

---

---

*Universidad de Guadalajara*

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS



DESTINO DE SALMONELLA EN CEVICHE DE  
PESCADO ALMACENADO A 10° Y 20°

---

---

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGIA  
P R E S E N T A  
MA. LUZ CARMEN BEAS RAMIREZ

---

---

GUADALAJARA, JAL., 1989

---

---

DESTINO DE SALMONELLA EN CEVICHE DE PESCADO

ALMACENADO A 10° Y 20°.



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente .....  
Número ..... 1238/88

SRITA. MA. LUZ CARMEN BEAS RAMIREZ  
P R E S E N T E . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "DESTINO DE SALMONELLA EN CEVICHE DE PESCADO ALMACENADO A TEMPERATURA DE 10<sup>o</sup> Y 20<sup>o</sup>" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido aceptada - como Directora de dicha Tesis a la Q.F.B. Rosa María Puebla Pérez.

A T E N T A M E N T E  
"AÑO ENRIQUE DIAZ DE LEÓN"  
"PIENSA Y TRABAJA"

Guadalajara, Jal., Octubre 19 de 1988



EL DIRECTOR

DR. CARLOS ASTENBO OSUNA

FACULTAD DE CIENCIAS

EL SECRETARIO

ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS CARDENAS.

c.c.p. La Q.F.B. Rosa María Puebla Pérez, Directora de Tesis.-Pte.  
c.c.p. El expediente de la alumna.

'mjsd.



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente .....

Número 505/89 .....

SRITA. MA. LUZ CARMEN BEAS RAMIREZ  
P R E S E N T E . -

Por este conducto nos permitimos informar a usted que se autoriza la modificación al título de Tesis "DESTINO DE SALMONELLA EN CEVICHE DE PESCADO ALMACENADO A TEMPERATURA DE 10° Y 20°" por el de "DESTINO DE SALMONELLA EN CEVICHE DE PESCADO ALMACENADO A 10° Y 20°".

Sin otro particular nos es grato reiterar a usted la expresión de nuestra consideración más distinguida.

ATENTAMENTE  
"PIENSA Y TRABAJA"

Guadalajara, Jal., Mayo 24 de 1989

EL DIRECTOR

ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS CARDENAS



FACULTAD DE CIENCIAS

EL SECRETARIO

M. EN C. ROBERTO MIRANDA MEDRANO

c.c.p. La Q.F.B. Rosa Ma Puebla Pérez, Directora de Tesis.-Pte.  
c.c.p. El expediente de la alumna.

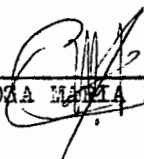
Guadalajara, Jal, Mayo 31 de 1989.

Ing. Adolfo Espinoza De Los Monteros Cardenas  
Director de la Facultad de Ciencias.  
Universidad de Guadalajara  
PRESENTE.

Me permite comunicar a usted de la manera más atenta que a la C. Ma. Luz Carmen Beas Ramirez, ex-alumna de la Facultad a su muy digno cargo, me ha presentado originales de su trabajo de Tesis titulado " DESTINO DE SALMONELLA EN CEVICHE DE PESCADO ALMACENADO A TEMPERATURA DE 10° y 20°", El cual considero, salvo su muy autorizada opinión, ha sido terminado.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un saludo cordial.

ATENTAMENTE

  
\_\_\_\_\_  
Q.F.B. ROA MATIA PUEBLA PEREZ

*La distancia no será barrera que logre se  
parar a los que en verdad se quiere por--  
que existe una fuerza más poderosa a ella:  
El amor, el sentir y la cercanía en pensa  
miento.*

DEDICO ESTA TESIS:

A MIS QUERIDOS PADRES:

*Como símbolo de gratitud  
por el apoyo y esfuerzo  
realizado durante mis --  
años de estudio para lo-  
grar mi realización pro-  
fesional que constituye-  
la herencia más valiosa  
que pudiera recibir.*

A MIS QUERIDOS HERMANOS:

*Mi eterno agradecimiento  
por su apoyo y compren-  
sión durante todos estos  
años.*

*Mi agradecimiento a:  
Q.F.B. Rosa María Puebla.*

*A la maestra Cuca le doy  
las más sinceras gracias  
por su gran dedicación.*

*Trabajo efectuado en el Laboratorio  
de Microbiología Sanitaria de la Fa-  
cultad de Ciencias Químicas de la -  
Universidad de Guadalajara bajo la-  
Asesoría de la Q.F.B.,  
Ma. del Refugio Torres Vitela.*



## I N D I C E

	<i>Página</i>
INTRODUCCION .....	1
GENERALIDADES .....	6
HIPOTESIS.....	12
OBJETIVO.....	13
MATERIA Y METODOS.....	14
RESULTADOS Y DISCUSION.....	39
CONCLUSIONES.....	59
RESUMEN.....	60
BIBLIOGRAFIA.....	61

## I N T R O D U C C I O N

La salmonelosis continúa siendo un problema importante de salud pública en países desarrollados. En nuestro medio las condiciones higiénicas pobres y la costumbre de ingerir alimentos preparados fuera del hogar hacen que el problema sea mayor (3,4). La salmonelosis se mantiene entre una de las más importantes causas de enfermedad provenientes de los alimentos en todo el mundo (2).

Los alimentos contaminados probablemente constituyen en México los mejores vehículos de transmisión de Salmonella (23).

En 1976 en Canadá la Salmonella fue la responsable de aproximadamente el 40% de las enfermedades vehiculizadas por alimentos (32). El género Salmonella es quizá el microorganismo más extensamente estudiado entre los patógenos que pueden ser aislados de los alimentos (12).

En el periodo de 1970-1978 el 11% de los brotes reportados en Estados Unidos vehiculizados por alimentos -- fueron causados por el consumo de pescado y crustáceos marinos. Las enfermedades más comunes fueron; ciguatera, envenenamiento por mariscos, gastroenteritis, fiebre tifoidea, hepatitis A, cólera, shigelosis y salmonelosis entre otras. El almacenamiento inadecuado de pescado contaminado con Salmonella favorece su multiplicación hasta un número que puede causar enfermedad (6).

Estudios realizados en productos marinos en sus diferentes etapas de elaboración y como producto terminado, - revelan que la contaminación bacteriana ocurre primariamente por la exposición al medio ambiente o bien por la contaminación cruzada durante su manejo, transporte y procesamiento. (9).

El tejido del pescado es más perecedero que el de -- otros animales, aun manejado a bajas temperaturas. La calidad de éste empieza a cambiar en el momento en que se - retira del agua, y el pesado "fresco" que se considera muy aceptable desde el punto de vista comercial, no es ya lo que era en el momento de la captura. Aunque la carne de - los peces se encuentra prácticamente estéril, existe un - gran número de bacterias de diferentes tipos en la superficie y sistema digestivo del animal vivo. Cuando el pez - muere estas bacterias atacan rápidamente los componentes de los tejidos presentándose alteraciones que disminuyen - su aceptabilidad por parte del consumidor. Estos procesos ocasionan pérdidas muy cuantiosas en el renglón económico - (24).

El pescado es un producto con alto valor proteínico-- cuya composición química (55-83% de agua, 14-22% de proteínas, aproximadamente 1.6% de carbonatos y 0.9-3.8% de sales minerales) lo que constituye un excelente medio de desarrollo microbiano. Esto, y el hecho de que en el pescado los procesos enzimáticos tengan lugar a temperaturas entre 0-20°, determina su corta vida de anaquel, aún en refrigeración (18).

La flora del pescado recién capturado consiste principalmente en organismos gram negativos de los géneros Pseudomonas, Alteromonas, Moraxella, Acinetobacter, Flavobacte-

rium y Cytophaga; gram positivos del grupo de Coryneformes y Micrococcus (21).

Los agentes causantes de enfermedades vehiculizadas - por pescados y mariscos, se dividen en tres grupos según - la fuente primaria del agente etiológico o toxigénico: (6,20)

- a).- Agentes naturalmente presentes en habitat acuáticos: Vibrio parahaemolyticus o Clostridium botulinum tipo E.
- b).- Provenientes de desagües que contaminan los habitats acuáticos. Entre ellos se encuentran algunas enterobacterias como Salmonella y ciertos virus estéricos.
- c).- Provenientes de la piel y manos de trabajadores-equipo o del medio ambiente: Staphylococcus aureus, Shigella y Salmonella.

Varios estudios han mostrado que las salmonelas son -- contaminantes potenciales de pescado, especialmente el obtenido de aguas contaminadas por desechos humanos e industriales. El conocimiento de brotes de salmonelosis asociados - al consumo de pescado revelan que pueden contaminarse y aun sostener el crecimiento del microorganismo si bien esto sucede en los sitios de preparación y expendio (12).

En E.U.A. los productos marinos frescos de alta calidad son los preferidos por los consumidores, aunque anualmente existe una baja en la venta de dichos productos frescos estimada en un 5% (22).

En América Central el consumo de pescado es limitado - debido a que el pescado fresco no es fácilmente disponible - por carecer de sistemas adecuados para su preservación y --

distribución (11).

Reportes sobre aislamiento de bacterias enteropatógenas a partir de pescado fresco son relativamente pocos. En 1955-se reportó el aislamiento de Salmonella a partir de pescado-vendido en Colombo, Ceylán, encontrándose en los intestinos y agallas de éstos (19).

Más recientemente Curi de Montbrun y Ciecarella (1979) reportaron el hallazgo de Salmonella en carne de pescado -obtenida en establecimientos de expendio público en la ciudad de Mendoza, Argentina, con un índice del 6% (8).

Wyatt y col. (35) encontraron salmonelas en el 25% de las muestras de bagres cultivados artificialmente, en el 5% de los especímenes capturados de su fuente natural.

Desde tiempo atrás el consumo de productos marinos ha-tenido repercusiones en lo que respecta a la salud pública, por considerarse vehículos potenciales de infección humana-e intoxicaciones (5).

En la ciudad de Guadalajara el consumir alimentos ex-pedidos en la vía pública es una práctica muy extendida; -tal es el caso del ceviche de pescado alimento de amplio -consumo popular, que se expende en comercios fijos, semi-fijos o ambulantes y es manejado en condiciones higiénicas bastante deficientes.

Se han llevado a cabo muestreos en ceviche de pescado que revelan la incidencia de Salmonella en un 22.5%. (33).

Considerando la gran demanda del ceviche de pescado en esta ciudad y los riesgos de contaminación que implica su preparación y expendio, se llevó a cabo un estudio modelo en el Laboratorio de Microbiología Sanitaria de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guadalajara para conocer la dinámica de Salmonella artificialmente inoculada en ceviche recién preparado, durante su almacenamiento en refrigeración y en condiciones de abuso de temperatura tratando de reproducir cuanto acontece en la realidad.

## GENERALIDADES

La salmonelosis es un proceso infeccioso cuyo cuadro clínico en el hombre varía desde formas muy agudas que --terminan fatalmente, hasta los casos de infección muy leves o del todo asintomáticos. Es un padecimiento de alta incidencia en nuestro país y de distribución mundial considerado una de las más importantes enfermedades zoonóticas (12). El periodo de incubación transcurre dentro de límites que pueden variar desde 3 hasta 72 y excepcionalmente más horas, aunque la tendencia del valor modal se encuentra entre 12 y 20 hrs. El tiempo depende de diversos factores como son el número de gérmenes consumidos, su virulencia y la susceptibilidad del individuo entre las más importantes (12).

El género Salmonella es un grupo de bacterias bioquímicamente y serológicamente relacionadas que incluye aproximadamente 2 000 serotipos reconocidos (2). El desarrollo de las salmonelas en una gran variedad de alimentos - ha sido motivo de numerosos estudios que constantemente se llevan a cabo para llegar al establecimiento de estrategias que conduzcan al control epidemiológico de los padecimientos a que da lugar en el hombre y en los animales

Por razones de orden práctico, para romper con la -- larga lista de especies de Salmonella que llegó a acumularse conforme se encontraban nuevas configuraciones antigénicas, se resolvió adoptar el sistema de sólo tres especies: (12).

- a).- La S. typhi descrita por Eberth en 1880, causante de la fiebre tifoidea.
- b).- La S. cholerae - suis descrita en 1885, que -- constituye la especie tipo.
- c).- La S. enteritidis descrita en 1888, que corresponde a la denominación más antigua del género. El resto de las salmonelas se consideran como serotipos de esta última especie.

