

# EFFECTO DEL pH SOBRE LA PRODUCCIÓN DE HISTAMINA POR ENTEROBACTERIAS PRESENTES EN MÚSCULO DE CACHAMA NEGRA (*Colossoma macropomum*)

## Effect of pH on Histamine Production by Enterobacteria in Black Cachama Muscle (*Colossoma macropomum*)

Miller Restrepo<sup>1</sup>, Gabriel Torres<sup>2</sup>, Zoraida Medina<sup>1</sup>, Aiza García<sup>2</sup>, María Piñero<sup>2</sup> y María Allara<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología. Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia.

<sup>2</sup>Unidad de Investigación Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Zulia. gabriel.torres@fcv.luz.edu.ve

### RESUMEN

La cachama negra (*Colossoma macropomum*) representa una de las especies más importantes para la acuicultura en Venezuela; sin embargo, como producto pesquero, la información sobre su calidad microbiológica y presencia de bacterias productoras de histamina es escasa. El presente estudio tuvo como objetivo identificar las enterobacterias productoras de histamina (EPH) presentes en muestras de tejido muscular de cachama negra, así como el efecto del pH sobre la producción de histamina. Para ello, se realizó el recuento de enterobacterias y el aislamiento e identificación de las enterobacterias presentes, empleando los medios diferenciales e incluyendo el sistema de identificación API 20 E. Las EPH fueron detectadas mediante la metodología propuesta por Niven. El efecto de diferentes valores de pH (4,5; 5,5; 6,5 y 7,5) sobre la producción de histamina se evaluó "in vitro" mediante una modificación del medio de Niven y la concentración de histamina se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se identificaron 24 cepas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, entre éstas solo *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Salmonella arizonae*, *Enterobacter sakazakii* y *Klebsiella oxytoca*, fueron confirmadas como EPH. No obstante, solo *K. oxytoca* mostró gran actividad histaminogénica al producir cantidades considerables de histamina a todos los valores de pH estudiados, teniendo un óptimo de producción a pH 6,5. No se encontró diferencia significativa ( $P>0,05$ ) entre los tratamientos para esta cepa. Se concluye que el pH representa un factor limitante en la capacidad histaminogénica solo para ciertas especies bacterianas.

**Palabras clave:** Cachama, enterobacterias, histamina, pH.

### ABSTRACT

The cachama negra (*Colossoma macropomum*) represents one of the most important fish species in Venezuelan aquaculture; however, there are some gaps of information regarding microbiological quality and presence of histamine producing bacteria. Thus, the objective of this study was to identify histamine producing enterobacteria (HPE) in "cachama negra" muscle, as well as pH influence on histamine production. For this purpose, enterobacteria counts, as well as isolation and identification were carried out employing differential culture media and API 20 identification system. The effect of (4.5, 5.5, 6.5, 7.5) pH on histamine production by HPE was assessed using Niven's methodology and histamine concentrations by means of high performance liquid chromatography (HPLC). Twenty four strains from enterobacteria were recovered and identified, among them *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Salmonella arizonae*, *Enterobacter sakazakii*, and *Klebsiella oxytoca* were confirmed as HPE. Only *K. oxytoca* exhibited high histaminogenic activity, producing considerable amounts of histamine at all studied pH, with an optimum production at pH 6.5. No significant differences ( $P>0.05$ ) were found among treatments for this strain. It is concluded that pH is a limiting factor in histaminogenic capacity only for certain bacterial species in fish.

**Key words:** Cachama, enterobacteriaceae counts, histamine, pH.

### INTRODUCCIÓN

El pescado aporta a la dieta una importante cantidad de proteínas de gran calidad y elementos esenciales como vita-

minas y minerales, representando un alimento de excelentes propiedades nutricionales, lo que ha promovido considerablemente su producción en el mundo durante los últimos años [19]. Para consumo humano se ha reportado una producción anual de 110 millones de toneladas de pescado a nivel mundial, procediendo el 47% de esta cantidad de la acuicultura, una importante actividad productiva que crece más rápidamente que cualquier otro sector de producción de alimentos de origen animal [11, 19]. En Venezuela, la acuicultura está representada por el cultivo de diversas especies de peces como la cachama negra (*Colossoma macropomum*), cuya cría se encuentra en expansión por todo el país, se considera un alimento de importancia nutricional altamente digerible y además muestra buena aceptación por parte del consumidor [11].

No obstante, la producción y comercialización de este producto pesquero también se relaciona a otros aspectos que afectan su estabilidad y seguridad alimentaria. Generalmente, las medidas de manipulación y tratamientos aplicados al pescado pueden influir sobre la ocurrencia de diversos procesos *post-mortem*, tales como actividades autolíticas y oxidativas, que no solamente deterioran su calidad rápidamente, pues son alimentos de naturaleza altamente perecedera, sino que también favorecen la proliferación microbiana [25], incrementada por las diversas formas inapropiadas de conservación y/o ausencia de normas de higiene y sanidad. Esto representa un riesgo potencial de que aparezcan diferentes enfermedades de transmisión alimentaria (ETA), generalmente causadas por la presencia de bacterias como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* o *Vibrio* spp. [2, 14, 19].

