

### **Contribución al estudio de las alteraciones del bacalao: rojo, etiología y métodos de lucha**

*Por F. Rejas García*

Como decíamos en una publicación anterior, decidimos hace tiempo, ante la importancia higiénica y económica de las alteraciones del bacalao, realizar un estudio sobre la etiología de estas alteraciones y sobre nuevos métodos de lucha profiláctica contra las mismas.

Vamos, en esta publicación, a dar cuenta de los resultados en contrados por nosotros sobre una de sus alteraciones más importantes, el rojo del bacalao.

El rojo del bacalao, es una alteración macroscópica de origen microbiano, de la superficie muscular del bacalao salado, que se manifiesta por una coloración rojiza de una extensión, profundidad, e intensidad variables con el grado de la alteración.

El rojo es probablemente la alteración más frecuente del bacalao, y sin ninguna duda la de mayor importancia higiénica y económica, pues a pesar de que no ocasiona trastornos su consumo, a no ser en alteraciones muy intensas, causa enormes pérdidas a la industria salazonera y a la del comercio del bacalao.

Desde finales del siglo pasado son numerosos los investigadores que se han formulado una doble pregunta: ¿Será el rojo corregible? ¿Es susceptible el rojo de profilaxia?

Las dos soluciones se han intentado en numerosas ocasiones para tratar de resolver el problema. La primera, tratamiento por la luz solar<sup>12</sup>, elimina el color de los productos alterados, pero no la alteración, ni la flora microbiana; simplemente las enmascara.

En cuanto a la segunda, se han intentado multitud de procedimientos, que en su momento analizaremos, con diversa fortuna.

## ETIOLOGIA

La etiología del rojo, a pesar de los numerosos estudios realizados sobre la misma, no está perfectamente aclarada. Y así podemos encontrar en la bibliografía, desde las teorías simplistas, las más en boga en la actualidad, que hacen responsables de la alteración a diversos microorganismos, actuando aisladamente, hasta las que defienden una sucesión genérica de microorganismos.

Tras un estudio objetivo del problema, se puede afirmar con escasas posibilidades de equivocación, que el rojo puede ser producido por dos o tres microorganismos distintos, que siguiendo la séptima edición del "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology"<sup>2</sup>, podemos conocerlos como el *Halobacterium salinarium*, el *Micrococcus morrhuae*, y la *Sarcina litoralis*. El primero, como más tarde veremos, es un microorganismo totalmente diferente de los otros dos. Sin embargo, las diferencias entre los dos últimos son tan escasas que inducen a pensar que se trata de una única especie bacteriana.

Estos tres microorganismos son conocidos de antiguo, y han sido denominados con multitud de nombres. En aras de la claridad, vamos a describir la sinonimia de los mismos.

*Halobacterium salinarium*, *Bacillus rubescens* (EDINGTON, 1877), *Pseudomonas salinaria* (HARRISON y KENNEDY, 1922), nombre muy conocido por los autores de Estados Unidos y Canadá, *Amoebobacter morrhuae* (PENSO, 1947).

*Micrococcus morrhuae*, *Diplococcus gadidarum* (BECKWITH), *Micrococcus litoralis gadidarum* (KELLERMANN, 1915), *Micrococcus morrhuae* (KLEBAHN, 1919).

*Sarcina litoralis*, *Clathrocytis roseo-persicina* (COHN, 1875), *Halococcus litoralis* (POULSEN, 1879), *Diplococcus gadidarum* (BECKWITH), *Micrococcus litoralis* (KELLERMANN, 1915) *Micrococcus rubroviscosus* (MARTELL y GERMAIN, 1921), *Sarcina morrhuae* (PETTER, 1931).

Las características morfológicas y culturales siguiendo a BERGEY, del *M. morrhuae* y la *S. litoralis*, son muy semejantes, diferenciándose quizás solamente en ligeras diferencias morfológicas, despreciables, si pensamos<sup>11</sup> en las variaciones de morfología y metabolismo achacables al tenor de sal de los medios de cultivo.

Sin embargo, el *Halobacterium salinarium*, se diferencia con facilidad de los anteriores, especialmente por sus caracteres morfológicos, movilidad, y su propiedad de lisarse en ambientes de hiposalinidad.

### Aislamiento de los halófilos del rojo.

En el aislamiento de los gérmenes del rojo, bien sea del pescado alterado, instalaciones o sal, se han empleado multitud de medios de cultivo, todos ellos con la característica común de un tenor alto de cloruros, a causa del carácter halófilo de estos microorganismos. Los más utilizados son los que llevan como fuentes de proteínas, solubles de bacalao, peptonas o leche en polvo, y como fuente de hidratos de carbono, harinas de cereales, o lactosa incorporada con la leche<sup>15-18</sup>.

En nuestros ensayos sobre aislamiento de gérmenes halófilos del rojo, a partir de bacalao alterado, hemos comprobado alguno de estos medios de cultivo y probado otros nuevos, basados en los resultados obtenidos en los anteriores. La composición de los mismos y los resultados obtenidos los reflejamos en las tablas I y II.