Según el grado de adaptación que exhiben hacia sus huéspedes las salmonelas pueden incluirse en tres grupos:

- a).- Los adaptados más o menos estrictamente al hombre:  
S. typhi, S. enteritidis ser(Serotipo) paratyphi C. y S. enteritidis ser sendai.
- b).- Los mejores adaptados a huéspedes animales particulares, aunque presentan también huéspedes secundarios y ocasionalmente afectan al hombre y son: S. enteritidis ser pullorum, ser gallinarum, ser abortusequi, ser abortusovis, ser choleraesuis y ser typhisuis.
- c).- Los serotipos no adaptados, que incluyen al resto y atacan sin preferencia al hombre o a los animales.

Para estos patógenos la temperatura óptima de desarrollo es de 37° y pueden hacerlo dentro de amplios márgenes, desde unos 6.7° con largos tiempos de generación en algunos alimentos, hasta 45.6°. Cuando el pH del medio se aproxima a la neutralidad, el germen se multiplica más activamente, el óptimo varía entre 6.5 y 7.5. En congelación



pueden sobrevivir durante muchos meses como ocurre en la mayoría de los microorganismos, pero la composición del alimento en el cual se encuentra influye en la tasa de so brev ivencia.

En el estudio de la dinámica de microorganismos patógenos suele ser de gran utilidad la determinación de grupos microbianos de interés sanitario con el propósito de conocer el papel que juegan estos en el destino del pató geno en un alimento. Los grupos microbianos más ampliamente utilizados son la cuenta total de bacterias mesofílicas aerobias y coliformes.

Los organismos coliformes se definen como bacterias aerobias o facultativamente anaerobias, gram negativas, no esporuladas que fermentan la lactosa con producción de gas dentro de las 48 hrs. de incubación a 35° (12).

Los organismos coliformes pueden sobrevivir en una gran variedad de sustratos e incluso fuera del intestino del hombre y de los animales. Su sobrevivencia, desarrollo o muerte depende de varios factores como son: La acidez, la desecación, la congelación, la descongelación y otros.

Su presencia y recuento en los alimentos adquiere -- cierto significado, dependiendo de cada caso en particular:

- a).- Son indicativos de prácticas sanitarias objetables en el manejo o fabricación de un alimento.
- b).- Expresan la calidad microbiológica de un produc

to, lo que no necesariamente implica un riesgo sanitario.

- c).- Revelan la eficiencia de un proceso descontaminante o germicida.
- d).- Su presencia y número es algo fortuito; no guarda relación con la obtención o conservación del alimento.

El recuento de colonias bacterianas en medios de cultivo con un adecuado soporte nutricional y libres de agentes inhibidores es ampliamente utilizado con diversos propósitos en el análisis de alimentos, perecederos o no, -- agua, equipo y otros productos.

Cuando se pretende contar el máximo de microorganismos, y la incubación se ha realizado entre los 20 y los 37°, se le designa como cuenta de bacterias mesofílicas aerobias. La variedad de microorganismos que conforman el grupo es muy heterogéneo (12). El significado de su presencia en los alimentos y otros sustratos es el siguiente

- a).- Como indicador de la posible presencia de gérmenes patógenos.
- b).- Como indicador del valor comercial de un alimento.
- c).- Como indicador de las condiciones higiénicas en que ha sido manejado un producto.
- d).- Como indicador de la idoneidad de un ingrediente crudo que se va incorporar a un alimento.
- e).- Para seguir la eficiencia de un proceso germicida o de preservación.

f).- Para predecir la vida de anaquel de un alimento.

Definir el significado de un determinado grupo microbiano en un alimento implica el manejo de amplia información, no sólo sobre la ecología y características propias de ese grupo, inclusive su comportamiento en el producto, sino de la composición y condiciones de fabricación y almacenamiento de este último. El grupo microbiano en cuestión puede carecer de significado sanitario, esto es, su presencia o abundancia no guarda relación con los riesgos que pudiera derivarse de algún patógeno simultáneamente presente. Puede ser válido sin embargo, delinear una asociación entre el grupo microbiano y la calidad comercial del alimento, en cuyo caso se establecería una norma entre comprador y vendedor para definir las condiciones de sus operaciones.

El conocimiento de las diferentes bacterias y sus características son de gran importancia en el perfeccionamiento de los métodos de manejo y preservación en el pescado y sus productos (28). Ya que la flora microbiana del pescado y los métodos de manejo de los mismos, determinan su vida de anaquel, sobre todo cuando se distribuyen frescos. La mayoría de los intentos para introducir técnicas modernas para su preservación han sido basadas en los resultados de estudios en la descomposición microbiológica y química. (11).

Numerosos métodos químicos han sido propuestos como un apoyo para estimar el grado de frescura en pescado, -- entre ellos se incluye la cuantificación de nitrógeno volátil total producto de la descomposición bacteriana y de -

las enzimas naturales de los tejidos que puede ser utilizada para determinar el grado de frescura en el pescado, - siendo importante el conocer la temperatura bajo la cual el producto ha sido almacenado, con la finalidad de poder trazar el índice de descomposición y su potencial de preservación (30).

Dado el carácter perecedero tan marcado que exhibe - el pescado y demás alimentos marinos, el renglón de la -- conservación merece especial atención tanto en lo que respecta a la tecnología como a los métodos de conservación (11)

**HIPOTESIS:**

La Salmonella posee capacidad para desarrollar en el ceviche de pescado (pH 4.2 - 5.2) almacenado en refrigeración y en condiciones de abuso de temperatura.

Esta potencialidad genera riesgos para la salud.

**OBJETIVO:**

*Determinar el comportamiento de Salmenella typhimurium y Salmonella derby en ceviche de pescado inoculado artificialmente, durante su almacenamiento en refrigeración y en condiciones de abuso de temperatura.*

## MATERIAL Y METODOS

- Abatelenguas estériles
- Agitador mecánico Vortex
- Algodón.
- Asas bacteriológicas
- Balanza analítica con sensibilidad de 0.0001 g.
- Balanza granataria con sensibilidad de 0.1 g.
- Baño María a  $43^{\circ} \pm 0.5^{\circ}$  con termostato
- Baño María a  $45^{\circ} \pm 1^{\circ}$  con termostato
- Bolsas de polietileno
- Cajas de Conway
- Cajas de Petri estériles de 100X 15 mm.
- Cajeteros, espátulas, pipeteros, y porta pipetero
- Centrífuga
- Contador de colonias Quebec
- Cuchillos estériles
- Embudos
- Frascos botella de 200 ml. con tapón de rosca
- Gradilla metálica para tubos
- Horno esterilizador
- Incubadora a  $35^{\circ} \pm 1^{\circ}$
- Matraces Erlenmeyer varios tamaños
- Mechero de Bunsen y Fisher
- Mortero
- Olla de presión con manómetro
- Papel Filtro
- Pipetas bacteriológicas estériles de 1, 2, 5 y 10 ml. graduadas y de 1 ml. volumétricas.
- Potenciómetro Cornig 125
- Recipientes de vidrio estériles
- Refrigerador
- Termómetro

- Tubos de ensaye con tapón de rosca (13 X 100 y 16 X 150 mm)
- Vasos de precipitado de 50 ml.
- Varillas de vidrio estériles de 10 cm.

#### INGREDIENTES DEL CEVICHE.

- Cebolla
- Jitomate
- Limón
- Sal
- Pescado crudo molido

#### MATERIAL BIOLÓGICO

- Cepas de Salmonella typhimurium y Salmonella derby aisladas de alimentos e identificadas en el Laboratorio de Microbiología Sanitaria de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guadalajara.

#### MEDIOS DE CULTIVO (BIOXON)

- |                                     |        |
|-------------------------------------|--------|
| - Agar bilis rojo violeta           | (ABRV) |
| - Agar cuenta estándar              | (ACE)  |
| - Agar hierro triple azúcar         | (TSI)  |
| - Agar hierro lisina                | (LIA)  |
| - Agar sulfito bismuto              | (SB)   |
| - Agar verde brillante sulfadiazina | (VBS)  |
| - Caldo selenito cistina            | (CSC)  |
| - Caldo soya tripticasa             | (CST)  |
| - Caldo tetratoato verde brillante  | (CTT)  |
| - Diluyente de peptona              | (DP)   |



## REACTIVOS

- Acido Tricloroacético 7%
- Solución saturada de carbonato de potasio 90%  
( $K_2CO_3$ ) (Agente sellador).
- Solución saturada de ortofosfato de sodio potasa  
( $Na_3PO_4KOH$ ) (Agente liberador)
- Acido bórico al 3.1%
- Acido sulfúrico 0.024N ( $H_2SO_4$ )
- Indicador de Conway

## PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

## AGAR BILIS ROJO VIOLETA ( AVRVI)

## Fórmula:

Extracto de levadura .....	3.0	g
Peptona o gelisato .....	7.0	g
Cloruro de Sodio .....	5.0	g
Sales biliares.....	1.5	g
Lactosa .....	10.0	g
Rojo neturo.....	0.03	g
Cristal violeta .....	0.002	g
Agar.....	15.0	g
Agua destilada .....	1,000.0	ml

Disolver los ingredientes en el agua mediante ebullición y agitación continua. Dejar hervir durante 2 minutos. Enfriar a unos 50°C.

## AGAR CUENTA ESTANDAR (ACE)

## Fórmula:

Triptona o tripticasa.....	5.0	g
Extracto de levadura .....	2.5	g
Glucosa .....	1.0	g
Agar .....	15.0	g
Agua destilada .....	1,000.0	ml

Pesar los ingredientes sólidos y adicionar el agua -- destilada hervir agitando constantemente hasta disolución total. Enfriar a unos 50°C. Distribuir en tubos o frascos; según se requiera y autoclavar a 121°C durante 15 minutos

## AGAR HIERRO TRIPLE AZUCAR (TSI)

## Fórmula:

Polipeptona.....	20.0	g
Lactosa.....	10.0	g
Sacarosa.....	10.0	g
Glucosa.....	1.0	g
Cloruro de sodio	5.0	g
Sulfato férrico amoniacal 6 H <sub>2</sub> O.....	0.2	g
Tiosulfato de sodio.....	0.2	g
Rojo de fenol.....	0.025	g
Agar.....	13.0	g
Agua destilada.....	1,000.0	ml.

Disolver los ingredientes en el agua mediante ebullición y agitación continua. Dejar enfriar a unos 50°C. ajustar el pH a 7.4 + 0.1. Distribuir en tubos de 13X100 mm. y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Inclinar los tubos procurando un fondo de 2 cm. para la picadura.

## AGAR HIERRO LISINA (LIA).

## Fórmula:

Peptona.....	5.0	g
Extracto de levadura.....	3.0	g
Glucosa.....	1.0	g
L-lisina.....	10.0	g
Citrato férrico amoniacal.....	0.5	g
Tiosulfato de sodio.....	0.04	g

Púrpura de bromocresol .....	0.02	g
Agar .....	15.0	g
Agua destilada .....	1,000.0	mℓ

Disolver los ingredientes en el agua mediante ebullición y agitación continua. Dejar enfriar a unos 50°C Ajustar el pH a  $6.7 \pm 0.2$ . Distribuir en tubos de 13 X 100 mm. y esterilizar a 121° durante 15 minutos. Inclinar los tubos de manera que el fondo sea pronunciado (2 cm.) para la picadura.

#### AGAR SULFITO BISMUTO (SB)

Fórmula:

Peptona .....	10.0	g
Extracto de carne .....	5.0	g
Dextrosa .....	5.0	g
Fosfato disódico.....	4.0	g
Sulfato ferroso.....	0.3	g
Citrato de amonio y bismuto ..	1.85	g
Sulfito de sodio .....	6.15	g
Agar .....	20.0	g
Verde brillante .....	0.025	g
Agua destilada .....	1,000.0	mℓ

Disolver los ingredientes en el agua por ebullición y agitación continua durante 1 minuto. Dejar enfriar a unos 50°C Vaciar en las cajas. No usar después de 48 hrs. de su preparación.

#### AGAR VERDE BRILLANTE SULFADIAZINA (VBS)

Fórmula:

Extracto de levadura .....	3.0	g
Proteosa peptona núm.3 o polipep-		

tona .....	10.0	g
Cloruro de sodio.....	5.0	g
Lactosa.....	10.0	g
Sacarosa.....	10.0	g
Rojo de fenol.....	0.08	g
Verde Brillante 0.25% .....	5.0	g
Agua Destilada.....	1,000.0	ml

Disolver los ingredientes en el agua por ebullición y agitación continua. Enfriar a unos 50°C. Adicionar una solución al 0.8% de sulfadiazina por litro de medio. Esterilizar a 121°C. durante 12 minutos. Vaciar en cajas - de Petri estériles.