Sin embargo, se ha establecido que la causa frecuente de reacciones adversas al consumidor se debe a la ingesta de pescado contaminado con cantidades sustanciales de histamina, una amina biógena (AB) causante de escombrototoxicosis [14]. Su producción a concentraciones de riesgo para el consumidor se debe a la proliferación de diversas bacterias capaces de metabolizar el aminoácido histidina (His) presente en concentraciones variables en el tejido muscular del pescado, mediante la acción de la enzima histidina descarboxilasa (HDC) sintetizada por estas bacterias [9, 11, 15, 29]. La mayoría de los estudios indican que diversos representantes de la familia *Enterobacteriaceae* constituyen las bacterias productoras de histamina más prolíficas, muchas de éstas son consideradas indicadores de sanidad y su presencia en los alimentos se relaciona a un manejo inadecuado de los mismos [9].

La actividad de la enzima HDC de estas bacterias puede depender de diversos factores extrínsecos, como temperatura y tiempo de almacenamiento del pescado [9] o concentración de His libre en músculo [23]. Sin embargo, Thadhani y col. [22] establecieron que el pH resulta vital para el control y formación de histamina; en este sentido, la presente investigación tuvo por objetivo determinar el efecto del pH sobre la actividad de la enzima HDC de las enterobacterias presentes en el músculo de cachama negra.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolección y preparación de muestras

Fueron colectados al azar 20 ejemplares enteros (sin eviscerar) de cachama negra con un peso promedio de 1,5 kg c/u, en el mercado popular "Las Pulgas" de la ciudad de Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. Estas muestras se adquirieron en cuatro puestos ambulantes que no cuentan con refrigeración eléctrica y el pescado es conservado en hielo o vendido a temperatura ambiente (30°C). Las muestras se colocaron en bolsas plásticas estériles y se transportaron refrigeradas en hielo (<10°C) hasta la Unidad de Investigación Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Veterinarias, donde inmediatamente y bajo condiciones de asepsia, fueron procesadas para extraer porciones musculares de 10; 25 y 50 g de cada ejemplar, que se destinaron para los análisis microbiológicos y químicos.

### Análisis microbiológicos

#### Recuento de enterobacterias

Las muestras fueron preparadas según la norma COVENIN [5]. Las porciones de 25 g de músculo fueron homogenizadas en 225 mL de agua peptonada-tamponada estéril 0,1% (Peptona, MERCK®) a través de un triturador de cuchillas (Oster®) durante 2 min. La suspensión resultante representó el homogenizado madre ( $10^{-1}$ ), a partir del cual se preparó una batería de diluciones seriadas desde  $10^{-2}$  hasta  $10^{-5}$  para el recuento de *Enterobacteriaceae* (RE) según lo establecido en la norma COVENIN [4].

#### Aislamiento e identificación de enterobacterias

A partir de las diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ , se tomaron inóculos y se sembraron en placas con agar McConkey (MC, Merck®) y Eosina Azul de Metileno (EMB, Merck®). Éstas se incubaron a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por  $24\text{h} \pm 1\text{h}$ . Posteriormente se sub-cultivaron las colonias características en agar nutritivo (AN, Merck®) y se les realizó la caracterización morfológica respectiva por tinción Gram y prueba de la enzima citocromooxidasa. Las cepas obtenidas se identificaron a través del esquema de pruebas bioquímicas para enterobacterias, recomendado por el manual Bergey [7] y confirmadas mediante el sistema de identificación API 20E (Biomérieux, Inc.).

#### Detección de actividad de la enzima HDC

La actividad HDC de las cepas identificadas fue detectada mediante el medio diferencial para bacterias productoras de histamina (BPH) propuesto por Niven y col. [18] y modificado por Yoshinaga y Frank [29]. El pH final del medio se ajustó a 6,5 con NaOH 1 N. Para la prueba de detección, este medio se empleó como caldo de cultivo, provisto con tubos Durham invertidos y en agar de cultivo en columna-bisel (taco-bisel).

La reacción positiva se evidenció por la presencia de gas en los tubos Durham y la formación de un color rojo en la parte superior del caldo o en la superficie del bisel del agar, debido al viraje del indicador rojo de cresol, producto del incremento del pH [18, 29].

## Análisis químicos

### Determinación de pH

El pH de las muestras se determinó según el procedimiento establecido en la norma COVENIN [3].

### Cuantificación de histidina libre e histamina en músculo de *C. macropomum*

La detección y medición de las concentraciones de His libre e histamina en las muestras, se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), según el método descrito por Gouygou y col. [8]. Para ello, se empleó un sistema cromatográfico compuesto por una bomba modelo LC-10A (Shimadzu®, Japón), una válvula de inyección manual con un *loop* de 20  $\mu$ L de capacidad (Rheodyne®, EUA) y una columna de fase reversa ODS (4,6 mm  $\varnothing$  x 150 mm x 5 $\mu$ , Beckman®, EUA). Se utilizó un detector de fluorescencia modelo FLD-6A (Shimadzu®, Japón). El registro y análisis de los datos obtenidos se procesaron en el software cromatográfico Class-VP versión 4,2 (Shimadzu®, Japón).