Del estudio de las mismas se puede deducir fácilmente, que para el desarrollo de los halófilos del rojo, *S. litoralis*, necesita el concurso de materias protéicas e hidrocarbonadas, presentando un gran interés el origen de las últimas. De ellas, tanto la patata como la lactosa, se muestran superiores a las harinas de trigo y maíz y al almidón soluble. Como uno de los medios más idóneos que encontramos en nuestro trabajo fue el denominado M.5 B, ha sido el que hemos utilizado como base para el desarrollo del resto de la investigación.

El aislamiento de los microorganismos responsables del rojo, lo realizamos siguiendo dos técnicas diferentes. O bien aislando sobre placa con medio M 5 B a partir de una suspensión bacteriana, obtenida por maceración y trituración del bacalao alterado en solución salina al 15 por 100, o partiendo de una suspensión microbiana obtenida del cultivo de un trocito de bacalao alterado sobre medio M 5 B. Las dos técnicas son de buenos resultados, la primera más rápida, la segunda más segura.

TABLA I  
COMPOSICION DE LOS MEDIOS EMPLEADOS

Nombre de los medios	Materias primas			
	Proteínas	H. de carbono	Endurecedores	% cloruro sódico
M 1 B ...	Solubles de bacalao, peptona	Harinas de trigo y maíz	Agar, gelatina	20
M 2 B ...	Caseína y albúmina de leche	Lactosa	Agar	20
M 3 B ...	Solubles de bacalao, peptona	—	Agar, gelatina	20
M 4 B ...	Extracto de carne, peptona	—	Agar, gelatina	20
M 5 B ...	Extracto de carne, peptona	Patata	Agar, gelatina	20
M 6 B ...	Extracto de carne, peptona	Almidón	Agar, gelatina	20
M 7 B ...	Extracto de carne, peptona	Lactosa	Agar, gelatina	20

TABLA II  
DESARROLLO DE LOS GERMESES HALOFILOS  
(Incubación a 37° durante 15 días)

Medios	Desarrollo	Intensidad de color de las colonias	Aislamiento
M 1 B .....	++	+	++
M 2 B .....	+++	++	+++
M 3 B .....	+—	+	+
M 4 B .....	+—	+	+
M 5 B .....	+++	++	+++
M 6 B .....	+	+	+
M 7 B .....	++	++	++

Los cultivos son incubados a 37°, durante un período de quince días. Es conveniente para evitar deshidrataciones excesivas del medio, proteger las placas con materias plásticas, o cinta adhesiva.

En las seis muestras de pescado alterado con rojo examinadas, hemos encontrado solamente un único microorganismo pigmentado en rojo, que por sus características morfológicas y culturales se identifica con la *Sarcina litoralis*. El hecho de proceder las muestras de una misma factoría y de encontrar una sola especie de microorganismos del rojo nos hace suponer que la fuente de contaminación del pescado ha sido probablemente única, sal o instalaciones de trabajo fuertemente contaminadas por este germen.

*Características morfológicas y culturales de la S. litoralis, encontrada en bacalao alterado por rojo:*

Características morfológicas:

Sobre agar M 5 B, diez días de incubación a 37°, cocos de 1-1,5 micras de diámetro, presentándose en tetradas, paquetes, parejas o cadenas de 4-5 elementos. Inmóvil. Gram negativo.

Sobre caldo (1 por 100 de peptona y 20 por 100 de Cl Na), diez días incubación, a 37°, cocos, de 1-1,5 micras de diámetro, presentándose en tetradas, paquetes, y cadenas de 8-10 elementos. Inmóvil. Gram negativo.

Características culturales:

Sobre caldo (1 por 100 de peptona y 20 por 100 de Cl Na), diez días incubación a 37°: Depósito viscoso, que se disuelve por agitación.

Sobre medio M 5 B, diez días incubación a 37°: Colonias redondas convexas, 0,5-1,5 milímetros de diámetro, pigmentadas en rojo.

Fermentación de hidratos de carbono (1 por 100 peptona, 1 por 100 hidratos de carbono y 20 por 100 de Cl Na), incubación treinta días a 37°: No fermenta los azúcares, glucosa, lactosa y sacarosa.

Producción de indol, (peptona 1 por 100 y Cl Na 20 por 100), incubación diez días a 37°: no produce.

Reducción de nitratos (1 por 100 peptona, 1 por 100 nitrato potásico, 20 por 100 Cl Na), incubación diez días a 37°: Reduce los nitratos a nitritos.

Respiración, (medio Thioglicolato con 20 por 100 de Cl Na), incubación diez días a 37°: aerobio.

Catalasa: positivo.

Halofilia: crece con concentraciones de 10, 20, 30 por 100 de Cl Na. No sufre lisis celular en contacto con agua dulce.

Características del pigmento: No es soluble en alcohol etílico ni en cloroformo. Tratando la masa celular con ácido sulfúrico concentrado, el ácido, al cabo de unos minutos, toma coloración amarillo oro. Si se trata con ácido clorhídrico concentrado toma coloración ligeramente azulada.