#### CALDO SELENITO CISTINA (CSC)

##### Fórmula:

Triptona.....	5.0	g
Lactosa.....	4.0	g
Fosfato disódico.....	10.0	g
Selenito de sodio.....	4.0	g
Cistina.....	0.01	g
Agua destilada.....	1,000.0	ml

Disolver los ingredientes por ebullición y agitación constante. Utilizando el mismo día de su preparación.

#### CALDO SOYA TRIPTICASA (CST)

##### Fórmula:

Triptosa.....	10.4	g
Tripticasa o triptona.....	8.5	g

Extracto de levadura.....	3.0	g
Cloruro de sodio.....	5.0	g
Fitona o soytona.....	1.5	g
Glucosa.....	1.8	g
Fosfato dipotásico.....	1.25	g
Agua destilada.....	1,000.0	ml

Disolver los ingredientes en el agua. Distribuir en tubos. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

#### CALDO TETRACIONATO VERDE BRILLANTE (CTT)

Fórmula:

Polipetprona, proteosa peptona..	5.0	g
Sales viliares.....	1.0	g
Carbonato de calcio .....	10.0	g
Tiosulfato de sodio.....	30.0	g
Agua destilada.....	1,000.0	ml

Agregar los ingredientes al agua y calentar a ebullición con agitación continua. Añadir 10 ml. de solución al 1:1000 de verde brillante. Agitar y distribuir en frascos y tubos. Esterilizar a 80°C durante 10 minutos. Antes de inocular la muestra, adicionar 2 ml. de solución de yodo - por cada 100 ml. del medio base.

#### DILUYENTE DE PEPTONA (DP)

Fórmula:

Peptona.....	1.0	g
Agua destilada.....	1,000.0	ml

Disolver la peptona en el agua, ajustar el pH a 7.2. Distribuir en tubos y frascos autoclavear a 121°C durante 20 minutos.

### REACTIVOS.

#### ACIDO TRICLOROACETICO 7%

Acido Tricloroacético.....	7.0	g
Agua destilada.....	100.0	ml

#### SOLUCION SATURADA DE CARBONATO DE POTASIO 90% (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) AGENTE SELLADOR).

Carbonato de potasio.....	90.0	g
Agua destilada.....	100.0	ml

#### SOLUCION SATURADA DE ORTOFOSFATO DE SODIO POTASA (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>KOH) (AGENTE LIBERADOR)

Hidróxido de potasio en escamas.....	10.0	g
Fosfato trisódico.....	44.0	g

Disolver el hidróxido de potasio en agua, enseguida - agregar el fosfato trisódico y agitar.

#### ACIDO BORICO 3.1%

Acido bórico.....	3.1	g
Agua destilada.....	100.0	ml

#### INDICADOR DE CONWAY

Verde de bromocresol.....	0.33	g
Rojo de metilo.....	0.066	g
Alcohol etílico al 97% .....	100.0	ml

## AGENTE ATRAPANTE

Indicador de Conway.....	1.0	ml
Acido bórico 3.1%.....	50.0	ml

*Disolver el indicador en el ácido bórico.*



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

- I.- Realizar un estudio preliminar para demostrar el -- grado de homogeneidad de una muestra de ceviche de pescado mediante el recuento de organismos mesoflli--cos aerobios aplicando un análisis estadístico.
  - II.- A partir de la materia prima (pescado crudo molido) relativamente fresco proceder a la preparación del ceviche para el estudio del destino del patógeno. - Simultaneamente estudiar el patrón de descomposi--ción en la materia prima (PCM) y producto terminado (ceviche).
  - III.- Inocular al pescado crudo molido un cultivo de Salmonella typhimurium y Salmonella derby de manera - independiente previo a la preparación del ceviche, para obtener una concentración final de 200 y 500 - salmonelas por gramo respectivamente, incluyendo -- un control sin Salmonella.
  - IV.- Almacenar las muestras de ceviche inoculadas y sus respectivos controles, retirando alícuotas para ser analizadas a lo largo de su almacenamiento a las 0, 3, 6 y 24 hrs. a 20° y 0, 24, 48 y 72 hrs. a 10°.
- Efectuar las siguientes determinaciones:
- A).- Recuento de Salmonella por la técnica del número más probable.
  - B).- Medición del pH.
  - C).- Nitrógeno volátil total.

- D).- Recuento de bacterias mesofílicas aerobias.
- E).- Recuento de organismos coliformes
- F).- Exámen sensorial (olor y aspecto).

## PRUEBAS DE LABORATORIO

DETERMINACION	TECNICA	MEDIO DE CULTIVO	TIEMPO DE INCUBACION	TEMPERATURA DE INCUBACION
B.M.A.	V.P.	A.C.E.	48 Hrs.	35°C.
O.C.	V.P.	A.B.R.V.	24 Hrs.	35°C.
<u>SALMONELLA</u>	ENRIQUE-	C.S.C.	24 Hrs.	43°+0.5°C.
	CIMIENTO	C.T.T.	24 Hrs.	43°+0.5°C.
pH	POTENCIOMETRICO			
NVT	METODO DE MICRODIFUSION DE CONWAY.			

- B.M.A. .- Bacterias mesofílicas aerobias  
 O.C. .- Organismos coliformes.  
 V.P., .- Técnica de vaciado en placa  
 A.C.E. .- Agar cuenta estándar  
 A.B.R.V..- Agar bilis rojo violeta  
 C.S.C. .- Caldo selenito cistina  
 C.T.T. .- Caldo tetracionato verde brillante  
 N.V.T. .- Nitrógeno volátil total

## P R O C E D I M I E N T O

- I (a). - Se adquirieron del comercio 200 gramos de ceviche de pescado.
- (b). - Fueron transportados al laboratorio en bolsa de polietileno para su análisis inmediato.
- (c). - La muestra se depositó en un recipiente de vidrio estéril con capacidad de 500 ml.
- (d). - El producto se homogeneizó mediante un procedimiento estandarizado ( 25 movimientos hacia la derecha y 25 movimientos hacia la izquierda) con varilla de vidrio estéril.
- (e). - Se extrajeron 5 alícuotas al azar de diferentes puntos de la muestra para el recuento de bacterias mesofílicas aerobias, aplicando la técnica de vaciado en placa, con agar cuenta estándar, incubando 48 hrs a 35°

II.- Para llevar a cabo el estudio del destino del patógeno se adquirió pescado molido relativamente fresco como materia prima a utilizar en el modelo experimental. En dicha materia prima se probaron 4 diferentes concentraciones de jugo de limón (0.5, 1.4, 3.0, 5.0 ml) con medición del pH, para seleccionar la cantidad adecuada en la preparación del ceviche.

PCM/g.	ML. DE JUGO DE LIMON	pH	CRITERIOS DE EVALUACION VISUAL.
	0.5	5.87	Inaceptable
	1.4	5.02	Óptimo
10	3.0	4.43	Subóptimo
	5.0	4.0	Subóptimo

PCM/g. = Gramos de pescado crudo molido.

Proceder a la preparación del ceviche en condiciones asépticas:

- a).- Para cada 200 g. de pescado crudo utilizar 90g. de jitomate, 70 g. de cebolla, 5 g. de sal y 28 ml. de jugo de limón.
- b).- Agregar el jitomate y la cebolla picados, el jugo del limón y la sal.
- c).- Homogeneizar con el procedimiento estandarizado (descrito en I).

El patrón de descomposición se estudió en el pescado crudo molido (PCM) y ceviche, retirando al cuotas para ser analizadas a lo largo de su almacenamiento a las 0, 3, 6 y 24 hrs. a 20° y 0, 24, 48, y 72 hrs. a 10°.

La metodología utilizada para este estudio se ilustra en los esquemas I y II.

- III.- Inocular una dilución de un cultivo de S. typhimurium ( 24 hrs. en caldo soya tripticasa) en 2 porciones - de pescado crudo molido de manera independiente. -- Proceder de la misma forma con un cultivo de S. derby. Efectuar diluciones decimales para obtener una concentración final de 200 y 500 salmonelas respectivamente. Homogeneizar con el procedimiento estandarizado y proceder a su análisis.
- IV.- La muestra inoculada y sus respectivos controles, - se distribuyeron en porciones equivalentes y fueron almacenadas simultáneamente a 20° y 10°.

A partir de las muestras almacenadas a 20° fueron retiradas las alícuotas a las 0, 3, 6, y 24 hrs. de almacenamiento, y para las muestras almacenadas a 10° a las 0, 24, 48 y 72 hrs. (Esquema III).

A).- RECUENTO DE SALMONELLA POR LA TECNICA DEL NUMERO - MAS PROBABLE. (NMP).

- a.- Colocar alícuotas de 10g. en 90 ml. de caldo selenito cistina (CSC) y 10 g. en 90 ml. de caldo tetratioato verde brillante (CTT).
- b.- Efectuar diluciones
- c.- Inocular 1 ml. de cada dilución decimal en cada uno de 3 tubos  $3(10^{-1})$ ,  $3(10^{-2})$ ,  $3(10^{-3})$ , -----  $3(10^{-4})$ , conteniendo una serie caldo selenito y otra caldo tetratioato.
- d.- Incubar en baño maría a  $45^{\circ} \pm 0.5^{\circ}$  por 24 hrs.
- e.- A partir de cada dilución, inocular una placa de agar sulfito bismuto y una de agar verde brillante sulfato, e incubar a 35° durante 24 hrs. el verde brillante y 24-48 hrs. el sulfito bismuto.
- f.- Seleccionar colonia típicas o sospechosas de -- Salmonella de cada placa y proceder a su confirmación mediante pruebas bioquímicas en el medio TSI y LIA, incubando a 35° durante 24 hrs. - (Esquema IV)
- g.- La cuantificación de Salmonella se llevó a cabo considerando los tubos confirmados positivos efectuando la lectura en la tabla diseñada para número más probable. (Tabla I).

## B). - MEDICION DEL pH.

A partir de 10 g. de muestra realizar una dilución-peso a volumen con 10 ml. de agua destilada recién hervida. Homogeneizar y medir el pH potenciométrica mente.

## C). - PRUEBA DE NITROGENO VOLATIL TOTAL (NVT).

Método de microdifusión de Conway.

- a). - En un mortero macerar 10g. de la muestra en 20-ml. de ácido tricloroacético.
- b). - Filtrar en algodón y papel filtro ordinario.
- c). - Colocar el extracto líquido en tubos de ensaye y centrifugar durante 15 minutos a 2,500 revoluciones por minuto.
- d). - Colocar 2.5 ml. de la solución saturada de -- ( $K_2CO_3$ ) (agente sellador) en el compartimiento periférico de la caja de Conway.
- e). - Depositar 1 ml. de la solución saturada de fosfato de sodio potasa ( $Na_3PO_4KOH$ ) (agente liberador) en uno de los extremos del compartimiento intermedio de la caja y 1 ml. de la muestra en el otro extremo del mismo compartimiento.
- f). - Colocar 1 ml. de una solución compuesta de ácido bórico e indicador de Conway (agente atrapador en el compartimiento central.
- g). - Colocar la tapa de la caja Conway y girarla -- cuidadosamente para sellar.
- h). - Girar cuidadosamente la caja ya tapada y sella da hasta mezclar la muestra con el agente liberador.

- i).- Dejar reposar 2 hrs. y titular el agente "atrapante" hasta su color original con ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 0.024 N (usar control) Fig. 1

De acuerdo a los mililitros gastados de ácido sulfúrico, nos damos cuenta de la cantidad de nitrógeno - volátil total (NVT) contenido en la muestra analizada por medio de la siguiente fórmula:

$$NVT(mgN/100g. de la muestra) = ml.H_2SO_4 \times 0.024 \times 14.01 \times 100 \times 2.7 \times 1.3.$$

D).- RECUENTO DE BACTERIAS MEDOFILICAS AEROBIAS.

- a).- Medio utilizado: Agar Cuenta Estándar.
- b).- Preparar diluciones adecuadas de la muestra.
- c).- Inocular con 1 ml. las cajas de Petri de cada dilución.
- d).- Incorporar 12 a 15 ml. del medio de cultivo estéril fundido y conservado en baño maría a  $45^\circ \pm 1^\circ$ .
- e).- Dejar solidificar.
- f).- Incubar a  $35^\circ$  durante 48 hrs.  
Incluir en el recuento todas las colonias de sarrolladas en la placa seleccionada.

E).- RECUENTO DE ORGANISMOS COLIFORMES.

- a).- Medio utilizado: Agar Bilis Rojo Violeta.
- b).- Preparar diluciones adecuadas de la muestra.
- c).- Inocular con 1 ml. las cajas de Petri de cada dilución.
- d).- Adicionar 12-15 ml. de medio de cultivo fundido.