Se empleó un sistema isocrático de solventes con una fase móvil constituida por acetonitrilo de grado analítico (ACN, Merck®, Alemania) (60:40% v/v) en una solución de fosfato monosódico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Fisher®) a una concentración de 50 mM, ajustada a pH 7,5  $\pm$  0,5.

La extracción de los analitos (His e histamina) en las muestras se realizó tomando porciones de 50 g de músculo y homogeneizándolas en 100 mL de ácidotricloroacético (TCA, Merck®) al 10% (v/v) durante 2 min en una licuadora (Oster, Estándar, EUA) a máxima velocidad. Posteriormente, se filtró al vacío a través de papel de filtro Whatman N° 1 y membrana de nylon de 0,45 y 0,22  $\mu$ m de poro (Millipore®). Los extractos resultantes se colocaron en viales estériles y se conservaron a -20°C, hasta su posterior análisis en un lapso menor a 15 d. Los estándares de referencia de His e histamina (Sigma®) fueron preparados a concentraciones conocidas de 10, 15 y 20 mg L<sup>-1</sup>, disueltos en TCA al 10%. Estas soluciones se filtraron al vacío a través de membrana de nylon 0,22  $\mu$ m de poro (Millipore®), y se colocaron en viales estériles para su almacenamiento a -20°C.

La formación de derivados fluorescentes se realizó mezclando por separado 135  $\mu$ L de las soluciones estándar y extractos con 1,86 mL de agua bidestilada desionizada y 0,4 mL de NaOH 1N, dejando en reposo por 1 min para agregar 0,1 mL de una solución de O-ftalaldehído (OPA) (Riedel®, Alemania) al 0,1% en metanol; se dejó en reposo por 4 min y se adicionaron 0,2 mL de HCl 3 N. Este procedimiento se llevó a cabo en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente

(25°C  $\pm$  3°C) debido a la fotosensibilidad del OPA. Cada derivatizado obtenido fue inmediatamente inyectado en el cromatógrafo por duplicado. Las inyecciones se realizaron a 25°C, a un flujo constante de 1,0 mL min<sup>-1</sup> de caudal [23].

### Cuantificación de la histamina producida por enterobacterias a diferente valores de pH

Las cepas de la familia *Enterobacteriaceae* identificadas como EPH en conservación, fueron reactivadas en caldo Infusión Cerebro Corazón (CBHI, Merck®) enriquecido con 0,1% de L-His, pH 6,5 e incubados a 37°C  $\pm$  1°C por 24h. Posteriormente, se prepararon inóculos de cada cepa equivalentes a 1,5 x 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, mediante comparación de turbidez con la escala de McFarland igual a 0,5. De éstos se tomó 1 mL transfiriéndolo a tubos con 9 mL de caldo Niven modificado, previamente ajustado a los valores de pH propuestos para este estudio, los cuales fueron 4,5; 5,5; 6,5 y 7,5, constituyendo cuatro tratamientos para cada cepa. Finalmente se incubaron a 37°C  $\pm$  1°C por 48h  $\pm$  1h [23].

La extracción de histamina se realizó tomando 0,5 mL del cultivo y dispensándolo en tubos con 10 mL de TCA al 10%. Estos se agitaron moderadamente empleando un vortex (Thermolyne Corporation, EUA) por 10 segundos y se centrifugaron a 4200 g por 15 min en centrifuga Clay Adams, modelo Dynac (EUA). El sobrenadante obtenido se filtró a través de membrana de nylon 0,22  $\mu$ m de poro (Millipore®), se aforó hasta 10 mL con TCA al 10% y se colocó en viales estériles para su almacenamiento a -20°C. El análisis de detección y cuantificación se realizó a través de la técnica de HPLC, anteriormente descrita para los extractos musculares [23].

### Determinación de las concentraciones de histidina e histamina

Las concentraciones de His libre e histamina en las diferentes muestras (extractos musculares y cultivos bacterianos) fueron calculadas mediante la relación entre el área del pico correspondiente a los analitos en la muestra con las áreas de pico obtenidas para los respectivos estándares.

### Análisis estadístico

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y para discernir entre las medias, se utilizó el método de la diferencia más francamente significativa de Tukey (HSD). Los análisis se realizaron empleando el paquete estadístico SPSS® Statistics [20].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis microbiológico del músculo de cachama negra

El recuento promedio de enterobacterias presentes en las muestras analizadas fue 3,9 Log<sub>10</sub> UFCg<sup>-1</sup>. Este valor pudiera relacionarse con las inapropiadas condiciones de venta

que se observaron, lo cual concuerda con Morillo y col. [17], quienes establecen que en la etapa de expendio de los productos pesqueros, generalmente ocurre una alta incidencia de microorganismos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, específicamente al grupo de los coliformes.

Por otro lado, se han reportado recuentos de coliformes fecales entre 0,95 - 4,88 Log<sub>10</sub> UFCg<sup>-1</sup> para pescado proveniente de venta ambulante [14], sugiriendo la presencia de contaminación fecal y la necesidad de implementar mejoras en las medidas de manipulación y conservación del pescado. Por lo tanto, los factores determinantes para la predominancia de enterobacterias están representados, tanto por la interrupción en la cadena de frío como por la exposición del pescado a temperatura ambiente por tiempo prolongado [14, 28].

