

MICROBIOLOGIA DEL ENSILADO DE PESCADO*

A. ALVÁREZ, E. DÍAZ, L. GODOY, C. MUSETTI,
E. NOAIN, D. PELLEGRINO, L. RAMOS,
S. TRAVERSA y M. VILLAMIL

Bertullo y otros (1) informan sobre la preparación de un alimento rico en proteínas, mediante la fermentación de pescado y melaza. Con igual finalidad, Kreuzer y Boyes (2) y Kreuzer (3) utilizan melazas y un cultivo de bacterias lácticas. Olsson y Olofsson (4) utilizan melaza como aditivo en la preparación del ensilado de pescado en pequeña escala para raciones de cerdo.

Bertullo y otros (5) aíslan bacterias y levaduras como microorganismos responsables de esta fermentación, observando que las bacterias llevan la mezcla a un pH de 4,6-4,8, mientras que la levadura sólo alcanza un pH de 5,1, y este mismo autor plantea un proceso de preparar un ensilado de pescado-melaza mediante una levadura proteolítica.

Nilsson y Rydin (6) dentro de un completo estudio sobre métodos de ensilar alimentos de origen vegetal y animal, señalan que pueden obtenerse ensilados de primera calidad si se agrega al alimento una mezcla de cereales y una malta rica en enzimas. Ensilados de arenques o de bacalao preparados por este método fueron investigados bacteriológicamente por el Instituto de Salud Pública de Suecia y declarados inobjetables en lo que se refiere al consumo humano. Señalan además estos autores que la fermentación láctica que ocurre durante el pro-

* Cátedra de Microbiología Industrial, Facultad de Química, Montevideo, Universidad de la República.

Presentado en el V Congreso Latinoamericano de Microbiología, Punta del Este, diciembre 5-11, 1971.

ceso aparenta ser tan dominante, que elimina el crecimiento de microorganismos tales como los clostridios; este hecho fue medido por el bajo porcentaje de ácido butírico en el ensilado terminado.

Wirahadikusmah (7) usando el mismo método de ensilar y en experimentos de infección con *Clostridium botulinum* tipo E, observó que cuando la inoculación se realiza al comienzo de la fermentación, los clostridios son destruidos durante el proceso subsiguiente. Por el contrario, si la inoculación se realiza en el ensilado ya pronto, los clostridios permanecen viables luego de cuarenta días. Este autor señala, además, que el ensilado es tóxico cuando es inoculado al principio o después de terminada la fermentación con más de 10^5 esporas puras por gramo. Este autor concluye que en la aplicación práctica de ensilar deben ser descartados todos los pescados que presenten condiciones organolépticas inapropiadas.

Este autor además aísla del ensilado bacterias lácticas: una sulfito reductora, el *L. fermenti* (capaz de hidrolizar el almidón) junto con *L. brevis* y *St. faecalis*.

Jay (8) señala que la mayoría de los brotes de *Clostridium botulinum* tipo E en Japón han sido causados por una comida "izushi" que es preparada a base de pescado, arroz y arroz malteado y que sufre una fermentación láctica.

El presente trabajo tiene por finalidad conocer las bases microbiológicas y bioquímicas del ensilado de pescado-melaza.

MATERIAL Y METODOS

Ensilado de pescado

Las muestras de pescado (corvina: *Micropogon opercularis*) fueron adquiridas en las condiciones en que se libra al consumo humano y empleadas inmediatamente.

El pescado entero sin cabeza y sin cola (pero con vísceras y escamas) es molido en una máquina de picar carne con agujeros de 4 mm. de diámetro. Se mezcla el pescado molido con melaza de remolacha (450 g./kg. de sacarosa), de modo que la mezcla contenga entre 20 y 40 kg. de melaza por 100 kg. de mezcla. Esta se hace manualmente lo mejor posible, y se intro-

duce en frascos de boca ancha de 10 cm. de diámetro por 25 cm. de alto. Se llenan hasta sus $\frac{3}{4}$ partes (alrededor de 1 kg. por ensayo) porque hay un aumento considerable de volumen por desprendimiento gaseoso durante el período inicial del proceso. Los frascos se tapan con films de polietileno, sin adoptarse otras precauciones para conservar las condiciones anaeróbicas.

