. Así, un efecto discreto del sorbato de potasio y benzoato de sodio en la preservación del pescado puede ser significativa, si se asocia a un alimento protegido de la contaminación y/o - a la aplicación de otra medida de preservación concurrente, como puede ser la refrigeración, la incorporación de culti - vos lácticos u otra.

Los géneros bacterianos mostraron desigual suscep - tibilidad al efecto inhibitorio de los diferentes inhibido - res.

Para el sorbato de potasio los resultados se repor - tan en la Tabla 4. El género Moraxella no desarrolló en -- los medios adicionados aún con la menor concentración del - agente inhibitorio y el género Acinetobacter mostró una fre - cuencia relativamente alta de inhibición (61%).

Las cepas probadas de los géneros Micrococcus y --

Flavobacterium no se inhibieron a la concentración del 0.1% de sorbato de potasio. Es de esperarse que conforme aumenten las concentraciones de estas sustancias, mayor inhibición registrarán las cepas. Así, para la concentración de 0.3% de sorbato, Flavobacterium no muestra susceptibilidad alguna. Se inhibe el 15% de las cepas de Micrococcus, y en 0.5% del inhibidor un 35% mostrando así globalmente un 50% de cepas resistentes. El género Flavobacterium presentó mayor resistencia que los restantes géneros, puesto que el -- 25% se inhibió con la mayor concentración (0.5%).

De acuerdo a los resultados obtenidos observamos -- la clara tendencia de inhibición de los géneros más frecuentemente involucrados en la descomposición del pescado. Una excepción es el caso de los géneros Micrococcus y Flavobacterium, de los cuales el 50% y 75% de las cepas respectivamente, -- fueron resistentes.

Con el benzoato de sodio los resultados obtenidos fueron similares (Tabla 5), ya que los géneros Moraxella y Acinetobacter muestran el primero y segundo lugar de frecuencia respectivamente de susceptibilidad a la mínima concentración inhibitoria.

Los géneros Micrococcus y Flavobacterium fueron -- más susceptibles al efecto inhibitorio del benzoato que del sorbato. El género Flavobacterium, mientras que en sorbato se inhibe el 25% a la concentración de 0.5%, en benzoato de sodio muestra un 50% de inhibición a una menor concentración (0.3%).

Los resultados mostrados en las dos tablas anteriores parecen poner de manifiesto mayor capacidad de inhibición del benzoato de sodio con respecto al sorbato de potasio. Aún así, tomando en cuenta que la toxicidad del sorba-

to correspondería tan sólo a un 50% de la exhibida por el cloruro de sodio, además de ser un compuesto metabolizable por el hombre, lo coloca en posición más ventajosa.

Los resultados reportados hasta este momento corresponden a las muestras obtenidas directamente del océano. Cuando los pescados sujetos al presente estudio procedían del comercio, los resultados obtenidos muestran algunas diferencias.

El género Pseudomonas y Acinetobacter ocuparon el primero y segundo lugar de frecuencias respectivamente tanto en el fresco como en el alterado. De 15 cepas probadas, el 40% fueron inhibidas con la mínima concentración probada de sorbato de potasio, y otro 40% fue resistente (Tabla 6). Esta cifra de cepas resistentes se encuentra influida por la acumulación de dichas cepas en un solo género (Pseudomonas).

El género Pseudomonas fue poco frecuente en muestras obtenidas del océano; en contraste, en los pescados adquiridos del comercio este género predominó. Esto podría explicarse si tomamos en cuenta que el pescado extraído directamente del océano no fue expuesto a contaminación posterior, ya que al momento de ser capturado fue colocado en bolsas de plástico y a su vez dentro de hieleras, para su transporte al laboratorio.

La susceptibilidad de estos géneros al sorbato de potasio mostró también variaciones con respecto a los pescados adquiridos directamente en el litoral.