- e).- Dejar solidificar.
- f).- Vaciar 4 ml. aproximadamente del mismo medio - como sobrecapa y dejar solidificar.
- g).- Incubar a 35°  
Contar las colonias de color rojo oscuro, que generalmente semejan lentes biconvexas, con un diámetro de 0.5 mm.

F).- EXAMEN SENSORIAL (OLOR Y ASPECTO)

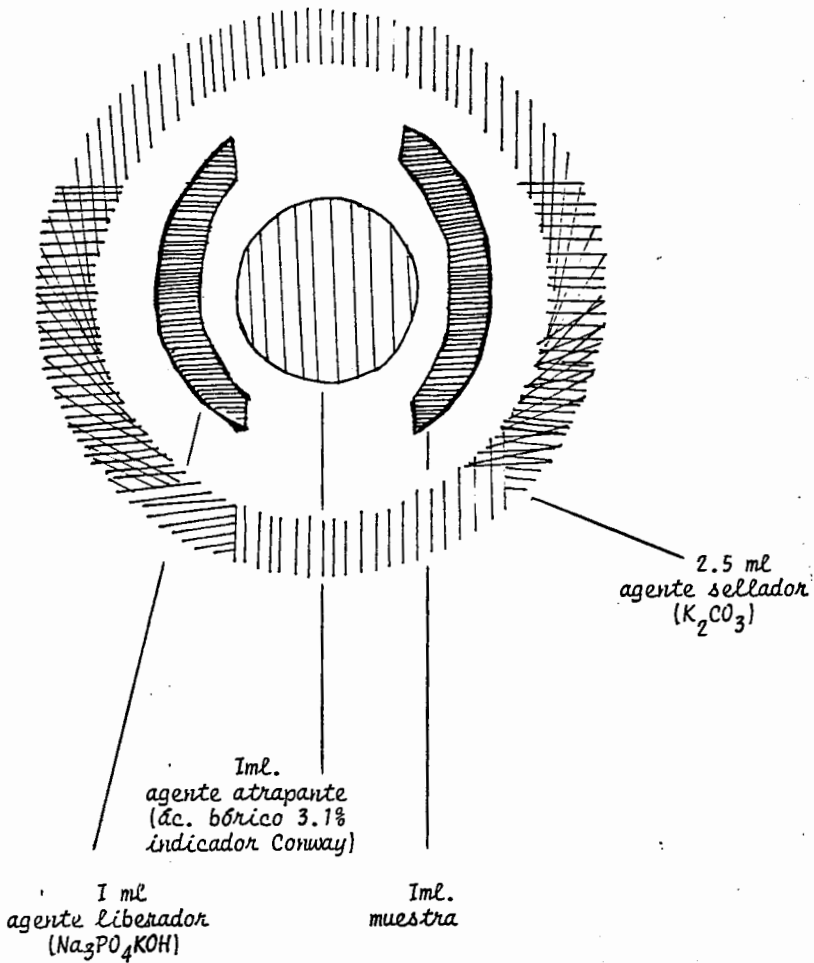
El exámen sensorial fue efectuado por 4 personas. Dicho exámen se aplicó a 10 g. de muestra contenida en un frasco estéril protegido con tapa no hermética y mantenido a temperatura ambiente. Mediante una aspiración profunda seguida de aspiraciones cortas con interrupciones de 5 minutos entre persona y persona, se procedió a la valoración mediante la siguiente escala hedónica:

- ++++ Fresco
- +++ Aceptable
- ++ Marginalmente aceptable
- + Nauseabundo.

Fue consignada para cada muestra la media aritmética (X) de la apreciación de los cuatro catadores.

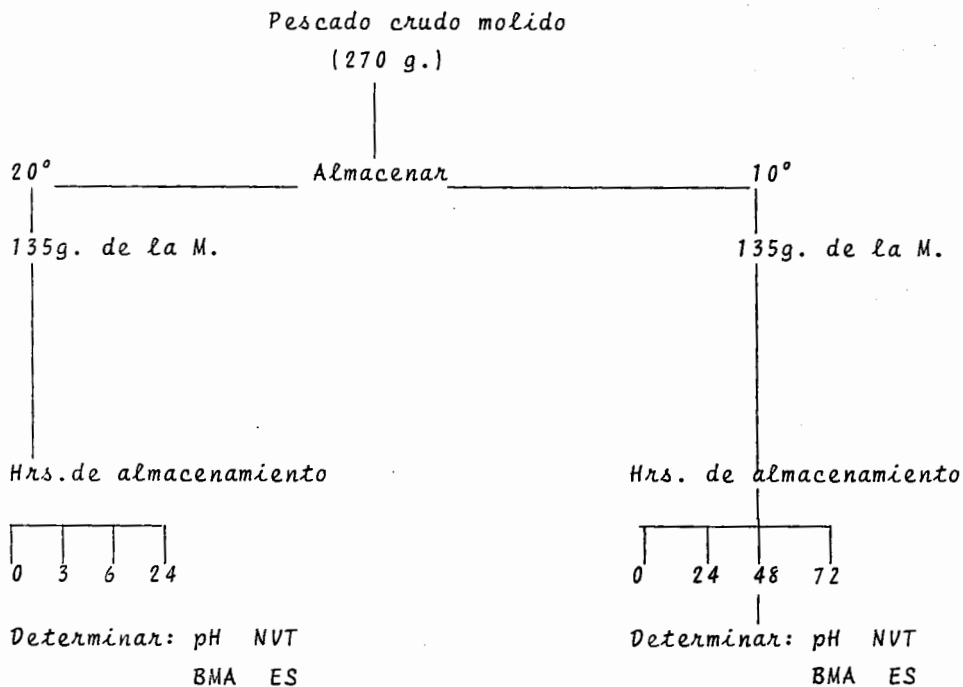
FIG. I

## CAJA DE CONWAY



## ESQUEMA I

## PATRON DE DESCOMPOSICION EN PESCADO CRUDO MOLIDO.



BMA. = Bacterias mesofílicas aerobias

ES. = Exámen sensorial

M. = Muestra de pescado crudo

NVT. = Nitrógeno volátil Total.

## ESQUEMA II

## PATRON DE DESCOMPOSICION EN CEVICHE DE PESCADO.

PESCADO CRUDO MOLIDO  
( 270g.)

## PREPARACION DEL CEVICHE

20° \_\_\_\_\_ Almacenar \_\_\_\_\_ 10°

135g. de la M.

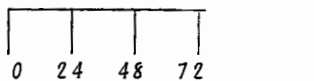
Hrs. de almacenamiento



Determinar : pH NVT  
BMA ES

135g. de la

Hrs. de almacenamiento



Determinar : pH NVT  
BMA ES

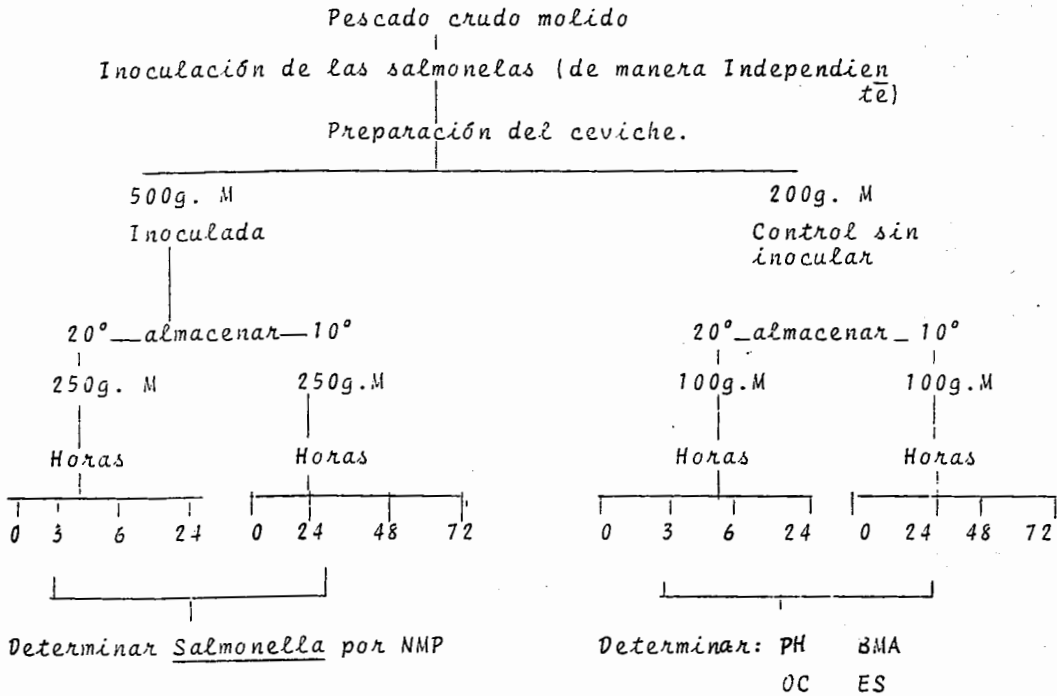
BMA. = Bacterias mesofilicas aerobias

ES. = Exámen sensorial

M. = Muestra de ceviche

NVT. = Nitrógeno volátil total.

## ESQUEMA III

DESTINO DE SALMONELLA (S. typhimurium y S. derby) En:  
CEVICHE DE PESCADO

BMA. = Bacterias mesofílicas aerobias

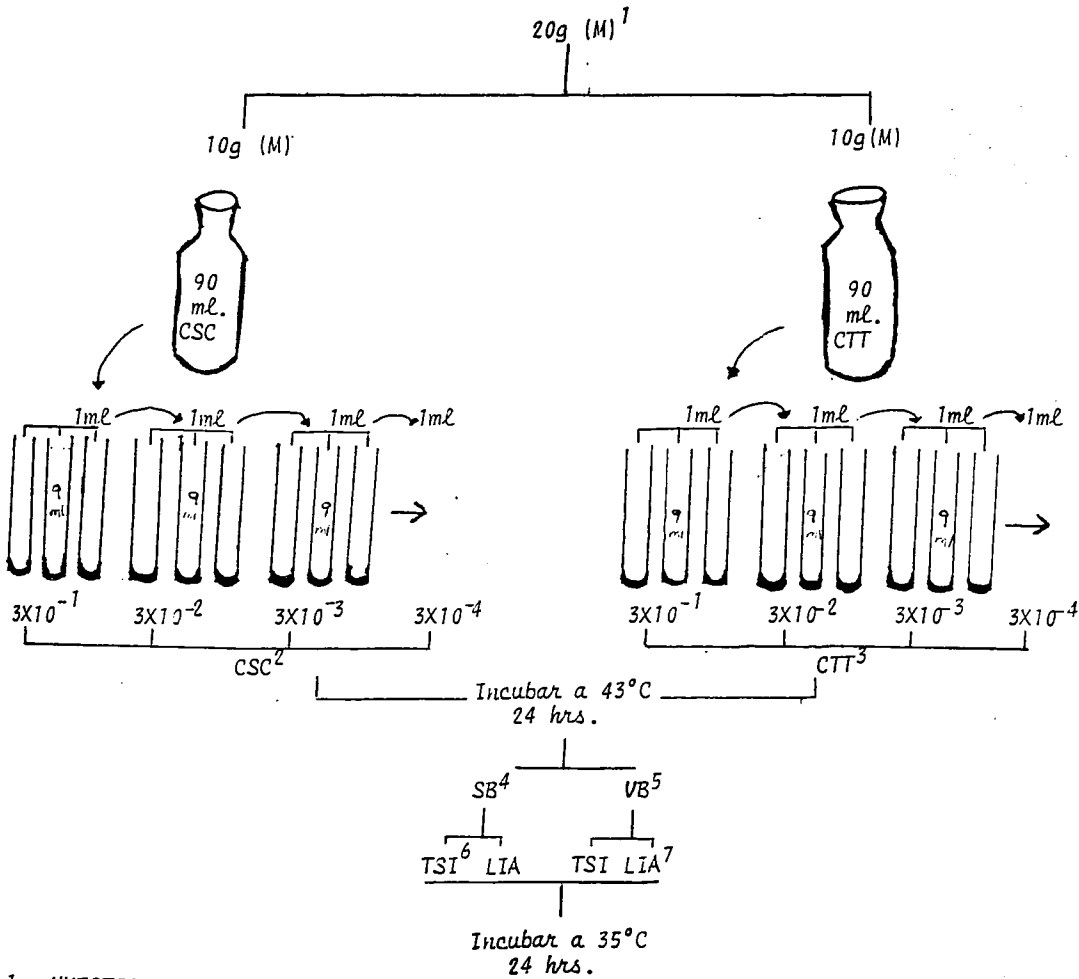
ES. = Exámen sensorial

M. = Muestra de ceviche

NMP. = Número más probable

OC. = Organismos coliformes.