#### Aislamiento e identificación de enterobacterias presentes en músculo de cachama negra

Las enterobacterias aisladas e identificadas en el músculo de cachama negra fueron: *Escherichia coli* y *Enterobacter cloacae* (33,3%), seguidas por *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (12,5%) y *Citrobacter braakii* y *Serratia rubidaea* (8,3%). El grupo de menor incidencia (4,2%), estuvo conformado por *Enterobacter aerogenes*, *E. sakazakii*, *Salmonella arizonae*, *Citrobacter freundii*, *Ewingella americana*, *Klebsiella oxytoca*, *K. terrigena*, *Pantoea* spp. y *Yersinia* spp.

Estas especies de bacterias han sido anteriormente reportadas en músculo de diversas especies de pescado fresco de venta ambulante, como bocachico (*Pochilodus reticulatus*), lisa (*Mugil curema*), armadillo (*Hipostomus watwata*), sardina (*Sardinella aurita*) y tilapia (*Tilapia nilotica*) [9, 15, 17]. Es importante destacar que la alta incidencia de bacterias como *E. coli* y *E. cloacae* y la presencia de géneros potencialmente patógenos como *Salmonella*, *Klebsiella* y *Citrobacter*, corresponde al alto recuento de coliformes encontrado y representa un importante indicativo de contaminación fecal y/o ambiental, además de una condición de riesgo en el ámbito de salud pública [28].

La presencia de tales indicadores pudiera estar relacionada directamente con la etapa de expendio del producto, donde las condiciones de venta ambulante, manejo inadecuado y altas temperatura de exposición, favorecen la interacción del alimento con potenciales fuentes de contaminación, permitiendo la colonización de diversas enterobacterias y su establecimiento como flora contaminante *post-mortem*, ya que éstas no constituyen parte de la microflora natural del pescado [2, 14, 15, 21, 23].

#### Detección de actividad de histidina descarboxilasa

La TABLA I muestra los resultados de las pruebas de detección de actividad HDC. Las diferentes cepas se agruparon según la intensidad de reacción o capacidad de descarboxilación observada (fuerte o débil), partiendo de las reacciones características en el medio diferencial (viraje del indicador de pH y formación de gas), lo que se consideraron como actividad HDC po-

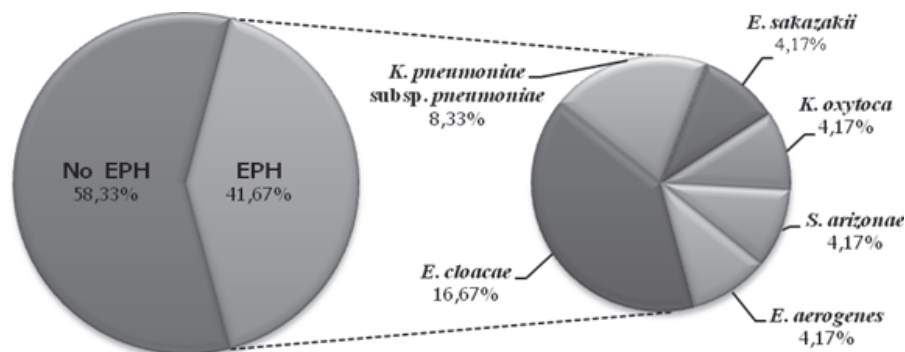
sitiva [15, 24]. Solo diez de las veinticuatro cepas aisladas mostraron actividad HDC en el medio de Niven, lo que representó un 41,7% de las cepas identificadas (FIG. 1). Esta clase de especies bacterianas pertenecientes a los géneros *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *E. coli* [9, 11, 15, 23, 24, 29] han sido reportadas en diversas investigaciones como productoras de histamina; sin embargo, las enterobacterias pertenecientes al género *Morganella*, como *M. morganii* o *M. psychrotolerans*, se han señalado como las más prolíficas [9, 21].

En esta investigación, *Klebsiella oxytoca* resultó la especie con mayor expresión de actividad HDC al compararla con los demás aislamientos, lo cual se evidenció por la considerable producción de gas y viraje de pH en el medio diferencial (agar y caldo). Estos resultados coinciden con los de Veciana y col. [26], al indicar que esta enterobacteria posee gran capacidad histaminogénica, tanto en condiciones “*in vitro*” como “*in situ*”, determinando altas concentraciones de histamina producida en muestras de atún inoculadas y expuestas a temperatura del laboratorio (25°C ± 1°C). Sin embargo, Wauters y col. [27] en su estudio sobre la presencia de la enzima HDC en diversas enterobacterias, reporta diecinueve cepas de *Klebsiella oxytoca* como no productoras de histamina. Esta diferencia de resultados posiblemente se relacione a los distintos nichos de aislamiento, ya que las cepas estudiadas por estos autores se obtuvieron a partir de muestras clínicas, mientras que la cepa correspondiente al presente estudio se aisló en pescado fresco, donde la presencia del sustrato precursor His en músculo y la exposición a temperaturas por encima de 5°C, pueden activar la acción de la enzima HDC [9].

