

Acción bactericida del cloruro de plata y cloruro de sodio en filetes de pescado.

MARIA ESTELA AYALA GALDOS, JORGE SANCHEZ HERNANDEZ

Instituto Tecnológico Pesquero del Perú. Carretera a Ventanilla Km 5200. Callao 1.
Apartado Postal 0360

Palabras Clave: Bactericida, inóculo, mesófilos, psicrófilos.

RESUMEN

Se investigó la acción microbicida de soluciones de cloruro de plata y cloruro de sodio (CPS) como solución de lavado por inmersión de filetes de lisa (*Mugil cephalus*) y caballa (*Scomber japonicus peruanus*) a tres concentraciones : 0.1 y 30 mg/l (M1), 0.2 y 60 mg/l (M2) y 0.3 y 90 mg/l (M3) de cloruro de plata y sodio respectivamente.

La población bacteriana psicrófila y mesófila fue específicamente reducida entre rangos de >1 y $2 < \log_{10}$ UFC/g, resultando de mayor eficacia los tratamientos M2 y M3. Los indicadores de contaminación fecal más sensibles fueron los estreptococos. Ninguno de los tratamientos con CPS fueron efectivos para muestras previamente inoculadas con los patógenos *Vibrio cholerae* y *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

The current study was developed to evaluate microbicide effect of silver an sodium chloride (SSC) when used as immersion solution with some fish species: lisa *Mugil cephalus* and caballa *Scomber japonicus peruanus*. Concentrations of SSC were 0.1 and 30 mg/l (M1), 0.2 and 60 mg/l (M2) and 0.3 and 90 mg/l (silver and sodium chloride).

Psychrophilic and mesophilic counts were significantly reduced between >1 and <2 \log_{10} CFU/g when using Treatments M2 and M3. The more sensitive faecal indicators were the streptococci group. None of the treatments were able to inhibit pathogenic bacteria previously inoculated *S. aureus* and *V. cholerae*.

INTRODUCCION

La aplicación de criterios higiénico sanitarios es de gran importancia en las etapas previas al consumo de un alimento, con mayor razón si se trata de productos de la pesca.

Considerando la forma de expendio de las especies hidrobiológicas así como las prácticas

inadecuadas de manipuleo y preservación, áreas de pesca contaminadas, etc., es importante plantear alternativas que permitan mejorar la calidad higiénico sanitaria de estos productos mediante la reducción de la incidencia de microorganismos patógenos. La aplicación de sustancias desinfectantes es una de las alternativas para reducir niveles de contaminación.

Existen referencias sobre el uso efectivo de iones de plata en concentraciones de 0.02, 0.04 y 0.08 mg/l en sistemas de desinfección de agua (13). Muchos de los productos usados comercialmente para purificar agua contienen cloruro de plata y sodio (CPS) en virtud de sus efectos microbicidas (14).

Por otro lado, las bacterias tienen una gran capacidad de adsorber metales de una solución gracias a su interfase celular estrictamente física. En algunos estudios referentes a adsorción de metales se encontraron iones de plata en el citoplasma muy cerca a la membrana y que posiblemente implicarían la falta de viabilidad en las bacterias (17).

En el presente trabajo se publican resultados de los experimentos realizados con filetes de pescado sometidos a lavados por inmersión en soluciones de CPS a fin de evaluar la acción bactericida de esta solución y su eficacia en la reducción del número de bacterias psicrófilas y mesófilas, incluyendo patógenos tales como coliformes y estreptococos comúnmente presentes en el producto. Así mismo se investigó la acción frente a los microorganismos *Vibrio cholerae* y *Staphylococcus aureus*, los cuales fueron previamente inoculados en las muestras.