ESQUEMA IV



- 1.- MUESTRA DE CEVICHE
- 2.- CALDO SELENITO CISTINA
- 3.- CALDO TETRATIANATO
- 4.- AGAR SULFITO BISMUTO
- 5.- AGAR VERDE BRILLANTE
- 6.- AGAR TRIPLE AZUCAR
- 7.- AGAR HIERRO LISINA

TABLA I

Número más probable de microorganismos y límites de confianza para diferentes combinaciones de tubos positivos - cuando se inoculan tres tubos con 1ml. de la dilución 1:10, tres tubos con 1ml. de la dilución 1:100 y tres con 1ml. de la dilución 1:1000 de la muestra.

Combinación de tubos positivos	NMP/g o ml. de muestra	Límites de confianza al 99 %		Límites de confianza al 95 %	
		inf.	sup.	inf.	sup.
0 1 0*	3.0	<1.0	23.0	<1.0	17.0
1 0 0	4.0	<1.0	28.0	1.0	21.0
1 0 1*	7.0	1.0	35.0	2.0	27.0
1 1 0	7.0	1.0	36.0	2.0	28.0
1 2 0*	11.0	2.0	44.0	4.0	35.0
2 0 0	9.0	1.0	50.0	2.0	38.0
2 0 1*	14.0	3.0	62.0	5.0	48.0
2 1 0	15.0	3.0	65.0	5.0	50.0
2 1 1*	20.0	5.0	77.0	8.0	61.0
2 2 0	21.0	5.0	80.0	8.0	63.0
3 0 0	23.0	4.0	177.0	7.0	129.0
3 0 1	40.0	10.0	230.0	10.0	180.0
3 1 0	40.0	10.0	290.0	20.0	210.0
3 1 1	70.0	20.0	370.0	20.0	280.0
3 2 0	90.0	20.0	520.0	30.0	390.0
3 2 1	150.0	30.0	660.0	50.0	510.0
3 2 2*	210.0	50.0	820.0	80.0	640.0
3 3 0	200.0	100.0	1,900.0	100.0	1,400.0
3 3 1	500.0	100.0	3,200.0	200.0	2,400.0
3 3 2	1,100.0	200.0	6,400.0	300.0	4,800.0

\* Combinaciones poco probables que se obtienen sólo en el 4% de los casos. No debe utilizarse para decisiones importantes. Las combinaciones de tubos positivos que no aparecen en la tabla deben considerarse inaceptables [12].

## RESULTADOS Y DISCUSION

En la vigilancia y el control de las enfermedades infecciosas que aquejan a una comunidad son de gran ayuda el estudio y conocimiento de las características generales de los microorganismos y sus ciclos de vida (1). Entre ellos de gran importancia para nosotros es la Salmonella, organismo patógeno de alta incidencia en los alimentos. El aislamiento, identificación y con frecuencia su recuento, a partir de diversos sustratos es una necesidad cotidiana y de un significado decisivo en el diagnóstico, la preservación y el control de la salmonelosis

Con diversos propósitos se requiere en ocasiones no sólo determinar la presencia de Salmonella en un producto, sino estimar su número por su gran potencial de sobrevivir en el medio ambiente y desarrollarse en los alimentos.

El destino de la flora bacteriana en un producto lo determinan multitud de factores y lo que resulta perjudicial para un grupo o género puede resultar benéfico para otros (12). Cuando se efectúan estudios sobre la actividad bacteriana en un alimento como el ceviche de pescado se plantean dos problemas de carácter técnico estrechamente relacionados: la precisión de la técnica empleada y la distribución real de los microorganismos en toda la masa del alimento. Es evidente que el problema de reproducibilidad se ve seriamente afectado por la naturaleza del alimento, entre otros factores. Existen alimentos como la leche en los que se favorece la reproducibilidad de los recuentos porque son relativamente fácil de homogeneizar y distribuir uniformemente los microorganismos-



que contienen antes de retirar cada alícuota para su estudio. En el caso del ceviche las pequeñas porciones de carne le confieren una relativa heterogeneidad a la muestra que va a ser pesada para su análisis, por otra parte las oportunidades de contaminación durante su venta al público y las de multiplicación microbiana en diferentes áreas del recipiente con el alimento serían escasas y uniformes.

Se llevó a cabo el muestreo y análisis de 5 alícuotas tomadas al azar de diferentes puntos de un preparado de ceviche, con el propósito de explorar el grado de homogeneidad conseguido en la distribución del contenido bacteriano (bacterias mesofílicas aerobias) en la muestra cuando ésta se mezcló como se indica en material y métodos. Los resultados que se ilustran en la tabla I -- muestran una mínima diferencia entre el valor mayor y el menor de los 5 obtenidos, lo que contribuye a la cifra de 17.6% que arroja el coeficiente de variación. Los resultados de este estudio sugieren una homogeneidad en la distribución de las bacterias mesofílicas aerobias en la masa del alimento, lo que contribuye a la validez de los resultados posteriores cuantitativos de la Salmonella.

Para llevar a cabo el estudio de ceviche y pescado crudo molido almacenados a 20° y 10°, se consideró para el primer caso un tiempo de comercialización no mayor de 24 hrs. y para el segundo hasta las 72 hrs.

Para estimar el grado de frescura de pescado han sido evaluados algunos métodos objetivos (22,30) Dichos métodos se apoyan en pruebas químicas y microbiológicas: - entre las primeras se menciona la determinación de nitró

geno volátil total (NVT) y el pH y entre las segundas el recuento de bacterias mesofílicas aerobias.

Al hacer uso de estos parámetros en el ceviche y -- pescado crudo molido almacenados a 20° observamos un incremento en el recuento de bacterias mesofílicas aerobias de 2 a 3 logaritmos hacia las 24 hrs. (Tabla 2, gráfica 2). Durante 6 hrs. en el ceviche la carga microbiana se mantiene estable, mientras que en el pescado crudo se incrementó en un logaritmo. Al parecer el pH (4.7 en ceviche y 6.9 para pescado crudo) es un factor que juega un papel importante en la imagen microbiana de dichos -- productos. En la literatura se menciona que la mayoría de las bacterias desarrollan en límites de pH muy próximos a la neutralidad. Muchos microorganismos pueden crecer dentro de un amplio rango de pH. Los límites para el crecimiento difieren ampliamente entre los microorganismos, dentro de un rango comprendido entre 1 y 11 (29).

En la misma tabla 2 se ilustran los valores de nitrógeno volátil total (NVT) en muestras de ceviche y pescado crudo, los cuales se incrementan discretamente hacia las 6 hrs. A las 24 hrs. la cifra aumenta en 2 veces su valor en el ceviche y 6 en el pescado crudo. En ambos casos a las 24 hrs. el alimento ya manifiesta signos de descomposición.

Lannelongue, Finne, Hanna, Nickelson y Vanderzant-- (22) reportaron los siguientes valores de NVT/100g. de tejido de pescado con diferentes grados de frescura; -- < 12 mg. en pescado fresco recién capturado, de 12 a 20 mg. ligeramente descompuesto y de buena calidad; de 20 a 25 mg. aún comestible: más de 25 mg. descompuesto no comestible.

En la literatura (22,23) se reportan numerosos métodos para estimar el grado de frescura de pescado. Tarr (31) ha revisado muchos de los métodos y cambios bioquímicos que se presentan en el pescado durante la descomposición. Puesto que los componentes del pescado varían con la especie y área geográfica (30), la aplicación de los métodos químicos no puede ser generalizada.

Cuando el ceviche y el pescado crudo se analizaron a lo largo de su almacenamiento a 10° (Tabla 3) observamos que la baja temperatura prolonga la frescura del alimento. En el ceviche la carga microbiana se modificó en un logaritmo hasta las 72 hrs. En cambio en el pescado crudo el incremento se manifestó a las 48 hrs. Al término de éstos periodos se observan diferencias importantes en los parámetros de frescura de ceviche y pescado crudo tanto a 20° como a 10°. Los valores de nitrógeno volátil total (NVT) en el ceviche sufrieron ligeros incrementos con respecto al pescado crudo de tal forma que a las 48 hrs. de almacenamiento el ceviche todavía se encontraba aceptable (29.50mg%). En cambio el pescado crudo ya manifestaba signos de alteración (77.89mg%).

Consideramos que la adición de ingredientes tales como el limón y jitomate utilizados en la preparación del ceviche determinan una baja en el pH del producto, lo que influye significativamente en la imagen microbiana y sensorial del alimento tanto a 10° como a 20°. La tabla y gráfica 3 ilustran una reducción de casi un logaritmo de la cuenta de bacterias mesofílicas aerobias en el ceviche ( $1.2 \times 10^5$  -  $2.5 \times 10^4$ ) con respecto al pescado crudo. A las 48 hrs. de almacenamiento el pescado crudo incrementó su carga bacteriana en un logaritmo manifes-

tando signos de alteración. En cambio el ceviche mantiene su imagen microbiana y fresca.

Se han llevado a cabo estudios en una gran variedad de alimentos con el propósito de conocer la influencia del pH en la dinámica de Salmonella (13,15,26). Chung y Goepfert (29) establecieron que el pH mínimo para el crecimiento de distintos serotipos de Salmonella era  $4.05 \pm 0.05$ . No obstante en la literatura se mencionan datos de incidencia y sobrevivencia de salmonela a pH por debajo de 4.0: un aislamiento positivo en ceviche de pescado -- con pH de 3.86 (33), hallazgo insólito de 2 serotipos de Salmonella en un muestra de agua de limón con pH de --- 2.83 (13) y un estudio de sobrevivencia de Salmonella -- por no más de una hora en mayonesa con pH de 3.8 (34).

Aunque el pH de un alimento es considerado como uno de los principales factores que determinan la supervivencia y el crecimiento de los microorganismos durante el procesamiento, almacenamiento y distribución, es importante hacer notar la coparticipación de otros factores que en conjunto decidirán la suerte de un microorganismo (29)

En general cuando una bacteria ingresa a un alimento tiene 3 perspectivas: desarrollar, sobrevivir o morir. Este destino se encuentra influido por una serie de factores como lo son el pH, temperatura, presencia de inhibidores entre otros (12). Esta situación se ha puesto de manifiesto en estudios realizados en una gran variedad de alimentos. Tal es el caso de la Salmonella inoculada artificialmente en fruta partida almacenada a temperatura ambiente donde manifestó una gran capacidad para desarrollarse (25). Partiendo de inóculos que contenían 270 y

1,900 células viables se incrementó de 30 a 40 veces el número de salmonelas al cabo de 6 hrs. Esta capacidad -- del microorganismo para multiplicarse en dicho producto -- se atribuye a los componentes de la fruta que constituyen un sustrato adecuado para su desarrollo. En otro estudio de sobrevivencia de Salmonella en ensalada de pasta con jamón y mayonesa mantenida a temperatura ambiente el patógeno se mantuvo constante (27). En cambio, en quesos frescos no pasteurizados partiendo de inóculos iniciales de 1,900 células/ml. se observó una rápida desaparición del germen en la muestra mantenida a temperatura ambiente, manifestándose una caída en el pH y una intensa actividad de flora láctica, coliformes y levaduras -- que podría influir en la pérdida de viabilidad de la Salmonella (15).

En el ceviche almacenado a 20°, la S. typhimurium -- se mantiene constante al cabo de 6 hrs. (tabla 4); se observa tan solo el incremento de un logaritmo a las 24 -- hrs. Una situación similar se presenta en el ceviche almacenado a 10°.

Al estudiar la dinámica de otro serotipo (S. derby) -- en la muestra almacenada a 20° (tabla 5) se incrementó -- en un logaritmo el número de células a partir de las 3 -- hrs. permaneciendo constante hasta las 6 hrs. ( 500 a -- 5,000 células/g). A las 24 hrs. el número de salmonelas -- descende hasta 110 bacterias por gramo. Por otra parte' en la muestra almacenada a 10° el patógeno se mantuvo es -- table hasta las 48 hrs. reduciéndose a un 17% a las 72 -- hrs.

Aunque los serotipos de salmonella inoculados al ce

viche de pescado en este estudio no se multiplican si no que tienden a sostener su número, este hallazgo por si mismo adquiere relevancia en la actualidad. Anteriormente se asociaba la salmonelosis a ingestas de cientos de miles de células del patógeno (dosis infectante) (12).