TABLA I  
ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE HISTAMINA  
AISLADAS DE MÚSCULO DE CACHAMA NEGRA

Reacción	Cepa	Nº Cepas	Nº HDC <sup>□</sup>
Fuerte	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	1
	<i>Enterobacter cloacae</i>	4	4
	<i>Enterobacter sakazakii</i>	1	1
Débil	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	3	2
	<i>Salmonella arizonae</i>	1	1
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	1
	<i>E. coli</i>	4	-
	<i>E. americana</i>	1	-
HDC (-) <sup>Δ</sup>	<i>K. terrigena</i>	1	-
	<i>Pantoea</i> spp.	1	-
	<i>Yersinia</i> spp.	1	-
	<i>Citrobacter freundii</i>	1	-
	<i>Citrobacter braakii</i>	2	-
	<i>Serratia rubidaea</i>	2	-

□ Histidina descarboxilasa positivas; Δ Histidina descarboxilasa negativas.



**FIGURA 1. DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE LAS ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE HISTAMINA (EPH) AISLADAS DE MÚSCULO DE CACHAMA NEGRA.**

La actividad HDC de las bacterias puede depender de las propiedades iniciales del medio donde éstos colonicen o se desarrollen [26]; por lo tanto, la producción “*in vitro*” de histamina por *K. oxytoca* pudo suceder en respuesta al estímulo (inducción) causado por la presencia del aminoácido His en altas concentraciones (1%) en el caldo de cultivo, además de las condiciones y tiempo de incubación empleadas (aerobiosis a 37°C, 48 h), que son factores favorables para la actividad HDC [9, 13, 16].

No obstante, aunque dichas condiciones experimentales fueron las mismas para las demás bacterias identificadas, éstas presentaron una reacción mucho más débil, lo que posiblemente corresponda a un proceso de descarboxilación tardío y por tanto se requería de un tiempo mayor para producir una reacción completa [18]. Sin embargo, se ha reportado una producción evidente y cuantificable de histamina al cabo de 48 h [21, 29], lo que concuerda con los parámetros experimentales del presente estudio. Otro factor que pudiera estar involucrado en este fenómeno es el pH inicial de los medios, el cual puede inhibir el crecimiento de algunas bacterias productoras de histamina [18, 29]. Sin embargo, la producción de histamina no está relacionada con el número de bacterias presentes en un medio, sino con la especie bacteriana y su capacidad para sintetizar la enzima HDC [9], lo que explicaría que no se detectó producción de histamina en los cultivos correspondientes a *E. coli*, *E. americana*, *K. terrigena*, *Pantoea* spp., *Yersinia* spp., *C. freundii*, *C. braakii*, *S. rubidadea*, a pesar del evidente crecimiento en el medio de cultivo.

Se ha reportado que solo ciertas especies bacterianas son portadoras del gen *hdc* que codifica para la síntesis de la enzima HDC, mientras que otras, aunque muestran actividad HDC en los medios diferenciales, no poseen dicho gen [27]. Se ha propuesto que la capacidad HDC pudiera adquirirse mediante la transferencia de genes en unidades plasmídicas [27]; sin embargo, se cree que este proceso sucede en respuesta a un mecanismo de adaptación, como el desarrollo de resistencia antimicrobiana. Por lo tanto, la actividad HDC puede resultar como un efecto secundario del metabolismo de algunas bacterias [18].

#### **Cuantificación de la concentración inicial de histidina libre e histamina en músculo**

El contenido inicial promedio de His libre presente en músculo de cachama negra fue  $5,8 \pm 2,4$  mg/100g. Así mismo, las concentraciones de este aminoácido oscilaron entre 1,9 - 11,5 mg/100g, determinando una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) entre las concentraciones de His libre de las muestras analizadas. No se encontró información sobre el contenido de His libre en músculo de cachama negra; sin embargo, se puede inferir que la concentración de este aminoácido en las muestras de este estudio pudiera deberse a la cantidad relativamente baja de este aminoácido como constituyente de las proteínas musculares de esta especie [11].

Se presume que la fluctuación de las concentraciones de este aminoácido entre las diferentes muestras musculares, pudiera estar relacionada con el tratamiento brindado en el expendio, donde la temperatura y el tiempo de almacenamiento representan los principales factores influyentes. En corvina (*Cynoscion maracaiboensis*) y lisa (*Mugil curema*), se han indicado contenidos iniciales de His libre a temperatura ambiente (28°C) de 29,8 y 133,3 mg/100 gr, respectivamente; mientras que en almacenamiento a 0 y 6°C, se observan concentraciones iniciales más bajas [15, 24]. Temperaturas elevadas pudieran acelerar los procesos autolíticos que liberan cantidades importantes de aminoácidos libres [6]. Por otra parte, no se hallaron concentraciones de histamina en el músculo de cachama negra similares o superiores al límite de detección del método HPLC empleado ( $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Esto se relaciona con el bajo contenido de His libre detectado para esta especie, que no representa una cantidad significativa de sustrato para estimular la producción bacteriana de histamina hasta concentraciones tóxicas. Esto explicaría la débil muestra de actividad HDC en la mayoría de las enterobacterias aisladas. Por lo tanto, de acuerdo a estos resultados, la cachama negra no constituye un producto pesquero de riesgo para generar casos de intoxicación alimentaria debido a la histamina, al contrario de las especies pertenecientes a la familia *Scombridae* y *Scomberesocidae*, que poseen un alto contenido de His libre y están frecuentemente asociadas a casos de intoxicación por histamina [22].