En algunos trabajos sobre desinfección se menciona la importancia de evaluar la capacidad de los desinfectantes para inactivar microorganismos en presencia de sustancias orgánicas (12). Tal es el caso del hipoclorito de sodio cuya eficacia se reduce en presencia de leche, lo que sugiere cierto efecto de neutralización del desinfectante por la materia orgánica (2). Se ha reportado además que el *Aphanizomenon flos aquae* es considerablemente menos sensible al cobre en presencia de EDTA o de sedimentos (5). Otro ejemplo del efecto de la presencia de material orgánico sobre la acción de desinfectantes es la restauración de la actividad emulsificante en el *A. calcoaceticus* en presencia de moléculas proteicas y de polisacáridos (8).

Descripción de las Muestras. Las muestras utilizadas fueron filetes de lisa (*Mugil cephalus*) y filetes de caballa (*Scomberus japonicus peruanus*) de 90 ± 5 gramos de peso.

Preparación de los Inóculos.
Staphylococcus aureus: Cepa de la colección de bacterias del Laboratorio de Microbiología del ITP, la cual se sembró en caldo Giolitti Cantoni incubando a 37 °C durante 24 horas. La cantidad inoculada en cada filete fue de 1 ml procedente de la dilución 10^{-3} y correspondiente a 2×10^6 UFC/ml.

V. cholerae el Tor grupo 01: cuyas características bioquímicas, comportamiento serológico y aglutinación en látex, fueron evaluados en el Laboratorio de Microbiología del ITP. Para la preparación del inóculo la cepa fue sembrada en Agua Peptonada Alcalina (APA) incubando a 37 °C durante 4 horas. A partir de este cultivo se realizó diluciones hasta de 10^{-4} , de donde se tomó un inóculo de 1 ml equivalente a un número de células de 1×10^6 UFC/ml, esta cantidad se agregó a cada filete utilizando una pipeta serológica y distribuyéndolo en forma uniforme sobre la superficie de la muestra.

Tratamiento con solución de cloruro de plata y sodio (CPS): Inmersión de las muestras durante 5 minutos en la solución a diferentes concentraciones. La proporción de materia prima y solución de CPS fue 3 a 2. Las concentraciones fueron:

- M1 = 0.1 mg/l de plata y 30 mg de ClNa
- M2 = 0.2 mg/l de plata y 60 mg de ClNa
- M3 = 0.3 mg/l de plata y 90 mg de ClNa.

Pruebas microbiológicas (Según metodología de la Asociación Americana de Analistas Químicos (AOAC) (1 y 3):

- Recuento total de aerobios psicrófilos y mesófilos
- Recuento de Coliformes (Número más Probable)

- Recuento de *Streptococcus* (Número más Probable)
- Detección de *Staphylococcus aureus*
- Para la detección de *Vibrio cholerae* grupo 01 se utilizó la metodología recomendada por el Instituto de Salud Pública y Ciencia Ambiental de Osaka (3,16 y 19)

Análisis de datos. La reducción de la carga bacteriana fue determinada mediante la ecuación de Hoff:

$$K = - 2.3 [\log_{10} (Co - Ct)/T] \quad (10)$$

donde Co y Ct son las concentraciones bacterianas inicial y final respectivamente y T es el tiempo de exposición del desinfectante en minutos (2,10)

La representación de los gráficos y la evaluación estadística de los resultados obtenidos se realizaron utilizando programas computarizados Harvard Presentation Graphics y Microsta.

RESULTADOS Y DISCUSION

Reducción de Psicrófilos. Los recuentos iniciales de microorganismos psicrófilos en lisa fueron del orden de 1.3×10^6 UFC/g. En la Figura 1 se puede apreciar el efecto de reducción de la carga microbiana al utilizar los tratamientos con soluciones de CPS. Así, la aplicación de M1 redujo las cargas iniciales a 1×10^6 UFC/g, el tratamiento M2 logró reducciones de 2.5×10^5 UFC/g y M3 hasta de 1.6×10^5 UFC/g. Estos valores constituyeron reducciones de 20%, 80% y 87% respecto a la carga inicial.