El serotipo involucrado es un factor importante. Recientemente se han tenido reportes de brotes en los que la dosis infectante fue sorprendentemente baja. Uno de ellos está asociado al consumo de chocolate que contenía de 20 a 90 células por 100 g. del alimento (10)

Entre la serie de factores que pueden decidir el destino de un patógeno en un sustrato sin duda ocupa un papel importante la carga microbiana y el pH. En las tablas y gráficas 4 y 5 asociado al destino de la Salmonella observamos como en el producto almacenado a 20° la carga de bacterias mesofílicas aerobias y pH se mantienen estables durante 6 hrs. lo mismo que la salmonela. A las 24 hrs. el ceviche contaminado con el serotipo S. typhimurium incrementa su carga microbiana (BMA) en 2 logaritmos y la Salmonella en un logaritmo. El serotipo derby en cambio disminuye en un logaritmo sin registrar variación el recuento de bacterias mesofílicas aerobias. En todos los casos el pH no sufrió variaciones significativas (osciló entre 4.7 y 5.2). En el ceviche almacenado a 10°, ambos serotipos mantuvieron su número durante 48-hrs. sin cambios en la flora microbiana y pH.

Entre las técnicas utilizadas para la investigación de Salmonella se menciona el uso de un preenriquecimiento en algunos productos y en otros el enriquecimiento directo (12) En una evaluación realizada en el cevi-

che el empleo del preenriquecimiento condujo a un sólo - positivo contra 29 por la vía directa, haciendo uso en - ambos casos del caldo selenito cistina (CSC) y caldo tetratioato (CTT) (33). En chorizos y longanizas el CTT y el CSC no exhibieron diferencias significativas en su eficiencia (14). En cambio en otro estudio el empleo de CTT mostró clara ventaja sobre el CSC en 4 variedades de carne cruda tanto a 35° como a 43° (16).

En el presente trabajo evaluamos la productividad - de dos caldos de enriquecimiento en la recuperación de - Salmonella. Los resultados se ilustran en la tabla y gráfica 6. Durante el almacenamiento de la nuestra a 10° y 20° resultó claramente más productivo el CSC con respecto al CTT lo que nos sugiere la conveniencia de simplificar la técnica haciendo uso exclusivo del CSC.

Con el propósito de destacar la importancia del empleo de un u otro medio de cultivo (CSC, CTT) para la investigación de Salmonella se han llevado a cabo evaluaciones en una gran variedad de alimentos (7,14,16,26,33)

Estudios realizados en alimentos tales como requesones, quesos frescos no pasteurizados, ceviche de pescado entre otros (15,26,33) revelan un gran porcentaje de falsos negativos a Salmonella a través del caldo selenito - cistina (CSC). En la práctica es recomendable incluir - los 2 caldos de enriquecimiento para restringir al máximo los falsos negativos. Hobbs como otros aboga también por el uso de ambos caldos para obtener el mayor número de aislamientos a Salmonella en muestras de alimentos (17)

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, re

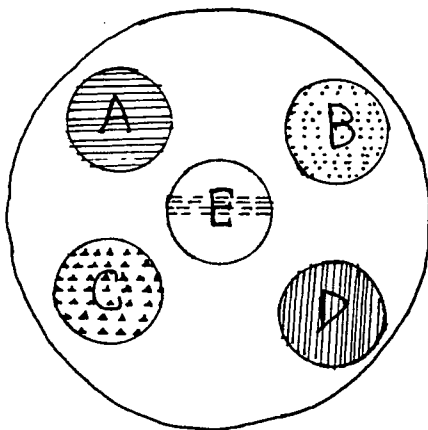
velan la capacidad de las cepas (S. typhimurium y S. derby) para sobrevivir en el ceviche preparado aun cuando - el pH se aproxima al límite que de acuerdo con la literatura sostiene la viabilidad del microorganismo. El abuso de temperatura al parecer favorece la actividad del patógeno durante un periodo de 6 hrs. tiempo que se cubre ampliamente durante su comercialización, pudiendo constituirse en un riesgo a la salud de quienes lo consumen.

El producto en refrigeración tiende a preservar la sobrevivencia del patógeno con el riesgo subsecuente. --- Con estos hallazgos resulta fundamental proteger el alimento de contaminaciones que pudieran conllevar un daño directo a la salud.



TABLA # 1

HOMOGENEIDAD DEL CONTENIDO DE BACTERIAS MESOFILICAS  
AEROBIAS EN 5 PORCIONES DE CEVICHE DE PESCADO



PORCIONES

BMA/g

A	$1.0 \times 10^8$	
B	$1.2 \times 10^8$	
C	$1.9 \times 10^8$	$\bar{X} = 1.8 \times 10^8$
D	$1.9 \times 10^8$	$S = 3.1 \times 10^7$
E	$2.0 \times 10^8$	$CV = 17.6\%$

BMA = Bacterias mesofílicas aerobias

$\bar{X}$  = Media aritmética

S = Desviación estándar

CV = Coeficiente de variación

TABLA # 2

PARAMETROS DE FRESCURA EN CEVICHE Y PESCADO CRUDO  
MOLIDO DURANTE SU ALMACENAMIENTO A 20°.

## CEVICHE

	TIEMPO EN HORAS			
	0	3	6	24
BMA/g	$2.5 \times 10^4$	$2.7 \times 10^4$	$2.8 \times 10^4$	$4.9 \times 10^7$
NVT/mg%	21.24	22.42	24.78	54.29
pH	4.77	4.77	4.77	5.02
Olor	++++	+++	+++	++

## PESCADO CRUDO MOLIDO

	TIEMPO EN HORAS			
	0	3	6	24
BMA/g	$1.2 \times 10^5$	$1.5 \times 10^5$	$1.6 \times 10^6$	$2.1 \times 10^7$
NVT/mg%	30.68	31.86	39.59	179.39
pH	6.89	6.83	6.96	8.24
Olor	++++	+++	++	+

BMA = Bacterias mesofílicas aerobias

NVT = Nitrógeno Volátil Total

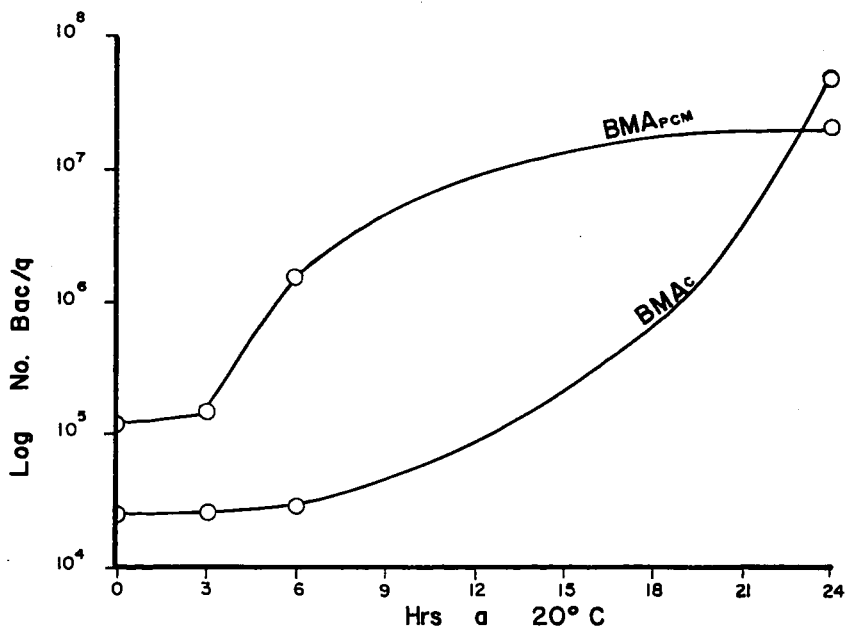
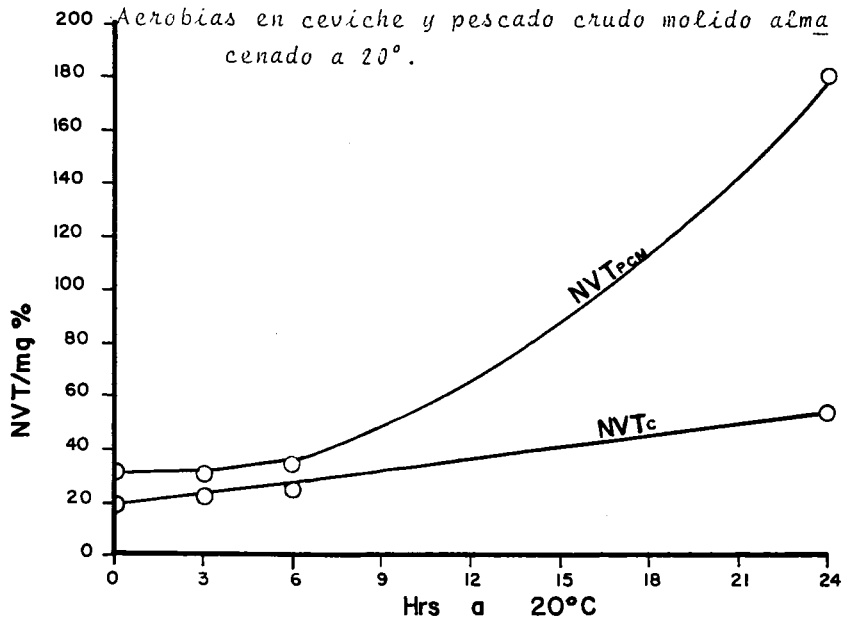
++++ = Fresco

+++ = Aceptable

++ = Marginalmente aceptable

+ = Nauseabundo

Nitrógeno volátil total y bacterias mesofílicas  
Aerobias en ceviche y pescado crudo molido al-  
macenado a 20°.



C CEVICHE  
PCM PESCADO CRUDO MOLIDO

TABLA # 3

PARAMETROS DE FRESCURA EN CEVICHE Y PESCADO CRUDO  
MOLIDO DURANTE SU ALMACENAMIENTO A 10°.

## CEVICHE

	TIEMPO EN HORAS			
	0	24	48	72
BMA/g	$2.5 \times 10^4$	$2.1 \times 10^4$	$2.3 \times 10^4$	$1.1 \times 10^5$
NVT/mg%	21.24	24.78	29.50	40.13
pH	4.77	4.81	4.82	5.18
Olor	++++	+++	++	++

## PESCADO CRUDO MOLIDO

	TIEMPO EN HORAS			
	0	24	48	72
BMA/g	$1.2 \times 10^5$	$3.7 \times 10^5$	$3.2 \times 10^6$	$2.0 \times 10^7$
NVT/mg%	30.68	37.77	77.89	128.64
pH	6.89	7.01	7.75	8.13
Olor	++++	+++	++	+

BMA = Bacterias mesofílicas aerobias

NVT = Nitrógeno Volátil Total

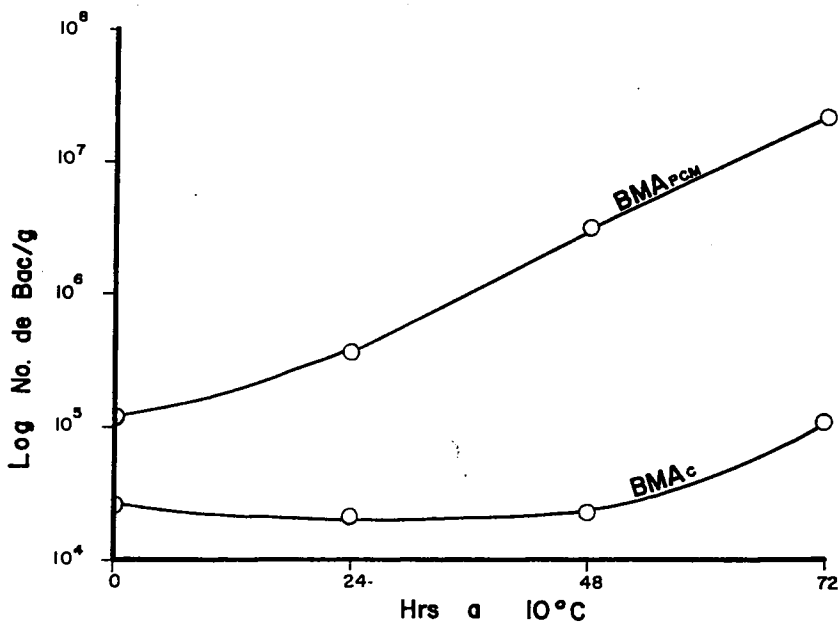
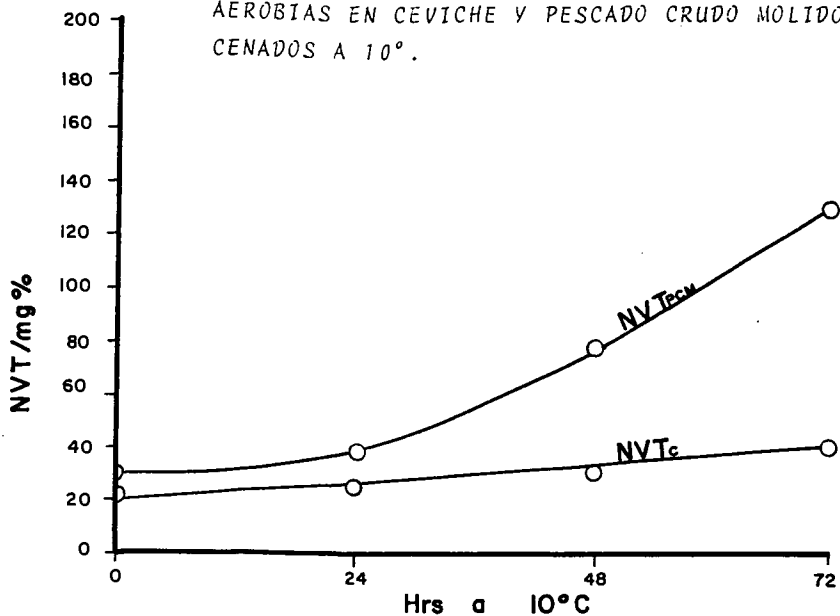
++++ = Fresco

+++ = Aceptable

++ = Marginalmente aceptable

+ = Nauseabundo

NITROGENO VOLATIL TOTAL Y BACTERIAS MESOFILICAS AEROBIAS EN CEVICHE Y PESCADO CRUDO MOLIDO ALMACENADOS A 10°.



