

Estudio Microbiológico de Conservas de Pescado Alteradas

Dra. ANGELA M. DE SORIANO

I. — Introducción y Antecedentes

Durante los años 1942 y 1943, se recibieron en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, Sección Microbiología, del Instituto Nacional de la Nutrición, 144 muestras de pescados. 5 muestras de pollos y 1 de "chili" con carne, todas envasadas y aparentemente alteradas.

De las 150 muestras, sólo en 123, se consiguió aislar bacterias que, según comprobación posterior, deben ser consideradas como las reales causantes de la alteración. El detalle del contenido de los 123 envases estudiados fué el siguiente: atún, 30 latas; sardinas, 30 (13 en aceite y 7 en tomate); mujil, 17; berberechos, 8; salmón, 8; pescadilla, 7; pejerrey, 6; camarones, 6; lisa, 5; anchoas, 5; merluza, 4; huevas en aceite, 1; pollo, 5 y "chili" con carne, 1.

Todas estas muestras correspondieron a cuatro fábricas distintas y los envases de cada origen fueron obtenidos al mismo tiempo en cada una de ellas.

Como antecedentes generales sobre el tema, puede mencionarse que la conservación de los alimentos herméticamente en recipientes cerrados, parece tener su origen el año

1795, fecha en que el gobierno de Francia ofreció estimular con 12.000 francos al que obtuviera el mejor método de conservación de los alimentos por envasamiento. En 1810 un ministro francés hizo entrega de este premio a Nicolás Appert, quien publicó un libro sobre "El arte de la conservación de sustancias animales y vegetales". En esta publicación el autor describió un método para preparar alimentos envasados sin explicar las bases del mismo, pero haciendo resaltar como puntos importantes del proceso, la eliminación del aire y la aplicación del calor.

En el año 1866 Pasteur, también en Francia, demostró en forma indiscutible, con numerosas experiencias, que quedaron célebres en los anales de la ciencia, que la descomposición de los alimentos era debida a la acción de los microorganismos. A los autores mencionados les sucede Peter Durant, quien sacó patente en Inglaterra para dedicarse a esta clase de actividades. Shaddington en el mismo país, describió también un método casero para conservar frutas por el agregado de azúcar, el cual tiene mucha semejanza con el método que actualmente se usa.

En los Estados Unidos de Norte América. Kensett fué el primero que usó envases metálicos para conservar alimentos. pues anteriormente a esa fecha, sólo se usaban envases de vidrio. Este autor realizó ensayos con pescados y mariscos, tales como salmón, ostras, etc., permitiéndole el tipo de envase usado, efectuar una esterilización a alta temperatura.

Fácil es deducir por estos antecedentes que en diversas partes se ha prestado un interés especial al mejoramiento de las técnicas para el envasamiento de los alimentos, interés que ha ido progresivamente en aumento después de la primera guerra mundial del año 1914.

En la actualidad para hacer efectivo este mejoramiento, tanto los industriales como las autoridades sanitarias deben ocuparse de los alimentos desde la etapa de su producción y no sólo desde el momento de su envasamiento.

Al efectuar el examen del alimento envasado, es de primordial importancia determinar sus condiciones de esterilidad, para lo cual debe investigarse la presencia de algún microorganismo vivo en el mismo, que, en caso de verificarse, puede producir en el alimento alteraciones provocadas por su desarrollo.

Entre las causas de orden microbiano, productoras de alteraciones en los alimentos envasados, se han citado en la literatura, como las más frecuentes, las que se indican a continuación.

1º — Bacterias esporuladas termófilas, anaerobias facultativas, que desarrollan aún a temperaturas de 60-70° C. y que producen un considerable aumento de la acidez del alimento envasado, pero sin la for-

mación de gas, por lo cual no llegan a deformar el envase externamente, obteniéndose los llamados "envases planos", en cuyo caso la alteración sólo es reconocible una vez abierto el envase y examinado química y bacteriológicamente su contenido.

2º — Bacterias esporuladas termófilas, anaerobias absolutas, formadoras de hidrógeno sulfurado que pueden producir hinchamiento en los envases metálicos.

3º — Bacterias esporuladas termófilas, anaerobias, formadoras de gas, que pueden provocar hinchamiento en el envase, pero que no forman hidrógeno sulfurado.