En la especie caballa, 1.5×10^5 UFC/g fue el recuento inicial de psicrófilos, en tanto que los recuentos obtenidos luego de aplicar los tratamientos registraron 1.2×10^5 UFC/g para M1, 5×10^3 UFC/g para M2 y 2×10^3 UFC/g para M3, recuentos que en términos de porcentajes de reducción, fueron equivalentes a 20%, 97% y 99%.

De los resultados obtenidos para carga psicrófila en ambas especies se puede observar

que al compararlos con el Control, los tratamientos con CPS fueron efectivos, ($P < 0.01$) y que tanto M2 como M3 lograron mayores niveles de reducción que M1. Esta observación se confirmó analizando los valores promedio de reducción K para los tres tratamientos, estos valores fueron 0.023, 0.322 y 0.460 en lisa y 0.046, 0.713 y 0.874 en caballa (Tabla 1).

TABLA 1. Valores de inactivación (K) de Crecimiento Bacteriano

| Tratamiento | Valor K | |
|--------------------|---------|---------|
| | Lisa | Caballa |
| Psicrófilos | | |
| M1 | 0.023 | 0.046 |
| M2 | 0.322 | 0.713 |
| M3 | 0.460 | 0.874 |
| Mesófilos | | |
| M1 | 0.046 | 0.115 |
| M2 | 0.253 | 0.667 |
| M3 | 0.460 | 0.782 |

Reducción de Mesófilos. En la Figura 2 se ilustra el efecto de los tratamientos sobre el crecimiento de mesófilos. El recuento inicial en lisa fue de 1.3×10^5 UFC/g y luego de aplicar los tratamientos con M1, M2 y M3 este valor se redujo a 1×10^5 UFC/g, 4×10^4 UFC/g y 2×10^4 UFC/g para cada caso.

Las muestras de caballa presentaron valores de 4×10^4 UFC/g como carga inicial y luego de aplicados los tratamientos M1, M2 y M3: 2.5×10^4 UFC/g, 1.2×10^3 UFC/g y 1×10^3 UFC/g respectivamente.

Las reducciones de mesófilos significaron porcentualmente, para lisa y caballa 20% y 35.5% aplicando el tratamiento M1, 78% y 90% con M2 y finalmente 84% y 97% utilizando M3.

Los valores K correspondientes a las reducciones de mesófilos fueron de 0.046, 0.253 y

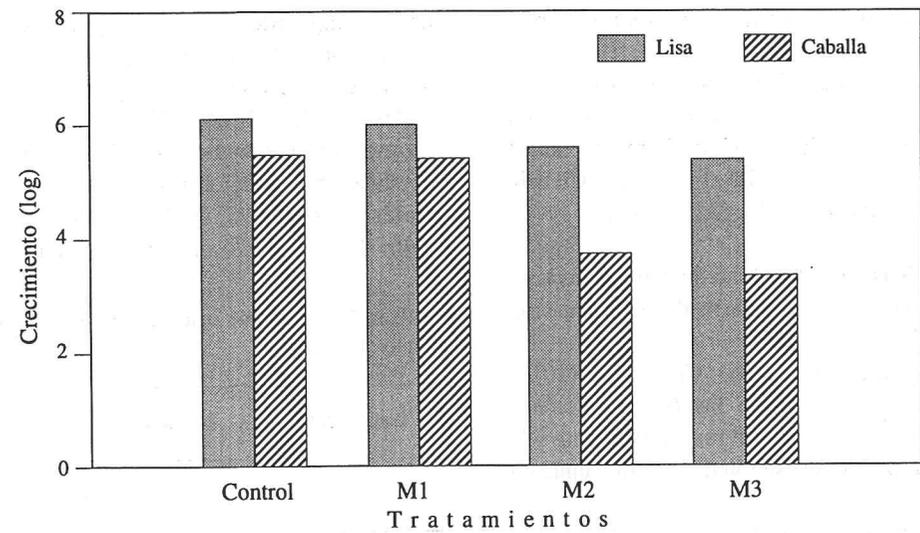


Figura 1. Efecto del tratamiento con solución de CPS sobre el Crecimiento de Psicrófilos.