Los procesos se realizan a 30° C. ó 50° C., agitándose periódicamente para homogeneizar el producto y facilitar el desprendimiento de gases.

Control del proceso

Se mide periódicamente el pH, se anota la consistencia y el olor. Este no debe indicar una putrefacción, sino que un olor "sui generis", indica una evolución correcta del ensilado.

La observación microscópica (Gram y contraste de fases) permite seguir la evolución de los microorganismos que se desarrollan. Los contajes directos (en cámaras del tipo cuenta glóbulo) se han realizado en algunas experiencias.

Para el estudio de los microorganismos viables existentes se han realizado plaqueos de alícuotas preparadas así: 2 g. de ensilado se mezclan con 18 ml. de peptona 0,1 % estéril y se agita por 5 minutos en agitador mecánico. Se deja decantar, se hacen diluciones seriadas y se plaquea. La composición de los medios usados en los distintos plaqueados se da en el cuadro 1.

Caracterización de bacterias lácticas

Las bacterias que crecen en el medio selectivo para lactobacilos, catalasa y Gram +, son consideradas bacterias lácticas. Estas bacterias se mantienen por picado en tubos con medio de igual composición al utilizado en el aislamiento y son caracterizadas siguiendo el método de Pederson y Albury (9).

Determinación del a_w del ensilado luego de terminada la fermentación

El a_w fue medido usando el método isopiéstico [Scott, W. J. (10)], es decir, poniendo la sustancia problema (aproxima-

Cuadro 1

Composición de los medios usados en la aislación
y recuento de microorganismos del ensilado de pescado-melaza *

Medio	Totales viables	Bacterias lácticas	Sulfito reductoras	Hongos y levaduras	Productores de ácido
pH	7,0	5,5	7,0	3,5	6,5
Peptona g/l	5	10	10	—	—
Extracto de levadura g/l ..	2,5	5	1,5	—	2,5
Glucosa g/l	1	1	0,5	10	15
Extracto de carne g/l	3	—	10	3	—
Triptona g/l	—	—	—	3	5
Cloruro de sodio g/l	—	5	—	10	—
Hidrolizado de caseína ml/l	—	5	—	—	—
Jugo de tomate ml/l	100	100	—	—	100
Almidón soluble g/l	—	—	1	—	—
Acetato de sodio 2H ₂ O g/l	—	—	5	—	—
L-cisteína g/l	—	—	0,5	—	—
Sulfito de sodio g/l	—	—	0,4 (1)	—	—
Citrato férrico g/l	—	—	0,7 (1)	—	—
Acido tartárico	—	—	—	(2)	—
Otros agregados	—	—	—	—	(3)
Agar g/l	15	15	10	15	—

* Según Sharf (1966), Manual Difco (1963), Gibbs y Frame (1965) y Pederson y Albury (1963).

- (1) En el momento de usar se agregan volúmenes iguales de soluciones estériles de estas sales, de modo de obtener al final la concentración indicada en el cuadro.
- (2) En el momento de usar se agrega al agar fundido solución estéril de ácido tartárico al 10%, de modo de obtener un pH final de 3,5.
- (3) Se le agregan: a) 5 ml de solución conteniendo 10% de K₂HPO₄ y 10% de KH₂PO₄; b) 5 ml de solución conteniendo 4% de MgSO₄·7H₂O, 0,2% NaCl, 0,2% FeSO₄ y 0,2% MnSO₄·4H₂O.

La composición de los medios está algo modificada en relación a la descripción original de éstos.

damente 30 g.) frente a muestras de aproximadamente 1 ml de soluciones de ácido sulfúrico de diferentes a_w conocidos, en un recipiente hermético a 30° C. y determinando, luego de establecer el equilibrio, cual es la solución de ácido sulfúrico que no pierde ni gana peso.

Ensayo toxicológico del ensilado (Wirahadikusumah)

Cincuenta g. de ensilado se mezclan con 250 ml de agua destilada estéril, se ajusta su pH a 6,2 y se agita por 5 minutos en agitador mecánico. La mezcla se centrifuga a 8.000 r.p.m.

por 10 minutos. El sobrenadante limpio se ensaya frente a ratones adultos (aproximadamente 20 g. cada uno) por tres métodos diferentes: inyección intraperitoneal, dándosele como bebida y mezclándolo con la ración sólida utilizada como alimento.