### Efecto del pH sobre la producción de histamina por enterobacterias

Solo cuatro de las diez cepas detectadas HDC positivas mediante la técnica HPLC fueron realmente productoras de histamina. Entre estas *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Enterobacter sakazakii* y *Salmonella arizonae* produjeron bajas concentraciones de histamina en caldo de Niven modificado a un valor de pH específico de 1,58 mg/100mL (pH 5,5); 11,28 mg/100mL (pH 6,5) y 1,38 mg/100mL (pH 4,5), respectivamente, al cabo de 48 h a 37°C. Estos valores obtenidos en un ensayo inicial no se presentan como parte de los resultados; pues no se observó reproducibilidad en las subsecuentes repeticiones, al no detectarse histamina en el resto de los cultivos, por lo que debido a la insuficiencia de datos no se consideraron parte del análisis estadístico.

No obstante, en los ensayos realizados con *K. oxytoca*, se determinaron cantidades considerables de histamina, producidas a los cuatro valores de pH. Las concentraciones indicadas para las tres cepas anteriores sólo representaron entre 1 - 8% de la producción de *K. oxytoca* a los mismos valores de pH, por lo tanto, esta cepa se consideró "enterobacteria modelo", entre todos los aislamientos obtenidos, para inferir sobre la relación del pH inicial del medio y la correspondiente producción de histamina.

*Klebsiella oxytoca* ha sido considerada una de las enterobacterias más prolíficas en la producción de histamina, pudiendo generar hasta 500 mg.Kg<sup>-1</sup> bajo condiciones experimentales similares [9]. En la FIG. 2a se observa que la menor concentración de histamina producida por *K. oxytoca* ocurre a un pH de 4,5, mientras que a valor de pH 6,5 se produce la mayor concentración, considerándose éste como el óptimo para la actividad HDC. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ) entre las concentraciones de histamina producida a cada valor de pH estudiado (FIG. 2b), donde la mayoría de las concentraciones obtenidas se agrupan en un intervalo cercano, con escasos puntos o valores atípicos.

Las enzimas descarboxilasas de aminoácido se generan a valores de pH bajo y su rango de actividad oscila entre 3-5

[16]; sin embargo, diversos estudios han determinado que existe un rango de pH específico para la actividad HDC de ciertos microorganismos. *M. morgani* muestra una producción óptima de histamina a pH inicial alrededor de 6,0 y tiene un descenso a pH alrededor de 4,0, mientras que *Photobacterium phosphoreum* muestra un óptimo de producción a pH 7,0 y desciende a pH 5,5. Sin embargo, *P. damsela* presenta una producción de histamina a un amplio rango de pH (4,5-8,5) [12], lo que resulta similar a los resultados obtenidos en este estudio, puesto que la actividad HDC de *K. oxytoca* se produjo en el rango de pH 4,5-7,5 indicando una marcada estabilidad de la enzima HDC en medios ácidos y ligeramente ácidos o alcalinos [12]. Por otra parte, el pH muscular determinado en cachama negra de  $6,6 \pm 0,1$  a 25°C, coincide con el reportado por Bello y Rivas [1], para la misma especie y también resulta similar al reportado para otras especies como tilapia (*Oreochromis* spp.), bocachico (*Pochilodus reticulatus*), armadillo (*Hipostomus watwata*), corvina (*Cynoscion maraciboensis*) y lisa (*Mugil curema*) [17]. Estos valores de pH pueden representar una condición óptima para la actividad HDC [24] y la habilidad de bacterias altamente productoras de histamina como *K. oxytoca* puede ser ampliamente favorecida. Sin embargo, las bajas concentraciones del aminoácido precursor His en la cachama negra no representan un riesgo potencial de generar cantidades tóxicas de histamina.

Está claro que los resultados obtenidos indican que ninguno de los valores iniciales de pH estudiados afectan significativamente la actividad HDC expresada por *K. oxytoca*; no obstante, para las otras cepas aisladas posiblemente este parámetro pudo ser determinante, tomando en cuenta que todas ellas se evaluaron bajo las mismas condiciones experimentales y que las mismas mostraron un crecimiento evidente a las 24 h en el medio de cultivo (datos no cuantificados) [10]. Por lo tanto, se descarta que la composición del medio y las condiciones de cultivo hubiesen influido negativamente sobre la actividad HDC de estas cepas, encontrando un desempeño satisfactorio del medio de Niven modificado como parte del método para la evaluación de bacterias productoras de histamina, coincidiendo con lo establecido por Taylor y Speckhard [21].