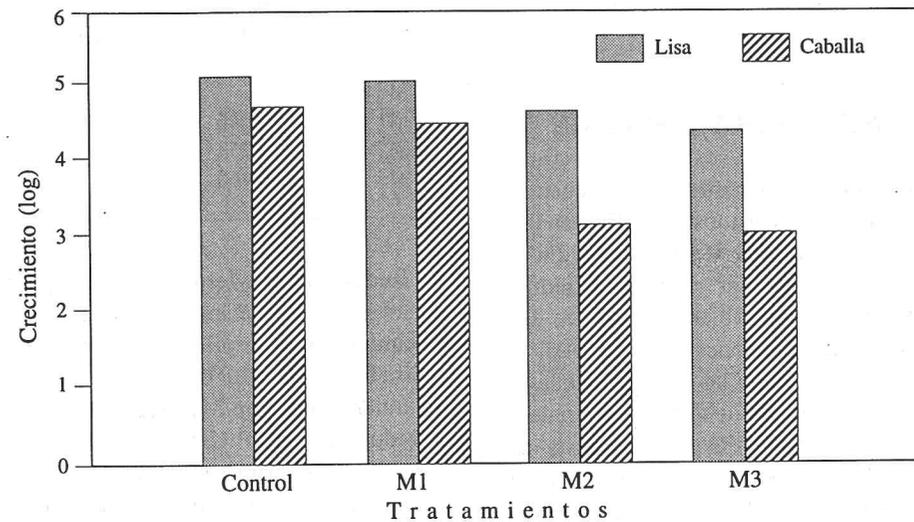


Figura 2. Efecto del tratamiento con solución de CPS sobre el Crecimiento de Mesófilos.

0.460 en lisa y 0.115, 0.667 y 0.782 en caballa al aplicar los tratamientos M1, M2 y M3 respectivamente. Estos valores K demostraron un patrón similar al observado en la reducción de psicrófilos. Se encontraron diferencias estadísticas ($P < 0.01$) en el efecto de los tratamientos entre sí, demostrando un mayor efecto de reducción, al aplicar los tratamientos M2 y M3. Para los tres tratamientos evaluados, los

valores K para psicrófilos y mesófilos en caballa superaron en más de dos veces los correspondientes en lisa ($P < 0.01$) ésto parecería indicar un mayor efecto de descontaminación en las muestras de caballa.

En ambas especies se observó predominancia de los recuentos de psicrófilos respecto a mesófilos, lo cual a su vez concuerda con el modelo de distribución de flora bac-

teriana en especies marinas en el Perú (4).

Respecto al efecto de los tratamientos sobre los tipos de cargas psicrófila y mesófila en ambas especies, se observaron valores de reducción ligeramente mayores en psicrófilos, aunque estadísticamente no existieron diferencias significativas ($P < 0.01$). Al comparar el efecto de los tratamientos M1, M2 y M3 entre sí, sobre la reducción de la carga microbiana psicrófila y mesófila en ambas especies, los análisis estadísticos reflejaron la existencia de diferencias significativas entre éstos a nivel de $P < 0.05$, por lo cual se consideró los tratamientos M2 y M3 de mayor eficacia en la reducción de ambos grupos bacterianos.

Reducción de Coliformes y Estreptococos.

La Figura 3 muestra la reducción de coliformes ante el efecto de los tratamientos aplicados. Así, para las especies analizadas, se observaron porcentajes de reducción del 20% y 19% ante el tratamiento M1, 50% y 44% ante M2 y ante M3 51% y 42%.

En la figura 4, la numeración de estreptococos presentó evidente reducción, ante el tratamiento M1 fue de 22.5% y 15%, ante M2 64% y 69% y del 67.5% y 72% ante M3 para lisa y caballa respectivamente.