RESULTADOS Y DISCUSION

En el cuadro 2 se observa que, independientemente de la concentración de melaza, dentro de las concentraciones estudiadas, pueden obtenerse buenos ensilados, a juzgar por su olor, tanto a 30° C. como a 50° C. En general los ensilados llevados a cabo a 50° C. son más líquidos que a 30° C. y tienen un pH final más alto.

Cuadro 2

pH final, olor y consistencia de ensilado de pescado-melaza a diversas concentraciones de melaza y a dos temperaturas

Kgs. de melaza	Temperatura ° C.	pH final	Olor	Consistencia
100 Kgs. de mezcla				
88.5	30	4.6	Bueno	Pastoso
28.5	30	4.5	Bueno	Pastoso
20.0	30	4.6	Bueno	Semilíquido
88.5	50	6.9	Bueno	Líquido
28.5	50	5.2	Bueno	Líquido
20.0	50	5.5	Bueno	Líquido

Se elige para este trabajo la temperatura de 30° C., dado que se obtienen pH más bajos. La concentración elegida de melaza, es de 20 kg. de melaza/100 kg. de mezcla.

Los resultados del cuadro 3 así como la observación microscópica, permite concluir que las levaduras no tienen importancia en el proceso y que por lo tanto su inoculación es innecesaria, y del cuadro 4, que la fermentación responsable de los cambios que se producen al ensilar pescado-melaza corresponde a una fermentación láctica típica. Los cambios microbiológicos y de pH observados durante una fermentación particular se describen en el cuadro 5.

Cuadro 3

Recuento de microorganismos que crecen en medio selectivo* para hongos y levaduras y porcentaje de hongos y levaduras

Hongos y levaduras/g	Porcentaje de hongos y levaduras
4×10^5	1×10^{-2}
3×10^5	1×10^{-3}
1×10^7	5×10^{-4}

* Se elige el día en que se observe el número máximo de microorganismos viables totales/g y se calcula:

$$\text{Porcentaje de hongos y levaduras} = 100 \times \frac{\text{Microorganismos que crecen en medio selectivo de hongos y levaduras/g en ese día}}{\text{Número total máximo de microorganismos/g}}$$

Cuadro 4

Recuento de microorganismos viables totales,* de microorganismos que crecen en medios de cultivo selectivos para bacterias lácticas y porcentaje de bacterias lácticas en tres presentaciones

Microorganismos viables totales/g	Microorganismos que crecen en medio selectivo para bacterias lácticas/g	Porcentaje de bacterias lácticas
1.7×10^9	1.2×10^9	67
2.0×10^9	1.0×10^9	50
4.0×10^9	3.0×10^9	75

* Se elige el día en que se observa el número total de microorganismos viables totales/g y se calcula:

$$\text{Porcentaje de bacterias lácticas} = 100 \times \frac{\text{Microorganismos que crecen en medios selectivos para bacterias lácticas/g}}{\text{Número total viable máximo/g}}$$

A dos días de iniciada la fermentación el pH cayó a 5,6, alcanzando un pH final de 4,7 al cabo de 4 días.

Especies similares a *Leuconostoc mesenteroides* son responsables de los cambios en los 4 primeros días de la fermentación

Cuadro 5

**Cambios microbiológicos
durante el curso de una fermentación típica pescado-melaza**

Tiempo en días	pH	Totales $\times 10^6$	Lactobacilos $\times 10^6$	Número estimativo de cada especie de bacterias $\times 10^6$		
				L. mesenteroides	L. brevis	L. plantarum
0	6.7	2	0.1			
1	7.2	300	2	1.6		
2	5.6	4000	3000	2750	250	
4	4.8	3000	3000	1700	750	
7	4.7	500	500			500
13	4.6	600	400			400