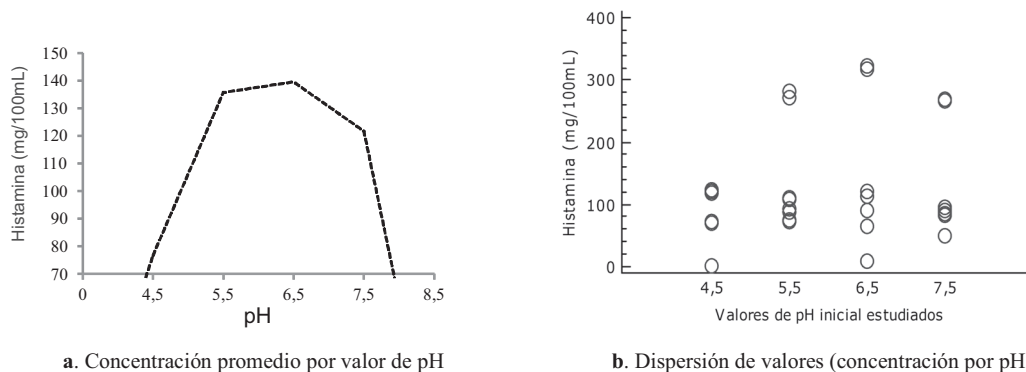


FIGURA 2. EFECTO DEL PH SOBRE LA PRODUCCIÓN DE HISTAMINA POR *K. OXYTOCA*.

La temperatura influye notablemente sobre la producción de histamina, ya que a temperaturas alrededor de 20°C la HDC presenta actividad [29]. Por otra parte, la temperatura empleada para los ensayos del presente estudio fue de 37°C y es óptima para el crecimiento de la mayoría de las enterobacterias [26, 27] por lo que se pudiera inferir que el pH inicial de los medios pudo tener un efecto inhibitorio sobre la actividad HDC de las cepas estudiadas, excepto para *K. oxytoca*. Varios autores [18, 21, 29] establecen que, valores iniciales de pH inferiores a 6,0 pudieran inhibir el crecimiento de algunos microorganismos y por lo tanto, su actividad metabólica. Esto sugiere que según la especie bacteriana, solo a ciertos valores de pH puede estimularse la síntesis de la enzima HDC y por ende, la producción de histamina.

## CONCLUSIONES

Las especies *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Salmonella arizonae*, *Enterobacter sakazakii* y *Klebsiella oxytoca* fueron confirmadas como enterobacterias productoras de histamina (EPH).

El valor de pH en el medio de cultivo no tuvo efecto sobre la producción de histamina por parte de las enterobacterias evaluadas. La producción de histamina por *Klebsiella oxytoca* no fue afectada significativamente ( $P>0,05$ ) por los valores de pH estudiados; sin embargo, mostró una producción mayor a pH 6,5.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda la evaluación del efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad HDC de las diversas enterobacterias productoras de histamina de manera individual.

## AGRADECIMIENTO

Los autores desean agradecer al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES-LUZ) por el financiamiento de este trabajo a través del Proyecto de Investigación CC-0307-10.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BELLO, R.; RIVAS, W. Evaluación y aprovechamiento de la cachama cultivada como fuente de alimento. Departamento de Pesca de la FAO. Depósito de Documentos de la FAO. Aquila II. Proyecto de Campo Nº 2. D. F., México. Pp 121. 1992.
- [2] CENTENO, S; RODRÍGUEZ, N. Evaluación microbiológica de pescados congelados producidos en Cumaná, estado Sucre, Venezuela. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** XV (2): 168-175. 2005.
- [3] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). **Alimentos determinación del pH (Acidez Iónica)**. 1315:79. Caracas, Venezuela. Pp. 1-7. 1979.
- [4] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). **Alimentos. Método para Recuento de Bacterias Coliformes en Placas de Petri.** 1ª Rev 1086-84. Caracas, Venezuela. Pp. 1-4. 1984.
- [5] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). **Alimentos. Identificación y Preparación de Muestras para el Análisis Microbiológico.** 1ª Rev. 1126-89. Caracas, Venezuela. Pp. 1-7. 1989.
- [6] DELGADO, A.; VALLS, J.; TOMÉ, E. Evaluación de aminos biógenas, microbiológica y sensorial de sardina (*Sardinella aurita*) durante su almacenamiento en hielo. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** X (6): 494-502. 2000.
- [7] GARRITY, G. Introductory essays. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** 2ª Ed. Michigan, United State of America. Springer Editorial. Vol. 2. Pp. 587-606. 2005.
- [8] GOUYGOU, J.; SINQUIN, C.; DURAND, P.D. High pressure liquid chromatography determination of histamine in fish. **J. Food Sci.** 52 (4): 925-927. 1987.
- [9] GRAÜ, C.; SÁNCHEZ, D.; ZERPA, A.; VALLENILLA, O.; BERTI, O. Estudio de la microflora asociada a la formación de histamina en sardina (*Sardinella aurita*). **Rev. Científ. FCV-LUZ.** XIII (3): 199-204. 2003.
- [10] GREIF, G.; GREIFOVA, M.; KAROVICOVA, J. Effects of NaCl concentration and initial pH value on amine biogenic formation dynamics by *Enterobacter* spp. bacteria in model condition. **J. Food and Nut. Res.** 45 (1): 21-29. 2006.
- [11] IZQUIERDO, P.; TORRES, G.; ALLARA, M.; MÁRQUEZ, E.; BARBOZA, Y.; SÁNCHEZ, E. Análisis proximal, contenido de aminoácidos esenciales y relación calcio/fosforo en algunas especies de pescado. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** IX (2): 95-100. 2001.
- [12] KANKI, M.; YODA, T.; TSUKAMOTO, T; BABA, E. Histidine decarboxylases and their role in accumulation of histamine in tuna and dried saury. **App. Env. Microbiol.** 73: 1467-1473. 2007.
- [13] KIMURA, B.; TAKAHASHI, H.; HOKIMOTO, S.; TANAKA, Y.; FUJII, T. Induction of the histidine decarboxylase genes of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (formally *P. histaminum*) at low pH. **J. Appl. Microbiol.** 107 (2): 485-97. 2009.
- [14] MHANGO, M.; MPUCHANE, S.; GASHE, B. Incidence of indicator organisms, opportunistic and pathogenic bacteria in fish. **Afric. J. Food Agric. Nut. Devel.** 10 (10): 4202-4208. 2010.