Al observar las Figuras 3 y 4 se puede apreciar la predominancia del número de coliformes respecto al de estreptococos, el análisis estadístico ($P < 0.01$) demostró el efecto de los tratamientos para ambos grupos, lo cual podría sugerir una mayor sensibilidad del grupo estreptococos ($P < 0.01$) respecto a la reflejada por los coliformes ($P < 0.05$); Respecto a este último grupo, existen referencias sobre la gran capacidad de resistencia a los desinfectantes en relación a interacciones con otros organismos acuáticos tales como copépodos, protozoarios y otros (10).

Es interesante destacar que la numeración de indicadores de contaminación fecal (coliformes y estreptococos), fue notoriamente mayor en lisa que en caballa, lo cual podría ser consecuencia de la zona de procedencia de cada especie: la lisa es una especie que habita cerca

a la zona del litoral costero, es bentónica y usualmente presenta altas cargas bacterianas.

Reducción de *S.aureus* y *V. cholerae*. En lo concerniente a los patógenos *S. aureus* y *V. cholerae*, los tratamientos aplicados no fueron capaces de inhibir su crecimiento. Estos resultados pueden estar relacionados con la adaptabilidad de estas bacterias para soportar altas concentraciones de iones de sodio, como lo observado en *V. cholerae* y su característica de halotolerancia (6,11,13). La presencia de sodio como sustrato es importante en la captación de serina y en sistemas de transporte en especies moderadamente halofílicas como el *V. cholerae* y que contribuyen principalmente al control de su pH citoplasmático (Fig 4) (15,18). Esta resistencia a su vez depende de la capacidad del organismo a acumular solutos intracelulares en tales condiciones, tal es el caso del *S. aureus* que acumula glutamina, prolina y betaina en condiciones salinas, sustancias que actúan como osmoreguladoras, a excepción de la betaina de la cual sólo se sugiere su poder osmoprotector (20).

Cabe resaltar que toda actividad desinfectante se expresa en términos de reducción logarítmica (\log_{10}) de las cargas bacterianas. Así, una reducción de >3 y $4 < \log_{10}$ es considerada como un valor efectivo mínimo y sirve para discutir la eficacia de desinfección comparada con la reducción en UFC (2). De los resultados obtenidos para el presente estudio, los tratamientos aplicados lograron reducciones de >1 y $2 < \log_{10}$ UFC/g. Sin embargo, considerando que se trata de reducciones logarítmicas, estas diferencias podrían resultar de utilidad para estudios de descontaminación de productos pesqueros, en especial cuando se trabaja con especies que presentan elevados tenores bacterianos.

La literatura refiere que para estudios en desinfección existen factores influyentes tales como la fijación de los microorganismos a superficies, lo cual juega papel importante en la actividad de captación y fijación de nutrientes y en la resistencia a condiciones adversas, entre