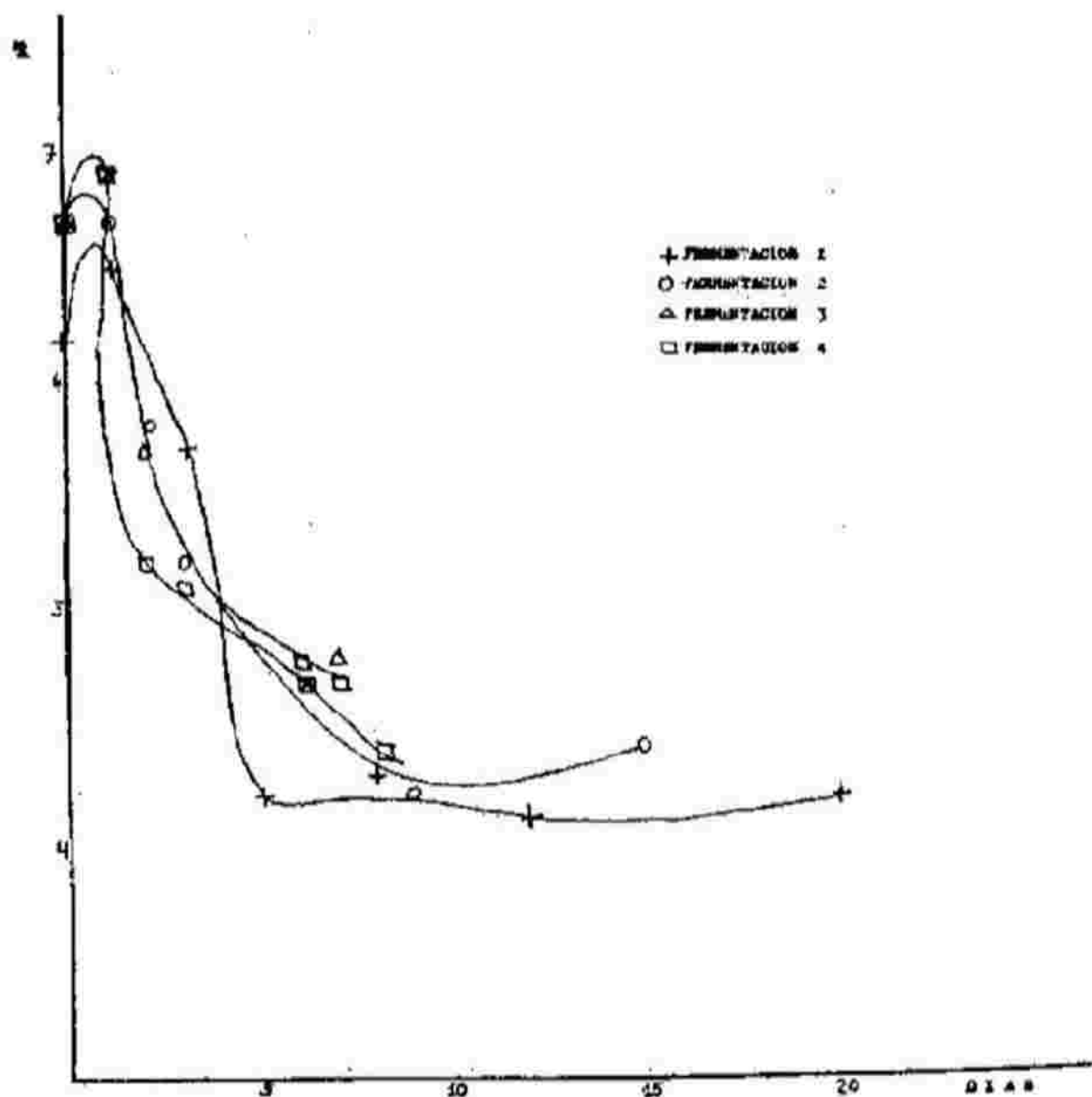


Fig. 1.—Cambios de pH en distintas fermentaciones.

caracterizado por un fuerte desprendimiento gaseoso. Se obtienen picos de 2750×10^8 bacterias por g. durante este período.

Especies similares a *L. brevis* aparecen también durante esta primera etapa de la fermentación, pero no juegan, numéricamente, un rol muy importante.

A pH 4,8 (luego de los 4 días) ocurre un marcado cambio en la flora apareciendo, predominantemente, especies similares a *L. plantarum* y observándose simultáneamente una disminución marcada en el conteo de bacterias lácticas.