En la Tabla 7 se observa que el género Pseudomonas mostró resistencia al sorbato de potasio, ya que solamente el 17% se inhibió a la mayor concentración (0.5%) del inhi-

bidor. A diferencia de los resultados reportados en las Tablas 4 y 5, aquí el género Flavobacterium fue muy susceptible a la concentración de 0.1%, aunque el número de cepas probado fue bastante reducido.

Los resultados anteriores muestran que el carácter no ácido del pescado constituye una limitación importante - para poder aplicar los conservadores químicos del tipo del sorbato de potasio y benzoato de sodio para su preservación.



TABLA 1

RECUEENTOS DE BACTERIAS MESOFILICAS AEROBIAS EN 4 MUESTRAS -  
DE PESCADO FRESCO Y ALTERADO, PROCEDENTE DIRECTAMENTE DEL -  
MAR.

	PESCADO FRESCO col/cm <sup>2</sup>	PESCADO ALTERADO col/cm <sup>2</sup>
MAXIMA	$3.2 \times 10^4$	$3.8 \times 10^7$
MINIMA	$6.8 \times 10^3$	$1.5 \times 10^7$
MEDIA	$1.9 \times 10^4$	$2.4 \times 10^7$
MEDIANA	$2.3 \times 10^4$	$2.7 \times 10^7$

*Pescado almacenado a 20° hasta mostrar signos de alteración.*

TABLA 2

GENEROS BACTERIANOS IDENTIFICADOS A PARTIR DE PESCADO FRESCO Y ALTERADO.

GENERO	PESCADO FRESCO		PESCADO ALTERADO	
	Nº de Cepas	(%)	Nº de cepas	(%)
<u>Moraxella</u>	41	(37)	31	(20)
<u>Acinetobacter</u>	20	(18)	40	(26)
<u>Micrococcus</u>	13	(12)	37	(24)
<u>Flavobacterium</u>	12	(11)	11	(7)
<u>Enterobacteriaceae</u>	4	(4)	14	(9)
<u>Staphylococcus</u>	3	(3)	13	(8)
<u>Vibrio - Aeromonas</u>	1	(.9)	2	(1.2)
<u>Pseudomonas</u>	0	(0)	2	(1.2)
<u>Bacillus</u>	3	(3)	0	(0)
<u>Planococcus</u>	1	(.9)	0	(0)
<u>Pediococcus</u>	0	(0)	1	(.6)
No identificadas	<u>13</u>	<u>(12)</u>	<u>4</u>	<u>(2.5)</u>
TOTAL	111	100	155	100

TABLA 3

INHIBICION POR EL SORBATO DE POTASIO Y BENZOATO DE SODIO --  
 SOBRE BACTERIAS ASOCIADAS A LA DESCOMPOSICION DEL PESCADO,  
 A UN PH DE 5.8.

Concentración de inhibidores	Sorbato de potasio		Benzoato de sodio	
	Nº de cepas	cepas inhibidas	Nº de cepas	cepas inhibidas
( % )		( % )		( % )
0	68	0	46	0
0.1	68	31	46	41
0.3	68	46	46	78
0.5	68	63	46	91
No inhibición	25		6	

TABLA 4

SUSCEPTIBILIDAD AL SORBATO DE POTASIO DE DIFERENTES GENEROS DE BACTERIAS ASOCIADAS AL DETERIORO DEL PESCADO.

GENERO	CANTIDAD DE CEPAS PROBADAS	M. C. I.			CEPAS RESISTENTES %
		0.1 %	0.3 %	0.5 %	
<u>Moraxella</u>	9	100	0	0	0
<u>Acinetobacter</u>	18	61	17	5	17
<u>Flavobacterium</u>	8	0	0	25	75
<u>Micrococcus</u>	26	0	15	35	50
No identificadas	7	14	43	0	43

M. C. I. - Mínima Concentración Inhibitoria.

TABLA 5

SUSCEPTIBILIDAD AL BENZOATO DE SODIO DE DIFERENTES GENEROS DE BACTERIAS ASOCIADAS AL DETERIORO DEL PESCADO.