C CEVICHE  
PCM PESCADO CRUDO MOLIDO

TABLA # 4

INFLUENCIA DEL PH Y FLORA ASOCIADA EN EL DESTINO DE S. TYPHIMURIUM EN CEVICHE ALMACENADO A 20° y 10°

20°

TIEMPO HORAS	BMA/g	OC/g	PH	NMP	
				SALMONELAS/g	OLOR
0	$7.5 \times 10^5$	500	4.97	150	++++
3	$3.4 \times 10^5$	2 400	5.01	150	+++
6	$3.5 \times 10^5$	4 800	4.85	230	+++
24	$1.7 \times 10^7$	$2.9 \times 10^5$	4.72	2 100	++

10°

TIEMPO HORAS	BMA/g	OC/g	PH	NMP	
				SALMONELAS/g	OLOR
0	$7.5 \times 10^5$	500	4.97	150	++++
24	$4.9 \times 10^5$	680	5.09	900	+++
48	$3.6 \times 10^6$	420	5.19	500	++
72	$1.5 \times 10^6$	330	5.10	900	++

BMA = Bacterias mesofílicas aerobias

NMP = Número más Probable

OC = Organismos coliformes

INFLUENCIA DE LA FLORA ASOCIADA EN EL DESTINO DE S. TYPHIMURIUM EN CEVICHE ALMACENADO A 20° Y 10°

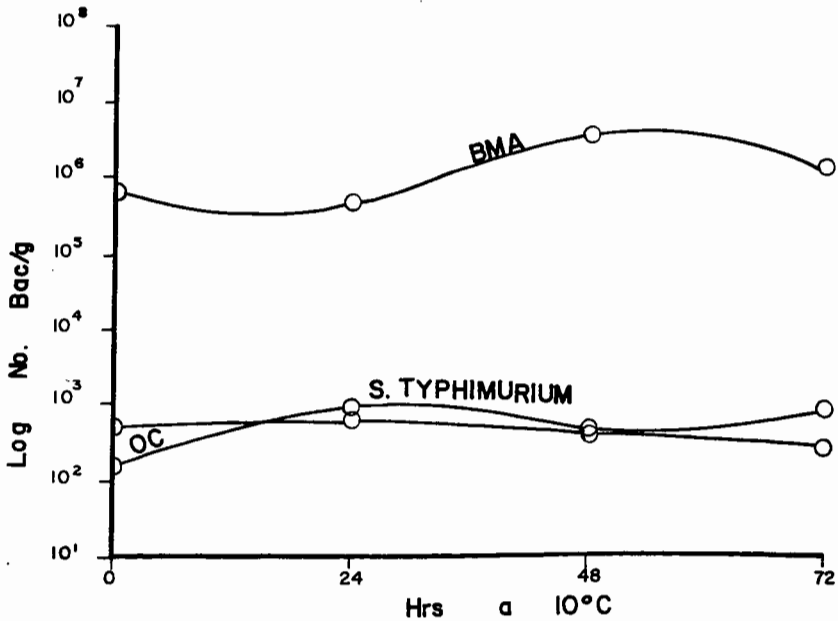
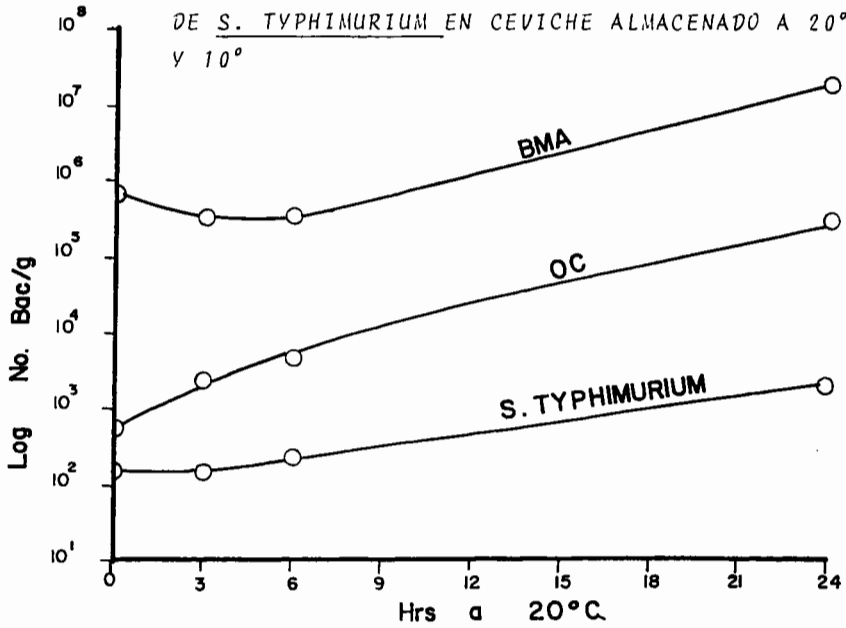


TABLA # 5

INFLUENCIA DEL PH Y FLORA ASOCIADA EN EL DESTINO DE  
S. DERBY EN CEVICHE ALMACENADO A 20° y 10°

20°

TIEMPO HORAS	BMA/g	OC/g	pH	NMP SALMONELAS/g	OLOR
0	$3.9 \times 10^5$	30	5.13	500	++++
3	$3.5 \times 10^5$	60	4.87	5 000	+++
6	$3.7 \times 10^5$	170	4.90	5 000	+++
24	$4.8 \times 10^5$	1 700	4.95	110	++

10°

TIEMPO HORAS	BMA/g	OC/g	pH	NMP SALMONELAS /g	OLOR
0	$3.9 \times 10^5$	30	5.13	500	++++
24	$3.0 \times 10^5$	20	5.07	900	+++
48	$2.7 \times 10^5$	460	4.92	900	++
72	$1.7 \times 10^7$	6 800	5.0	150	++

BMA = Bacterias mesofílicas aerobias

NMP = Número más probable

OC = Organismos coliformes



INFLUENCIA DE LA FLORA ASOCIADA EN EL DESTINO DE S. DERBY EN CEVICHE ALMACENADO A 20° y 10°

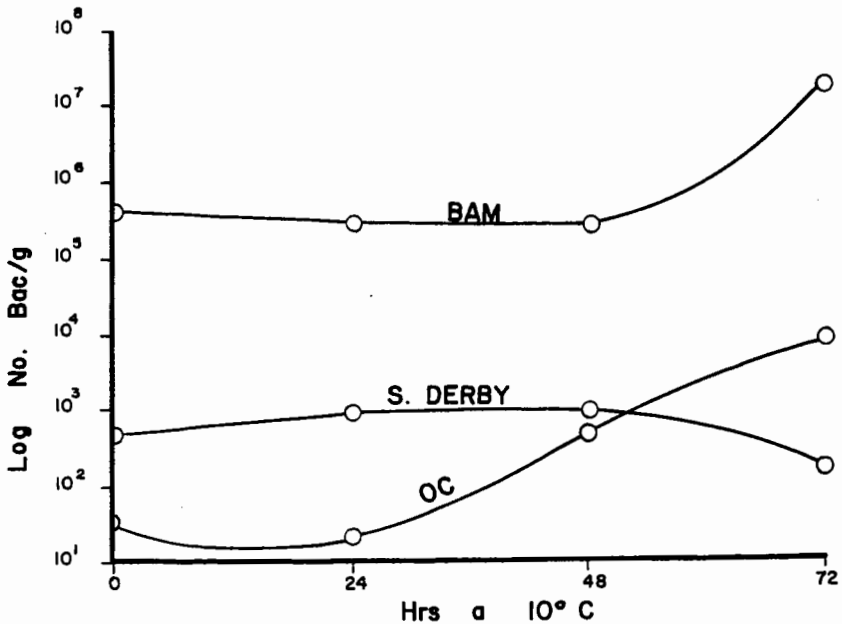
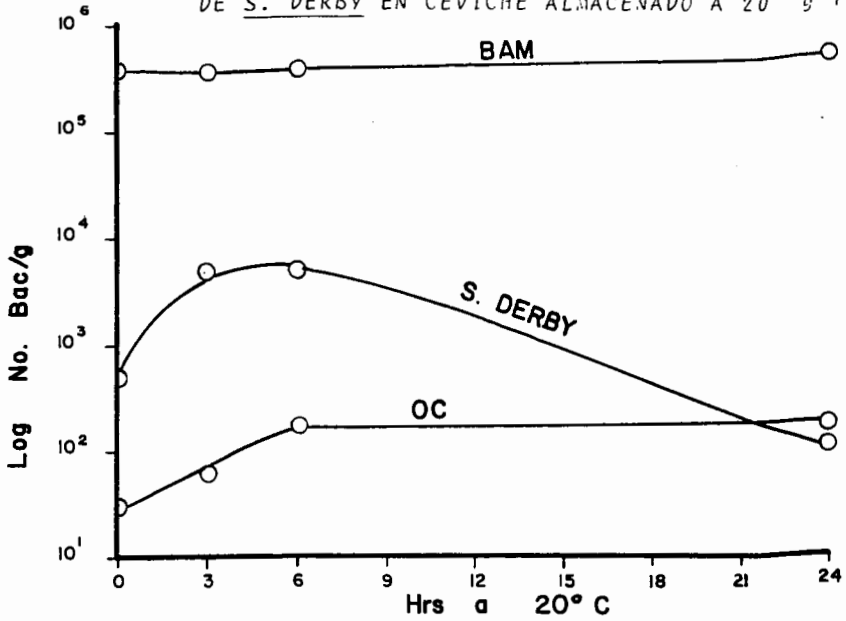


TABLA # 6

PRODUCTIVIDAD DEL CALDO DE ENRIQUECIMIENTO EN LA CUANTIFICACION DE SALMONELLA EN CEVICHE ALMACENADO A 20° Y 10°

20°

TIEMPO HORAS	MEDIO DE CULTIVO	NMP SALMONELAS/g
0	CSC	150
	CTT	70
3	CSC	150
	CTT	210
6	CSC	230
	CTT	90
24	CSC	2 100
	CTT	40