Debe señalarse que la identificación de las cepas aisladas en el presente trabajo (cuadro 5) es solamente provisoria, dada las limitaciones de los parámetros usados en el esquema de clasificación de Pederson y Albury, y sirve al solo objeto de dar una idea general del proceso.

Con referencia a los cambios de pH observados en el presente trabajo (fig. 1, cuadros 5 y 7), éste decrece aproximadamente de 6,6 a 5,5 luego de dos días de preparado del ensilado y a un pH final de 4,2-4,5 luego de 8 días de ensilar.

Esta caída de pH, si bien es similar a la observada por Wirahadikusumah, es algo más lenta y se obtiene un pH final ligeramente superior al valor de 4,2 anotado por este autor.

Los datos del cuadro 6 y figura 2 permiten observar que hay una estrecha relación entre el número de sulfito reductores máximo durante la fermentación y la contaminación inicial en

Cuadro 6

**Evolución del NMP/ de sulfito reductores
en una fermentación típica**

	Fermentación 1		Fermentación 2		Fermentación 3		Fermentación 4	
	NMP g	pH	NMF g	pH	NMP g	pH	NMP g	pH
Inicial	40	6.2	> 11000	6.7	< 30	6.7	< 20	6.7
Máximo	> 11000	5.7	> 1000000	5.3	43000	6.9	210000	5.2
Final	< 30	4.4	110	4.4	< 30	4.8	< 30	4.4