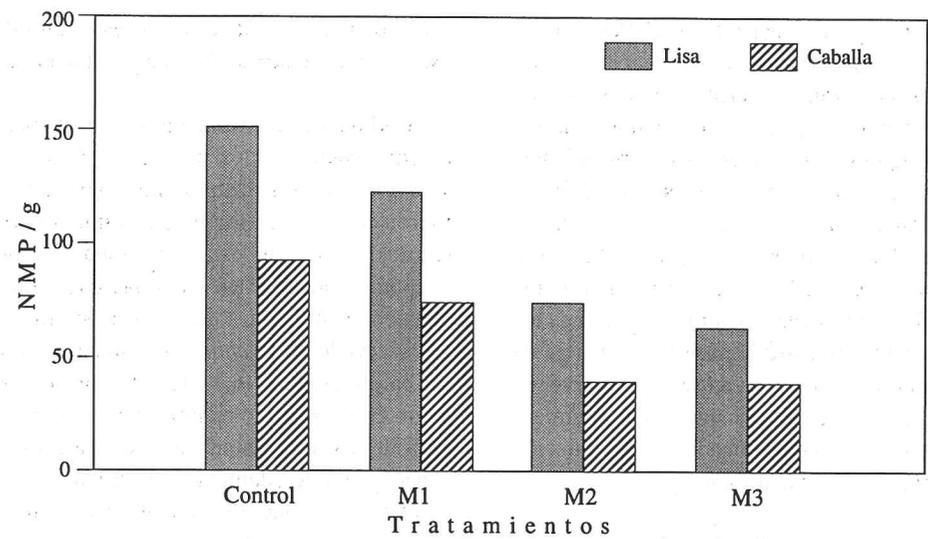


Figura 3. Efecto del tratamiento con solución de CPS sobre el Crecimiento de Coliformes.

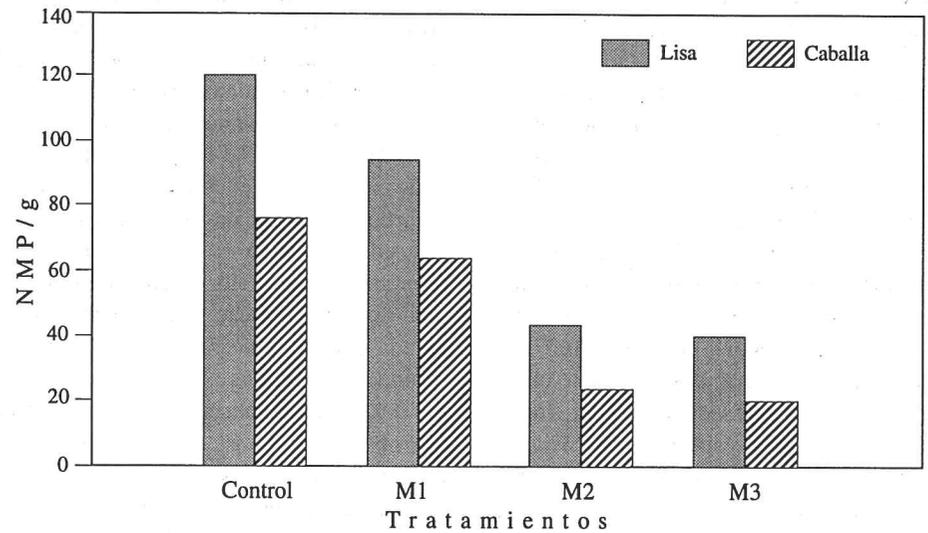


Figura 4. Efecto del tratamiento con solución de CPS sobre el Crecimiento de Estreptococos.

ellas, la clorinación. Un ejemplo es el caso de la epidemia de Muncie, Indiana, de cuyo estudio se determinó que la adición de elevados niveles de cloro en ambientes de elevada contaminación no fue efectiva (7,10).

Otro factor importante al evaluar la eficacia de un desinfectante es el tiempo de contacto

con el agente infeccioso (14), éste puede variar de menos de un minuto para superficies a varias horas en instrumentos y utensilios (2). Cabría la posibilidad de obtener mayor efecto ampliando el tiempo de inmersión en la solución desinfectante.

CONCLUSIONES

1. Se observó la acción microbicida de los tratamientos M2 y M3 en la reducción de carga bacteriana psicrófila y mesófila en pescado entre rangos de >1 y $2 < \log_{10}$ UFC. Los rangos de reducción mediante los tratamientos aplicados fueron menores que el valor efectivo mínimo de desinfección, sin embargo constituyen una alternativa para reducir la carga microbiana en productos pesqueros.

2. De lo anterior se sugiere que estos tratamientos podrían ser utilizados ampliando el tiempo de contacto ó en combinación con otros sistemas de preservación tales como la refrigeración.

3. En el caso de bacterias indicadoras de contaminación fecal, se observó que el grupo de estreptococos presentó mayor sensibilidad al efecto de los tratamientos aplicados respecto al grupo coliforme.

4. Las soluciones de cloruro de plata y sodio en las concentraciones aplicadas no tuvieron efecto sobre *V. cholerae* ni sobre *S. aureus*.