- [15] MILLÁN, R.; IZQUIERDO, P.; ALLARA, M.; TORRES, G.; GARCÍA, A.; BARBOZA, Y. Efecto de la Temperatura y Tiempo de Almacenamiento sobre la Calidad Microbiológica y la Producción de Histamina en la Lisa (*Mugil curema*). **Rev. Científ. FCV-LUZ**. XIII (5): 339-346. 2003.
- [16] MOAT, A.; FOSTER, J.; SPECTOR, M. Biosynthesis and metabolism of amino acids. **Microbial Physiology**. 4<sup>th</sup> Ed. New York, United States of America. Wiley-Liss, Inc. Pp. 195, 513, 514, 616. 2002.
- [17] MORILLO, N.; FINOL, M.; VALERO, K.; SOTO, A. Evaluación bacteriológica y organoléptica en dos especies de pescado del Lago de Maracaibo, Venezuela. **Vet. Trop.** 30 (2): 61-82. 2005.
- [18] NIVEN, C.; JEFFREY, M.; CORLETT, D. Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. **Appl. Env. Microbiol.** 41 (1): 321-322. 1981.
- [19] ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO). **Estado Mundial de la Pesca y la Agricultura 2008**. Roma, Italia. Pp. 3, 43. 2009.
- [20] SPSS®Statistics, versión 19 (SPSS Inc., 2010).
- [21] TAYLOR, S.; SPECKHARD, M. Isolation of Histamine-Producing Bacteria from Frozen Tuna. College of Agric. Life Sci. University of Wisconsin, Madison. **Food Microbiol. Toxicol. Food Sci.** 45 (4-6): 35-39. 1983.
- [22] THADHANI, V.; JANSZ, E.; PEIRIS, H. Effect of exogenous histidine and *Garcinia cambogia* on histamine formation in skipjack (*Katsuwonus pelamis*) homogenates. **Internat. J. Food Sci. Nutr.** 53:29-34. 2002.
- [23] TORRES, G.; IZQUIERDO, P.; ALLARA, M.; GARCÍA, A. Efecto de la temperatura y tiempo de almacenamiento sobre el crecimiento de bacterias productoras de histamina en dos especies de pescado: Lisa (*Mugil curema*) y Róbalo (*Centropomus undecimalis*). **Rev. Científ. FCV-LUZ**. XIII (4): 263-268. 2003.
- [24] TORRES, G.; IZQUIERDO, P.; MÁRQUEZ, E.; SÁNCHEZ, E.; BARBOZA, Y. Efecto de la temperatura y el tiempo sobre la carga bacteriana, concentración de histidina libre y la producción de histamina en el músculo de la corvina (*Cynoscion maracaiboensis*). **Rev. Científ. FCV-LUZ**. X (2): 130-135. 2000.
- [25] VALLENILLA, O.; ALIÓ, J.; MÁRQUEZ, S. Comercialización del pescado en Cumaná. **INIA Divulga**. 12: 15-18. 2009.
- [26] VECIANA, M.; BOVER, S.; MARINÉ, A.; VIDAL, M. Biogenic amine production by *Morganella morganii* and *Klebsiella oxytoca* in tuna. **Eur. Food Res. Tech.** 218: 284-288. 2004.
- [27] WAUTERS, G.; AVESANI, V.; CHARLIER, J.; JANSSENS, M.; DELMÉE, M. Histidine decarboxylase in *Enterobacteriaceae* Revisited. **J. Clin. Microbiol.** 42 (12): 5923-5924. 2004.
- [28] YAGOUB, S. Isolation of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas spp.* from raw fish sold in fish market in Khartoum state. **J. Bacteriol. Res.** 1 (7): 085-088. 2009.
- [29] YOSHINAGA, D.; FRANK, H. Histamine Producing Bacteria in Decomposing Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*). **Appl. Env. Microbiol.** 44 (2): 447-452. 1983.