10°

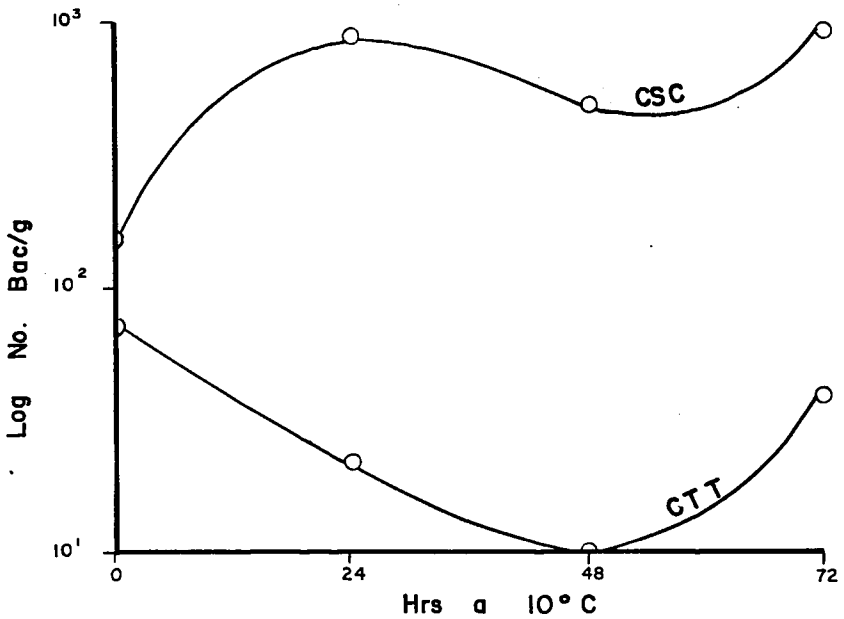
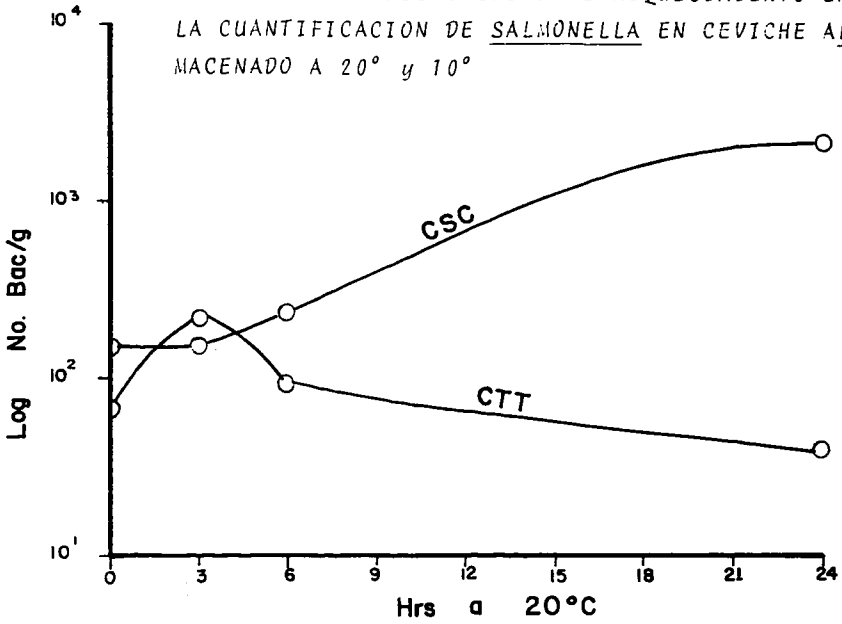
TIEMPO HORAS	MEDIO DE CULTIVO	NMP SALMONELAS/g
0	CSC	150
	CTT	70
24	CSC	900
	CTT	23
48	CSC	500
	CTT	9
72	CSC	900
	CTT	40

CSC = Caldo selenito cistina

CTT = Caldo tetracionato

NMP = Número más probable

PRODUCTIVIDAD DEL CALDO DE ENRIQUECIMIENTO EN LA CUANTIFICACION DE SALMONELLA EN CEVICHE AL MACENADO A 20° y 10°



## C O N C L U S I O N E S

- 1.- La S. typhimurium y la S. derby muestran capacidad para desarrollar en ceviche de pescado (pH 4.72) durante su almacenamiento a 10° y 20°. Niveles de bacterias mesofílicas aerobias de  $3.0 \times 10^5$  hasta  $1.7 \times 10^7$  - células por gramo del alimento no interfieren con su actividad.
- 2.- El caldo selenito cistina (CSC) resultó más productivo (83.9%) con respecto al caldo tetrionato (CTT) en la recuperación de Salmonella en ceviche.
- 3.- Considerando el hecho de que la Salmonella permanece viable en este producto aun en refrigeración, la frecuencia con la que se abusa de la temperatura durante su expendio y las referencias en la literatura científica sobre los brotes de gastroenteritis asociados al consumo de peces y mariscos podemos decir que se trata de un alimento que puede constituir un riesgo a la salud de los consumidores por lo que debiera recibir la adecuada atención por parte de las autoridades sanitarias.

## RESUMEN

Se estudió la sobrevivencia de dos serotipos de Salmonella artificialmente inoculada en ceviche de pescado durante su almacenamiento en refrigeración y en condiciones de abuso de temperatura. En forma paralela se estudió el patrón de descomposición del pescado crudo (materia prima) y ceviche efectuando las siguientes determinaciones: recuento de Salmonella por la técnica del número más probable en caldo selenito cistina (CSC) y caldo tetracionato (CTT), medición del pH, prueba de nitrógeno volátil total (NVT), recuento de organismos mesofílicos aerobios, recuento de organismos coliformes y exámen sensorial (olor y aspecto).

Se realizó un estudio preliminar para comprobar el grado de homogeneidad que presenta una muestra de ceviche mediante el recuento de bacterias mesofílicas aerobias, resultando relativamente homogénea su distribución en el alimento.

La S. typhimurium y la S. derby en inoculos de 200 y 500 salmonelas/g. respectivamente, permanecieron viables en el producto almacenado a 10° y 20° con pH de 4.7 y 5.2.

Ya que la Salmonella permaneció viable en el ceviche de pescado aun en refrigeración y la frecuencia con la que se abusa de la temperatura durante su comercialización podemos decir que se trata de un alimento que puede constituir un riesgo a la salud de quien lo consume. Por lo que debiera recibir especial atención por parte de las autoridades sanitarias.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Anónimo, 1975. Vigilancia de la salmonelosis. *Crónica de la OMS*, 29:253-257.
- 2.- A Scientific Status Summary by the IFT. Expert Panel - on Food Safety and Nutrition. 1989. Bacteria associated with food borne diseases. *Food Technology*. 42:182-184.
- 3.- Bessudo, D., González Cortéz, A., Becerril P., Valle S. y Heridia D., A. 1979 Investigación de portadores de S. typhi en México. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*. 86:55-61.
- 4.- Becerril, P., Bessudo, D. y González Cortéz, A. 1979. Búsqueda de portadores de Salmonella en diferentes grupos de la población de la Ciudad de México. *Rev. - Latemer. Microbiol.* 21:115-119.
- 5.- Becerril, P., González, A. y Bessudo, D. 1978. Investigación Epidemiológica de un brote de gastroenteritis por Salmonella enteritidis ser. Heidelberg, en México 1975 *Salud Pública de México*. 20:15-56.
- 6.- Bryan, F.L. 1980. Epidemiology of foodborne diseases transmitted by fish, shellfish and marine crustaceans in the United States, 1970-1978. *J. Food Protection*. 43:859-876.
- 7.- Castillo Ayala, A. y Fernández Escartín, E. 1976. Influencia de algunos factores en la recuperación de Salmonella a partir de alimentos y otras fuentes. - XVII Congreso Nacional de Microbiología. Asociación Mexicana de Microbiología. Puebla, Pue.
- 8.- Curi de Montbrun S.E. y Ciecarelli, A. F. 1979. Salmonella en algunos tipos de alimentos cárneos. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*. 87:224-229

- 9.- D'Aoust, J.V., Gelinas, R. and Maishmente, C. 1980.- Presence of indicator organisms and recovery of --- Salmonella in fish and Shellfish. J. Food Protec--- tion. 43:679-682
- 10.- D'Aoust, J.H. and Col. 1975. Salmonella eastbourne outbreak associated with chocolate. Can. Inst. Food Sci Technol. J. 8:181-184.
- 11.- De León Fajardo, L.R. and Marth, E.H. 1979 Bacte--- rial flora of fish from tropical sea water J. Food- Protection. 42:724-728.
- 12.- Fernández Escartín, E. 1981. Microbiología Sanita--- ria Agua y Alimentos. Vol I:690-700. Edit.UDG Guada lajara, Jal.
- 13.- Fernández Escartín, E. y Castillo Ayala, A. 1983. Evidencias bacterianas de contaminación fecal de agua y licuados con leche. XIV Congreso Nacional de Microbiología. Chihuahua, Chih.
- 14.- Fernández Escartín, E. y Castillo Ayala, A. 1980 -- Eficiencia del preenriquecimiento en la recupera--- ción de Salmonella a partir de chorizos y longani--- zas. XI Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología - de alimentos. México, D.F.
- 15.- Fernández Escartín, E., Castillo Ayala, A. y Torres Vitela, R. 1983. Destino de Staphylococcus aureus - nativo de Salmonella artificialmente inoculada en - la leche durante la elaboración y almacenamiento de quesos frescos no pasteurizados. II Influencia del- pH, de la flora asociada y el nivel original de con- taminación del patógeno. Rev. Lat-amer. Microbiol. 25:79-86.
- 16.- Fernández Escartín, E., Saldaña Lozano, J. y Mireles Hernández, C. 1983. Incidencia de Salmonella en car- nes crudas. Influencia del enriquecimiento en la re- cuperación del microorganismo, Rev. Lat-amer Micro--

bial. 25:263-269.

- 17.- Greenwood, D.E., Swaminathan, B. and Morse, E.V. -- 1983, Two Selective enrichment media for the isolation of Salmonella from mechanically deboned poultry meat. *J. Food Science.* 45:1131-1135.
- 18.- González Raimundo. *Microbiología de los productos marinos.* P.8-11-Edit. Pueblo y Educación Ciudad de la Habana.
- 19.- Gulasekharan, J., Velaudapillai, T. And Niles, G.R. - 1956. The isolation of Salmonella organisms from fresh sold in a Colombo fish market. *HYG* 54:581-584.
- 20.- Hackney, Cameron R. and Dickjarry Angela. 1988. --- Seafood borne bacterial pathogens of marine origen. *Food Technology.* 42:104-109.
- 21.- Hobbs G. 1983. Microbial spoilage of fish. *Food Microbiology. Advances and Prospects.* Roberts. T.A. y Skinner. F.A. Edit. Acad. Press.Inc.
- 22.- Lannelongue, M.G., Finne. M.O. Hanna, R. Nickelson-II and Vanderzant, C. 1982. Microbiological and chemical changes during storage of sword fish (Xiphias gladius) steaks en retail packages containing CO<sub>2</sub> Enriched atmospheres. *J. Food Protection.* 45:1197-1203.
- 23.- Pérez Miravete, A. 1974. Fuentes de infección y transmisión de salmonelosis. *Salud Pública de México.* 16:37-48.
- 24.- Potter, N. 1973. La ciencia en los alimentos. México, D.F. Edit. Edutex. Cap. 15:469-478.
- 25.- Saldaña Lozano, J. Y Fernández Escartín, E. 1985. De sarrollo de Salmonella typhi en fruta partida. II-Reunión Anual de Microbiología Sanitaria. Universidad de Guadalajara Fac.de Ciencias Químicas.



- 26.- Saldaña Lozano, J. y Fernández Escartín, E. 1986. Actividad de Salmonella en el requesón. XVII Congreso Nacional de Microbiología. Asociación Mexicana de Microbiología. Puebla, Pue.
- 27.- Saldaña Lozano, J., Torres Vitela, R. y Fernández Escartín, E. Sobrevivencia de Salmonella en una ensalada de pasta de codito con jamón y mayonesa mantenida a temperatura ambiente. XVI Congreso Nacional de Microbiología. Veracruz, Ver.
- 28.- Salle, A.J. 1985 Fundamental principles of Bacteriology U.S.A. Edit. McGraw-Hill Cap 23:772-773.
- 29.- Silleker, J.H., Elliott, R.P. Baird-Parker, A.C., - Bryan, F.L., Christian, JHB, Chark, D.S. Olson, J.C. Roberts, T.A. Ecología microbiana de los alimentos I. ICMSF. Edit. Acribia.
- 30.- Somaatmadja Dardjo, Powers John J. and Pratt Dan E. 1960. Chemical methods for the determination of the freshness of fish.
- 31.- Tarr. H.L.A. Biochemistry of fish Annual Review of Bio Chemistry. 27:223-247. 1958 Cit en ref. 30
- 32.- Todd, E.C.D. 1985. Foodborne and water borne disease in Canadá-1978. J. Food Protection. 48:990-996.
- 33.- Torres Vitela, R. y Fernández, Escartín E. 1986. Microbiología de ceviche de pescado. XVII Congreso Nacional de Microbiología. Asociación Mexicana de Microbiología Puebla, Pue.
- 34.- Wethington, M.C. y Fabian. F.W. 1950. Viability of - food poisoning Staphylococci and Salmonella in salad dressing and mayonnaise. Food Res. 15:125-134.
- 35.- Wyatt, L.E. Nickelson II, R. and Vanderzant, C. --- 1979 Ocurrende and control of Salmonella en freshwater catfish. J. Food Science. 44:1067-1073.