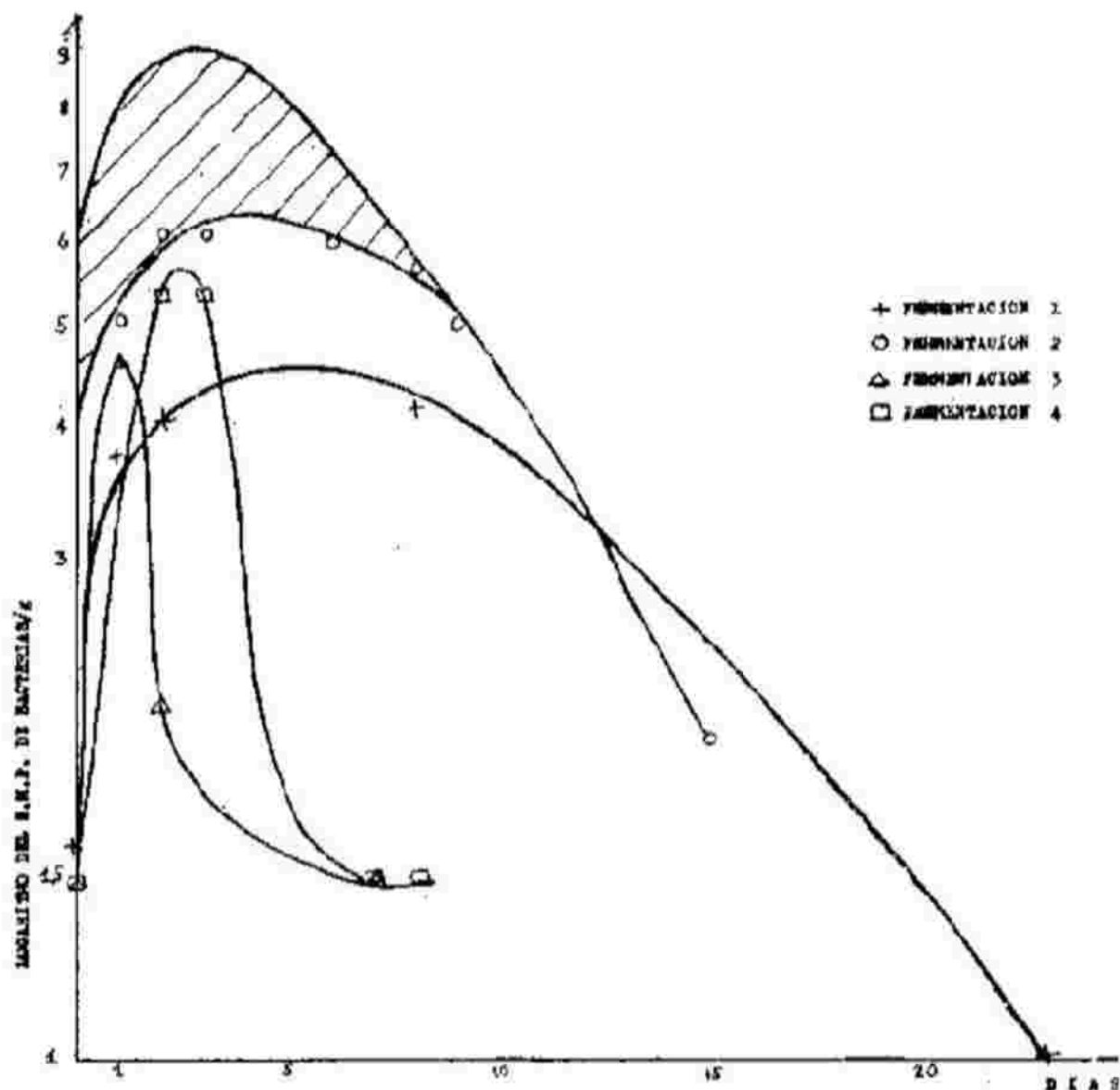


Fig. 2.—Variación del NMP/g de sulfito reductores en función del tiempo. En la fermentación N 2 los valores obtenidos fueron superiores a los previstos al hacer las diluciones. Por lo tanto se tomaron datos de Diaz y otros (1971) para suponer los valores máximos a que puede haber llegado la población. La zona sombreada representa el margen entre esos valores como máximo y los límites mínimos obtenidos por nosotros.

Cuadro 7

**Evolución del NMP/g de sulfito reductores
en una fermentación típica**

Tiempo	NMP/g	pH
0	< 20	6.7
1	43000	6.9
2	150	5.7
3	< 20	4.8

sulfito reductores. En el cuadro 7 se puede observar la variación del número de sulfito reductores durante la fermentación con un pescado de baja contaminación inicial.

En el cuadro 7, así como en la figura 2, se puede observar que cuando la carga inicial de sulfito reductores en el ensilado es baja, la evolución de la flora guarda estrecha relación con los cambios de pH, tendiendo a desaparecer a pH 4,5-4,8.

Por lo contrario, con altas contaminaciones iniciales (1×10^4 /g sulfito reductores), cuadro 6 y figura 2, hay un período largo de tiempo (6 días) durante el cual el número de sulfito reductores permanece alto (mayor de 1×10^6 /g) independientemente de la caída de pH.

Si bien no se ha identificado la flora sulfito reductora durante el presente trabajo, parte de esta flora resiste un shock térmico (13 minutos a 60°C.) y por lo tanto no se puede eliminar la posibilidad de que especies de *Cl. botulinum* se desarrollen durante la fermentación.

Es interesante destacar que Wirahadikusumah observa que se puede obtener toxificación del ensilado de pescado por *Cl. botulinum* tipo E cuando se inocula con 1×10^6 esporas/g de este organismo, y no toxificación con inóculos menores.

Si bien los ensayos toxicológicos realizados en este trabajo (cuadro 8) no permiten observar efecto tóxico en seis ensilados ensayados, un ensayo toxicológico debe incluirse en el proceso de elaboración industrial de este alimento dado la dificultad práctica de selección de la materia prima.

Cuadro 8

Ensayo toxicológico

Método	Ratones tratados	Sobrevivencias
Inyección intraperitoneal (0,5 ml)	18	100
Ingestión como bebida	12	100
Ingestión mezclada con alimento	12	100

Se ensayaron 3 muestras distintas de ensilados, obteniendo en todos el mismo resultado.

El a_w de 0,92 correspondiente al ensilado terminado (cuadro 9) así como el pH 4,2-4,5 serían los parámetros que determinarían la estabilidad microbiológica de este producto.

Cuadro 9

Valores de a_w en ensilados
luego de terminada la fermentación principal

Muestra	a_w medido	pH
1	0,92	4,9
2	0,92	5,0
3	0,90	6,9

Agradecimiento.— Los autores agradecen a los Sres. Dr. M. Cravino e Ing. Quím. Miguel A. Zunino (Cooper, McDougall & Robertson Ltd., San Ramón 757, Montevideo), quienes realizaron los ensayos toxicológicos del ensilado.