II. — Tratamiento de las Muestras y Métodos de Investigación

Las muestras a analizar fueron sometidas a las observaciones y tratamiento indicado por Cameron en sus trabajos de los años 1937 y 1938. Luego de anotar la proveniencia y el aspecto y tipo del envase, éste fué cuidadosamente desinfectado quemando, con la llama de un mechero, el lugar donde debe efectuarse la perforación, que se realiza con un abridor de latas esterilizado. Una vez abierto el envase, se describe detallando el olor, consistencia, color, etc., del contenido, y finalmente se saca una porción de material con una pipeta estéril y se tritura en un mortero también estéril. después de lo cual se efectúan las diluciones correspondientes con agua esterilizada y se hacen las siembras en los diversos medios de cultivo.

Como medios de enriquecimiento se ha utilizado el caldo de digestión de carne y el caldo de hígado glucosado para las bacterias esporuladas anaerobias de la putrefacción, y

otros grupos de anaerobios, así como el caldo de corazón obtenido por digestión péptica. También fué utilizado el medio de maíz con hígado, para los anaerobios no productores de hidrógeno sulfurado y finalmente el agar con sulfito para el reconocimiento de las bacterias formadoras de hidrógeno sulfurado. Para obtener el aislamiento de las bacterias investigadas, se empleó con muy buen resultado en este caso el agar de digestión de carne.

El caldo y el agar de infusión de carne así como el medio de cerebro, la gelatina y los medios y procedimientos para la investigación de la formación de indol y la reducción de nitratos, se prepararon y realizaron de acuerdo con las indicaciones contenidas en el Manual de los Métodos de la Sociedad de Bacteriólogos Americanos.

Para la investigación de ácido sulfhídrico y sulfuro se utilizó la leche con hierro de Spray y el medio de von Hibler, este último, preparado de acuerdo con las indicaciones de Cameron.

Los medios de hígado y de corazón fueron preparados siguiendo las prescripciones de Mc. Clung (1930) y el medio de maíz con hígado, las de Mc. Clung y Mc. Coy (1934).

Para la comprobación del poder patógeno, se efectuaron inyecciones intraperitoneales en lauchas con la técnica indicada para el Clostr. tetani.

Finalmente, para la comprobación de la causa de la alteración de bacterias desarrolladas y esporuladas en caldo de corazón, fueron inoculadas en latas de sardinas y arvejas estériles acompañadas de latas no sembradas en calidad de controles, todas las cuales, desde las 24 horas

de incubación a 37° C., fueron examinadas con respecto a la aparición de hinchamientos o fisuras con pérdida de material producido por la excesiva formación de gas.

Resultados

De las 150 muestras de alimentos envasados estudiados en este trabajo, en 144, se pudo comprobar la presencia de microorganismos en su interior. Luego del estudio microbiológico completo de las bacterias aisladas, que comprendió el examen de las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas y de los caracteres de cultivo, resultó que en 123 de estos casos, o sea en el 85.4 por ciento de los casos bacteriológicamente positivos, se encontró un mismo tipo de bacteria correspondiente al grupo de las bacterias esporuladas anaerobias, productoras de gas. En las 21 casos restantes sólo se consiguió aislar bacterias aerobias no productores de gas, por lo cual debe presumirse que ninguna de ellas pudo ser causante de la alteración gasógena observada en los envases sometidos a estudio. Por esta razón, estos casos no fueron posteriormente comprendidos en el estudio.

Por otra parte, en 92 de los 123 casos en que se aisló el tipo de bacteria anaerobia gasógena antes mencionada, se encontraron también otros tipos de bacterias que la acompañaban. De éstos, en 56 casos se encontraron cocos, y en 36 bacterias esporuladas aerobias, de las cuales 18 correspondieron a Bac. cereus, 16 a Bac. vulgatus y 2 a Bac. subtilis. Además, en otros 6 casos se aislaron también conjuntamente con la bacteria anaerobia

anterior, otras cepas de bacterias anaerobias, esporuladas gasógenas, cuyas características no coincidieron totalmente con aquella, por lo cual fueron momentáneamente dejadas de lado.

Las características de las cepas aisladas en los 123 casos en que se logró separar la bacteria que posteriormente fué identificada como la causante de la alteración gasógena estudiada, son las siguientes:

Morfología: Bacterias alargadas con extremos redondeados, de 0,7-0,8 por 3-10, sueltas o unidas de a pares. Esporuladas preferentemente en forma de plectridio, con esporas en posición subterminal y de forma ovalada.

Coloración de Gram: Positiva.

Colonias: Medjanas, bordes irregulares y centro espeso.

Desarrollo en caldo: En caldo de infusión de carne se obtiene enturbiamiento con fuerte formación de gas y mal olor.

Medio de hígado y corazón: Desarrollo rápido, abundante, con formación de gas y mal olor. Muy buena esporulación en el último.

Medio de maíz: Menos desarrollo que en los anteriores.