GENERO	CANTIDAD DE CEPAS PROBADAS	M. C. I.			CEPAS RESISTENTES %
		0.1 %	0.3 %	0.5 %	
<u>Moraxella</u>	11	82	9	9	0
<u>Acinetobacter</u>	10	60	30	0	10
<u>Micrococcus</u>	14	14	57	21	7
<u>Flavobacterium</u>	4	0	50	0	50
Otros	6	17	50	33	0
No identificadas	1	100	0	0	0

M. C. I. - Mínima Concentración Inhibitoria.

TABLA 6

MINIMA CONCENTRACION INHIBITORIA DEL SORBATO DE POTASIO --  
 SOBRE BACTERIAS ASOCIADAS A LA PUTREFACCION DEL PESCADO --  
 OBTENIDO DEL COMERCIO.

	CONCENTRACION DE SORBATO				Total
	0.1	0.3	0.5	No inhibición	
Nº de cepas	6	1	2	6	15
%	40	7	13	40	100 %

pH del medio 5.8

TABLA 7

SUSCEPTIBILIDAD AL SORBATO DE POTASIO SEGUN GENERO EN BACTERIAS ASOCIADAS A LA PUTREFACCION DE PESCADO OBTENIDO EN EL - COMERCIO.

GENERO	CANTIDAD DE CEPAS PROBADAS	M. C. I.			CEPAS RESISTENTES
		0.1	0.3	0.5	
		%	%	%	
<u>Pseudomonas</u>	6	0	0	17	83
<u>Acinetobacter</u>	4	75	0	0	25
<u>Moraxella</u>	3	33	33	34	0
<u>Flavobacterium</u>	1	100	0	0	0
<u>Vibrio - Aeromonas</u>	1	100	0	0	0

M. C. I. - Mínima Concentración Inhibitoria.

## CONCLUSIONES :

1. El contenido bacteriano de muestras de pescado obtenidas directamente del mar mostró una mediana de 23 000 - col/cm<sup>2</sup>. El producto alterado a 20° mostró 27 x 10<sup>6</sup> - col/cm<sup>2</sup>.
2. Los géneros predominantes en el producto alterado fueron: Acinetobacter, Micrococcus, Moraxella y Flavobacterium.
3. Se requiere de una concentración de 0.5% de sorbato de potasio para inhibir al 63% de las cepas. Con la misma concentración el benzoato inhibió al 91%.
4. El género más susceptible al benzoato de sodio fue Moraxella y el más resistente Flavobacterium.
5. El pH de las muestras sin alterar fue de 6.5.
6. Los resultados anteriores muestran que la baja acidez del pescado constituye una limitación importante para poder aplicar los conservadores químicos del tipo del sorbato de potasio y benzoato de sodio para su preservación.



## RESUMEN :

Se identificó la flora bacteriana predominante en muestras de pescado obtenidas del comercio al menudeo, así como en unidades capturadas directamente del mar y en las mismas después de permitir su alteración en el laboratorio, conservadas a 20°. Los géneros predominantes en ambos casos fueron: Moraxella, Acinetobacter, Micrococcus, Flavobacterium y Enterobacteriaceae. En menor proporción se identificaron: Pseudomonas, Staphylococcus, Vibrio-Aeromonas, Bacillus, -- Planococcus y Pediococcus.

Se probó la susceptibilidad al sorbato de potasio y benzoato de sodio de 68 y 46 cepas respectivamente de bacterias asociadas al deterioro.