RESUMEN

Se describe una técnica para producir en ensayos de laboratorio (1 a 3 kg.) ensilados de pescado. Estos resultan de la mezcla de pescado molido con melaza (100:25) y fermentación espontánea posterior a 30 ó 50° C. El ensilado resultante es un líquido estable, de conservación indefinida, usado en la alimentación animal. Se estudió la microbiología del proceso a 30° C., determinándose que es, básicamente, una fermentación láctica típica, con predominio inicial de lactobacterias heterofermentativas [*Leuconostoc mesenteroides* (?) y *Lactobacillus brevis* (?)], durante los primeros días de tumultoso desprendimiento gaseoso, y homofermentativas al final. [*Lactobacillus plantarum* (?)]

El pH final (4,5-5,0) y la disminuida actividad del agua (a_w 0,92-0,93) explicarían suficientemente la estabilidad del ensilado obtenido.

Junto a la flora láctica predominante existe un desarrollo bacteriano paralelo variable según la calidad del pescado usado;

en especial se detectan bacterias sulfito reductoras, algunas esporuladas. Esto sugiere la necesidad de un ensayo toxicológico antes de su empleo como alimento.

El número de hongos y levaduras observado es despreciable; su introducción sería, por consiguiente, supérflua.

SUMMARY

A technique is described to produce laboratory scale fish silage (1-3 Kg). Fish silage is obtained by mixing minced fish and molasses (100:25) and spontaneous fermentation at 30-50° C. The resulting silage is a stable liquid, of undefined conservation, used in for animal feeding. The microbiology of the process at 30° C. was studied, determining that it basically consists of a typical lactic acid fermentation in which initially prevail heterofermentative lactic acid bacteria [*Leuconostoc mesenteroides* (?) and *Lactobacillus brevis* (?)] during the first days of gaseous tumultuous loosening, and at the end homofermentative [*Lactobacillus plantarum* (?)].

The final pH (4.5-5.0) and the low water activity would explain the stability of the silage.

Sulphite reducing bacteria, some sporulated, are detected together with the lactic acid bacteria and in variable number according to the quality of the fish used. This fact suggests the need of carrying out a toxicological assay before using them for feeding.

The number of yeast and moulds observed is low, therefore its inoculation in the fermentation would be superfluous.

BIBLIOGRAFIA

1. BERTULLO, V. H.; PEREZ-HETTICH, F.: Un nuevo alimento en el Uruguay. El ensilado de pescado. An. Fac. Vet. Montevideo, 6: 141, 1966.
2. KREUZER, R.; BOYES, T.: Untersuchungen zur Durchführung der Fischgarungsilage. Teil Die Saure und pH Wertbildung und ihre Beziehung zur Haltbarkeit und Qualität der Fischsilagen. Arch. F. Fischereiwissenschaft, 4: 57, 1952.
3. KREUZER, R.: Untersuchungen zur Durchführungen der Fischgarungsilage. Teil Der Ablauf Bakterieller und Chemischer Vorgänge bei der Silierung. Arch. Fischereiwissenschaft, 6: 47, 1954.



4. OLSSON, N.; OLOFSSON, N. E.: Forsök Rörade Fiskprodukternas Tillvara Tagande och Användbarhet som Foder för Hons och Kycklinger Statens Husdjursförmedd, 7: 1, 1942.
5. BERTULLO, V. H.: Hidrolizado o bioproteocatenolizado (BPC) de pescado para uso humano. Rev. Inst. Pesq. Montevideo, 1: 63, 1962.
6. NILSSON, R.; RYDIN, C.: Fermentation as a Means of Preserving Organic Materials. Act. Chem. Scand., 17: S 174, 1963.
7. WIRAHADIKUSUMAH, S.: Preventing Clostridium botulinum Type E. Poisoning and Fat Rancidity by Silage Fermentation. Lantbrukshögsk. Holand. Ar., 34: 551, 1968.
8. JAY, J. M.: Modern Feed Microbiology. Reinhold Book Corp. N.Y., 1970.
9. PEDERSON, C. S.; ALBANY, M.: The Sauerkraut Fermentation. Bull. N.Y. St. Agric. Exp., 824, 1969.
10. SCOTT, W. J.: Advances in Food. Ad. F. Resch., 7: 83, 1956.