Caldo con clara de huevo: Entre 24 y 48 horas digiere totalmente la clara de huevo y forma turbidez abundante.

Leche con y sin hierro: Coagula digiere muy rápidamente la caseína y ennegrece.

Licuaón de gelatina: La gelatina licúa rápidamente y ennegrece ligeramente.

Producción de indol: Negativa.

Reducción de Nitratos: La investigación de nitratos dió negativa.

Formación de SH₂: En el agar de von Hübner con clavo, se produce de-

sarrollo rápido con formación de gas y ennegrecimiento. En el medio de cerebro con clavo se obtuvo también desarrollo rápido, abundante, con formación de gas y ennegrecimiento.

Optica de temperatura: 37° C., desarrolla muy lentamente a 45° C. y en forma escasa. A temperatura ambiente desarrolla más lentamente que a 37° C pero el desarrollo es abundante.

Comportamiento con el oxígeno: Anaerobio absoluto.

Fermentación de hidratos de carbono: Fermenta glucosa, levulosa, galactosa y maltosa. No fermenta: lactosa, sacarosa, salicina e inulina.

Poder patógeno: Las inoculaciones en lauchas dieron resultado negativo.

Reproducción de la alteración en el laboratorio: A objeto de demostrar si la bacteria descripta posee la capacidad de producir el tipo de alteración observado en los alimentos de los cuales fué aislado, se procedió a sembrar algunos cultivos de esta bacteria en latas no alteradas de sardinas con aceite o con salsa de tomate, dejándolas por un tiempo a la temperatura de 37° C., para luego observar las alteraciones producidas, en primer término, la deformación del envase por formación de gas.

Este procedimiento permitió comprobar en forma incontrovertible la capacidad de crecimiento y de formación de gas de las bacterias en estudio, en esas condiciones, lo cual, debido a la circunstancia de haberse obtenido la misma en 25 casos al estado puro, directamente de las latas alteradas, autoriza a considerar a esta especie como la responsable

de haber producido la alteración del alimento nombrado. Conjuntamente con las sardinias se inoculó una lata de arvejas envasadas al natural, para ver a la vez si la bacteria en estudio poseía la capacidad de desarrollarse y formar gas, o alterar en alguna forma este otro alimento envasado. Finalmente, una lata de sardinias se dejó como control sin inocular.

Los resultados obtenidos ya, al cabo de 48 horas fueron concluyentes: una de las latas de sardinias en aceite y la lata de arvejas, a las 24 horas de incubación a 37° C., se encontraron con signos evidentes de formación de gas, con las paredes de ambas bases levantadas, sin ceder a la presión de la mano. Antes de las 48 horas ambas latas estallaron en la estufa debido a la enorme presión del gas, a la vez que todas las otras latas inoculadas presentaron a los dos días, signos inequívocos de alteración evidente por formación abundante de gas en el interior. La lata de sardinias no inoculada que sirvió de control incubada en la misma condición que las anteriores, no sufrió alteración alguna, quedando las paredes perfectamente planas.

Comentarios

La demostración de la presencia de una alteración de la naturaleza microbiana en los alimentos envasados en latas, como la estudiada, pone de manifiesto la importancia que tiene el conocimiento de esos tipos de alteración especialmente si se considera el problema del punto de vista económico, por parte del industrial.

Si en los productos examinados en este trabajo, en la forma que se ha

relatado, ha sido posible demostrar la presencia de una bacteria capaz de alterar profundamente los caracteres organolépticos del producto, hasta el punto de hacer imposible el consumo, aún antes de probarlo, por los evidentes signos externos de alteración, manifestados por la acusada deformación del envase, es evidente que debió existir en las fábricas de envasamiento, alguna deficiencia técnica que impidiera la destrucción de la bacteria que nos ocupa, durante el proceso de esterilización a que son sometidos los recipientes después de su llenamiento y cierre hermético, o bien que impidiera el cierre perfecto del mismo, haciendo posible, en consecuencia, la reinfección del producto en cualquier momento. Esto último resulta poco probable, a juzgar por lo que puede inferirse de las latas examinadas en este trabajo, puesto que todas mostraron encontrarse, al examen minucioso, sin fallas de cierre aparentes. Con gran probabilidad la alteración estudiada fué provocada por una fuerte contaminación del producto considerado y por algún defecto en la esterilización del mismo.

Conclusiones

El estudio microbiológico de las 150 muestras de pescados y carnes envasadas y alteradas, ha permitido demostrar la existencia de una bacteria anaerobia, productora de hidrógeno sulfurado, como causante de la alteración, que luego de su estudio morfológico, fisiológico, bioquímico y de los caracteres de cultivo, resultó corresponder al *Clostridium sporogenes* Metchnikoff.