REFERENCIAS

1. Association of Official Analytical Chemists (1978) Bureau of Food Bacteriological Analytical Manual. Fifth Edition
2. Best M., Kennedy M. y Coates F. (1990). Efficacy of a Variety of Disinfectants against *Listeria spp.* Appl. Environ Microb. vol 56 N°2, p. 377-380.
3. Bryant R., Jaruis J. y Janda M. (1987). Use of Sodium Duodecylsulfate-polymyxin B-sucrose Medium for Isolation of *Vibrio* from shellfish. Appl. Environ. Microbiol. vol 53 p.1556-1559.
4. Carvajal G. y Gallo M. (1983). Flora Marina en Pescados de la Costa Peruana Desembarcados en Callao y Chorrillos. Bol. Inv. Inst. Tec. Pesq. Vol I (1):73-80.
5. Clarke S., Stuart J y Sanders J. (1987). Induction of Siderophore Activity in *Anabaena spp* and its Moderation of Copper Toxicity. Appl. Environ. Microb. vol 53, p.917-922.
6. Datta A. y Mac Quillan A. (1987). Salt Tolerance of Lactose Grown *V. Parahaemolyticus*, *E. coli* lac Genes. Appl. Environ. Microb. vol 53, p.466-469.
7. Herson D., Mc Gonigle B, Payer M. Baker K. (1987). Attachment as a Factor in the Protection of *Enterobacter* from Chlorination. Appl. Environ. Microb. vol 53, p.1178-1180.
8. Kaplan N., Zosim Z. y Rosenberg E. (1987). Reconstitution of Emulsifying Activity of *Acinetobacter calcoaceticus* Emulsan by Using Pure Polysaccharide and Protein. Appl. Environ. Microb. vol 53, p.440-446.
9. Kaysner Ch., Abeyta C., Wekell M. y De Paola A. (1987). Incidence of *V. cholerae* from Estuaries of the U.S.Coast. Appl. Environ. Microb. vol 53, p.1344-1348.
10. King C., Schotts E. et al. (1988). Survival of Coliforms and Bacterial Pathogens within Protozoa During Chlorination. Appl. Environ. Microb. vol.54, p.3023-3033.
11. Landeen L., Moyasar Y. y Gerba Ch. (1989). Efficacy of Copper and Silver ions and Reduced Levels of Free Chlorine of *Legionella pneumophila*. Appl. Environ. Microb. vol 55, p. 3045-3050.
12. LeChevallier M., Cawthon Ch. and Lee R. (1988). Factors Promoting survival of Bacteria in Chlorinated Water supplies. Vol 54: 649-654.
13. Lee K., Moyasar T. et al. (1989). Efficacy of Cupper and Silver Ions and Reduced Level of Free Chlorine in Activation of *Legionella*. Appl. Environ. Microb. vol.55, p.3023-3031.
14. Luck Erich. (1977). Conservación Química de los Alimentos Edit. Acribia. España. p. 65-73.
15. Mac L. (1968). On the role of Inorganic Ions in the Physiology of Marine Bacteria. Vol.I, p.95-126. Academic Press. London.
16. Massad G. y Oliver J. (1987). New Selective and Differential Medium for *V. cholerae* and *V. vulnificus*. Appl. Environ. Microb. vol 53, p.2262-2264.
17. Mullen M.D., Wolf D. y Ferris F. (1989) Bacterial Sorption of Heavy Metals. Appl. Environ. Microb. vol.55, p.3143-3149.
18. Nieto J. y Ventosa A. (1987). Susceptibility of *Halobacterium* to Heavy Metals. Appl. Environ. Microb. vol. 53, p.1199-1202.
19. Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences Department of Microbiology, Tokyo. Metropolitan Research Laboratory of Public Health, Japan.
20. Parchett R. Kelly A. Kroll R. (1992). Effect of Sodium Chloride on the Intracellular Solute Pools of *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. Vol 58: 3959-3969.