A partir de cultivos frescos de los géneros aislados del pescado se inocularon diluciones sobre agar nutritivo a un pH de 5.8 añadido de concentraciones crecientes del conservador. Se realizaron recuentos por la técnica de --- Miles y Misra y se estableció la susceptibilidad relacionando el número de colonias desarrolladas en el medio con inhibidor entre las colonias contadas sobre el mismo medio sin inhibidor. El 31 % y 41 % se inhibió a la menor concentración probada (0.1 %) respectivamente para el sorbato de potasio y benzoato de sodio. 46 y 78%, y 63 y 46% las cepas probadas mostraron una MCI al 0.3 y 0.5% de sorbato y de -- benzoato respectivamente. Moraxella y Acinetobacter fueron los géneros más susceptibles con MCI de 0.1% tanto para sorbato como para benzoato. Los géneros Micrococcus y Flavobacterium fueron resistentes a la mayor concentración de sorbato y benzoato probadas respectivamente.

## BIBLIOGRAFIA :

1. Baldock, U.D., Frank, P.P. Graham and F.J. Ivey. 1979. Potassium Sorbate as a Fungistatic Agent in Country Ham Processing. *J. Food Prot.* 42: 780-783.
2. Beuchat, L.R. 1981. Effects of Potassium Sorbate and Sodium Benzoate on Inactivating Yeasts Heated in Broths Containing Sodium Chloride and Sucrose. *J. Food Prot.* - 44: 765-769.
3. Beuchat, L.R. 1981. Influence of Potassium Sorbate and Sodium Benzoate on Heat Inactivation of Aspergillus flavus, Penicillium puberulam and Gaotrichum candidum. *J. Food Prot.* 44: 450-454.
4. Buchanan, R.E. y N.E. Gibbons. 1975. *Bergey's Manual - of Determinative Bacteriology*. 8a. ed. William & Wilkins.
5. Castillo Ayala, A. y Fernández Escartín, E. 1985. Flora microbiana del pescado fresco y durante su descomposi - ción a 20°. XVI Congreso Nacional de Microbiología. --- Dgo. Méx.
6. Chung, Y.M. and J.S. Lee. 1981. Inhibition of Micro -- bial Growth in English Sole (Parophrys retulus). *J. --- Food Prot.* 44: 66-68.
7. Everett, R. 1976. *Comunicación en las Campañas de Plani ficación Familiar*. Ed. Pax-México-Mex.
8. Fernández Escartín, E. 1976. *El diseño y la Aplicación de los Estándares Microbianos en el Control Sanitario - de los Alimentos*, S.S.A.

9. Fernández Escartín, E. 1981. *Microbiología Sanitaria. Agua y alimentos.* ed. Univ. Guadalajara. México.
10. Flores Curiel, R. y González Sotero, R. 1985. *Diseño de un medio de cultivo para el recuento y estudio de la flora microbiana del pescado y camarón fresco.* Tesis - Profesional. Facultad de Ciencias Químicas. Univ. Guadalajara. México.
11. Frazier, W.C. 1976. *Microbiología de los alimentos.* ed. Mc Graw-Hill Book Company. New York, U.S.A.
12. *International Commission on Microbiological Specifications for Food.* 1980. *Ecología Microbiana de los Alimentos. 1. Factores que afectan la supervivencia de los microorganismos en los alimentos.* ed. Acribia. Zaragoza España.
13. Jay, J.M. 1978. *Microbiología Moderna de los Alimentos.* ed. Acribia. Zaragoza España.
14. Kaul, A., J. Singh and R.K. Kuila. 1979. *Effect of Potassium Sorbate on the Microbiological Quality of Butter.* *J. Food Prot.* 42: 656-657.
15. Liewen, B.M. and H.E. Marth. 1985. *Growth and Inhibition of Microorganisms in the Presence of Sorbic Acid: A Review.* *J. Food Prot.* 48: 365-375.
16. Lynch, D.J. and N.N. Potter. 1982. *Effects of Potassium Sorbate on Normal Flora and Staphylococcus aureus added to minced cod.* *J. Food Prot.* 45: 824-828.
17. Mac Faddin, J.F. 1984. *Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica.* ed. Panamericana.