La inoculación de dichas cepas en latas estériles de sardinias en aceites

y tomates y de arvejas, permitió comprobar que la bacteria mencionada fué, en los casos estudiados, la causa real de la alteración observada.

Resumen

En el presente trabajo se ha realizado el estudio microbiológico de 150 muestras de alimentos envasados y alterados, en 123 de las cuales fué posible aislar el agente productor de la alteración. Las muestras consistieron en: 30 latas de sardinas (12 en aceite y 7 en tomate), 17 de mujil, 8 de berberechos, 7 de pescadilla, 6 de camarones, 8 de anchoas, 5 de lisa, 5 de salmón, 4 de merluza, 1 de huevas en aceite, 5 de pollo y 1 de "chili" con carne. El total de los envases correspondieron a cuatro fábricas distintas y a una misma elaboración en cada una de ellas.

Tanto en la bibliografía nacional, como en la extranjera, no se ha podido encontrar antecedentes relacionados con los materiales y el agente productor de la alteración estudiada en el trabajo.

Para el tratamiento de las muestras, se han seguido las indicaciones sugeridas por Cameron para las carnes y los vegetales envasados simultáneamente, aparte de algunos pequeños agregados hechos durante el curso del trabajo.

Los métodos de investigación empleados y la confección de los medios de cultivo para el enriquecimiento y mantenimiento de las cepas, y para el estudio sistemático completo, fueron los aconsejados por Cameron y por Spray y especialmente por el Manual de Métodos de la Sociedad de Bacteriólogos Americanos: finalmente, algunos métodos

fueron adaptados en el laboratorio a objeto de satisfacer la observación de algunos caracteres exigidos por las claves de clasificación para este grupo de gérmenes.

A continuación se expone el estudio detallado de las características morfológicas y fisiológicas, de los caracteres de cultivo de la bacteria anaerobia formadora de gas que se logró aislar en la mayor parte de los casos estudiados, por cuya razón fué considerada desde un principio como la posible causa del tipo de alteración estudiado.

Los caracteres encontrados permiten identificar a la bacteria en cuestión como *Clostridium sporogenes* Metchnikoff.

La inoculación de los cultivos de esta bacteria en varias latas de sardinas envasadas estériles, con aceite o con salsa de tomate y en arvejas, y su ulterior incubación a la temperatura 37° C., ha permitido comprobar su capacidad de crecimiento y de formación de gas en esas condiciones, obteniéndose la reproducción del tipo de alteración original, por lo cual se está autorizando a considerar a esta especie como la responsable de la alteración gasógena estudiada en el trabajo.

Bibliografía

Bergey D. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. A key for the identification of organisms of Class Schizomycetes 5th Ed. Williams and Wilkins Co Baltimore. 1939.

Hall I. C.: Differentiation and identification of the sporulating anaerobes. J. of Inf. Dis. 30: 445. 504, 1932.

- Cameron E. J., J. R. Esty and C. C. Williams: The cause of "black beets" and example of oligodynamic action as a contributory cause of spoilage. *Food Research* 1: 73-85, 1936.
- Cameron E. J.: Report on culture media for non acid products. Methods for the examination of canned meats. *Assoc. of Official Agric. Chemists*. 20: 429-432, 1938.
- Cameron E. J.: Report on Microbiological methods for the examination of canned vegetable. *J. of the Assoc. of Official Agric. Chemists*. 21: 543-454, 1938.
- Committee on bacteriological Technique of the American Bacteriologist. *Manual of Method for pure culture study of Bacteria*, 366 pág. Ed. Soc. of Amer. Bacteriologists. Geneva N. Y. 1923-36.
- McClung L. S. and E. Mc Coy: Studies on anaerobic bacteria. I. A. corn liver medium for the detection and dilution counts of various anaerobes. *J. of Bact.* 28: 267-277, 1934.
- McClung L. S.: The use of dehydrated thioglycollate medium enrichment of spo-reforming anaerobic bacteria. *J. of Bact.* 40: 645-648, 1940.
- Prescott S. and F. Tanner: Microbiology in relation to food preservation. *Food Research* 3: 189-197, 1937.
- Sjolander N. C. and Mc Coy E.: Studies on anaerobic Bacteria. XIII. A cultural Study of some "Butyric" Anaerobes Previously described in the literature. *Cent. f. Bakt. II Abt.* 97: 314-324, 1937.
- Spray R. S.: Semid solid media for cultivation and identification of the sporulating anaerobes, *J. of Bact.* 32: 135-155, 1936.