18. Nickelson, J.T. and A.J. Sinskey. 1972. *Microbiology - of Foods and Food Processing*. ed. American Elsevier --- Publishing Co. Inc. New York (U.S.A.)
19. Pierson, M.D., L.A. Smoot and N.J. Stern. 1979. *Effect of Potassium Sorbate on Growth of Staphylococcus aureus in Bacon*. *J. Food Prot.* 42: 302-304
20. Robach, M.C. 1979. *Extension of Shelf - Life of Fresh Whole Broilers, using a Potassium Sorbate Dip*. *J. Food Prot.* 42: 855-857.
21. Robach, M.C. 1979. *Influence of Potassium Sorbate on - Growth of Pseudomonas putrefaciens*. *J. Food Prot.* 42: 855-857.
22. Salle, A.J., B.S., M.S. and Ph. D. 1973. *Laboratory -- Manual on Fundamental Principles of Bacteriology*. 7a. - ed. Mc Graw-Hill Book Company. New York, U.S.A.
23. Sofos, J.N., and F.F. Busta. 1981. *Antimicrobial Activity of Sorbate*. *J. Food. Prot.* 44: 614-622
24. Speck, M.L. 1976. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food*. American Public Health Association, Inc.
25. Statham, J.A. and H.A. Bremmer. 1983. *Effect of Potassium Sorbate on Spoilage of Blue Grenadier (Macrurus novaezelandiae) as Assessed by Microbiology and Sensory Profiles*. *J. Food Prot.* 46: 1084-1091.
26. Vanderzant, C. and R. Nickelson. 1969. *A Microbiological Examination of Muscle Tissue of Beef, Pork and Lamb Carcasses*. *J. Milk Food Technol.* 32: 357-361.



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
Facultad de Ciencias

Expediente .....  
Número ..... 685/85

Sr. Raúl López Cruz  
P r e s e n t e . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido -  
aprobado el tema de Tesis "Susceptibilidad al sorbato de po  
tasio y benzoato de sodio de bacterias asociadas a la des\_\_  
composición del pescado crudo conservado a 20°" para obte\_\_  
ner la Licenciatura en Biología, con Orientación Recursos -  
Naturales.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido ---  
aceptado como Director de dicha Tesis el Dr. Oswaldo Pala\_\_  
cios Rivera.



FACULTAD DE CIENCIAS

A T E N T A M E N T E  
"PIENSA Y TRABAJA"  
Guadalajara, Jal., Noviembre 25 de 1985

El Director

Ing. Edmundo Ponce Adame.

El Secretario

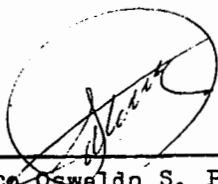
Arq. Mario Patricio Castillo Paredes.

c.c.p. El Dr. Oswaldo Palacios Rivera, Director de Tesis.-Pte.  
c.c.p. El expediente del alumno.

Ing. Edmundo Ponce Adame.  
Director.  
Facultad de Ciencias.  
Universidad de Guadalajara.

Por la presente, nos permitimos informarle de nuestra entera satisfacción por el desarrollo y la terminación del trabajo de tesis titulado: "SUSCEPTIBILIDAD AL SORBATO DE POTASIO Y BENZOATO DE SODIO DE BACTERIAS ASOCIADAS A LA -DESCOMPOSICION DEL PESCADO CRUDO CONSERVADO A 20°", realizado por el pasante de Licenciado en BIOLOGIA: RAUL LOPEZ CRUZ.

Agradeciendo de antemano sus finas atenciones, nos despedimos de Usted.



---

Médico Oswaldo S. Palacios R.  
Director de Tesis



---

Q.B.P. Eduardo Fernández E.  
Co-Director de Tesis.

Guadalajara, Jal., 3 de marzo de 1986.