### MÉTODOS DE LUCHA CONTRA EL ROJO

Para poder emprender una lucha profiláctica contra el rojo del bacalao, debemos previamente conocer las posibles fuentes de contaminación de los productos. Sobre este punto existe criterio unánime, siendo la sal empleada en la salazón, y las instalaciones de trabajo, bodegas de barco, cubas de salmuera, secaderos, almacenes y cámaras, las responsables de la contaminación.<sup>4-5-7-8-10-16-18</sup>

Por lo tanto parece lógico pensar que la lucha debe centrarse o bien en la destrucción de los halófilos rojos de la sal y de las instalaciones, o creando condiciones disgenéticas en el pescado para el desarrollo de los mismos, o bien por sistemas mixtos.

En la higiene de la sal debemos tener muy en cuenta la alta resistencia al calor seco de los halófilos del rojo, 102° 7 minutos, siendo necesarios períodos de esterilización largos, treinta minutos, o el empleo del calor húmedo<sup>5-10</sup>. Es sumamente interesante el hecho de la destrucción lenta pero paulatina de esta flora con el envejecimiento de la sal, lográndose la autoesterilización si el envejecimiento es lo suficientemente largo.<sup>8</sup> Se han utilizado en ocasiones la esterilización de salmueras por productos antimicrobianos, compuestos de amonio cuaternario a altas temperaturas, 90° C, con excelentes resultados.<sup>16</sup>

En la desinfección de instalaciones y equipo, el producto más empleado es el metabisulfito sódico, con resultados no del todo satisfactorios<sup>18</sup>. Se han probado compuestos de amonio cuaternario, detergentes, y compuestos de cloro sin resultados excesivamente satisfactorios<sup>7</sup>. Cuando en la flora contaminante predominan los halobacterium pueden eliminarse con facilidad con el empleo abundante de agua dulce,

acompañada o no de desinfectantes, a causa de la rápida lisis de esos microorganismos en ambientes de hipo-salinidad<sup>7</sup>.

Las condiciones disgenéticas del músculo del pescado salado podemos crearlas por diversas formas. Las más utilizadas son la conservación a baja temperatura, el empleo de antimicrobianos sobre el músculo del pescado, y la aplicación de microorganismos antagónicos.

La conservación a baja temperatura sería sin duda el medio más idóneo de conservación, si no fuera porque es francamente difícil de lograr, para esta clase de productos, una cadena de frío ininterrumpida. Está perfectamente comprobado que a temperaturas entre 4-7° solamente se manifiesta el rojo si la contaminación es muy fuerte y aún en estos casos en períodos de conservación muy largos<sup>6-17-19</sup>.

El empleo de antimicrobianos en el músculo del pescado, método usual en la industria con el metabisulfito sódico, sería una solución ideal si se encontrara un antimicrobiano completamente atóxico y lo suficientemente activo para que en dosis mínimas destruyera o al menos inhibiera el desarrollo de la flora responsable del rojo. Se han probado con esta finalidad multitud de productos, metabisulfito de sodio, de potasio, agua oxigenada, ácido sórbico, ácido acético, benzoato sódico, propionato sódico, antibióticos: penicilina, streptomycin, cloromitecina, aureomicina, tetraciclina, con resultados poco esperanzadores<sup>2-17-18-19-20</sup>.

Las investigaciones de Dussault<sup>9</sup> sobre el empleo de gérmenes antagónicos, de la *S. litoralis* y del *H. salinarium*, obtenidos de pescados salados sin rojo, abre un camino esperanzador en los métodos de lucha contra el rojo.

A la vista de estos antecedentes se deduce fácilmente, que a pesar de las dificultades que presenta la lucha contra el rojo, si esta lucha es organizada es posible el éxito. Creemos sin embargo, que para que esto sea seguro son necesarios los sistemas mixtos. La primera parte del mismo desinfección de sal e instalaciones es posible, la segunda, creación de condiciones disgenéticas en el músculo del pescado ya no aparece tan clara.

Pensando nosotros en esta segunda parte, y en la posibilidad de empleo de nuevos productos, decidimos iniciar unos ensayos con los compuestos de amonio cuaternario. Nos decidimos por estos compuestos a causa de su atoxicidad<sup>14</sup> y a su doble propiedad de ser fuertemente bacteriostáticos y bactericidas<sup>13</sup>. A consecuencia de esto su empleo en

la desinfección de las industrias bromatológicas en legal en numerosas legislaciones sanitarias<sup>1</sup>, y en España, y por la Dirección General de Sanidad, 1958, ha sido aprobada su incorporación a hielo destinado a la conservación de alimentos. Por otra parte su uso con éxito en la esterilización de salmueras contaminadas por halófilos del rojo<sup>16</sup>, hace suponer su posibilidad de empleo.

#### Ensayos experimentales.

Los ensayos se realizaron en dos fases. Una primera sobre medios de cultivo, al objeto de poder standarizar plenamente la prueba y poder escoger con objetividad el antimicrobiano más idóneo, y una segunda, en la cual aplicamos sobre el pescado, el antimicrobiano seleccionado en la primera.

#### Ensayos sobre medios de cultivo.

Las pruebas sobre medios de cultivo se realizaron con arreglo al siguiente protocolo:

1. Medio de cultivo: Medio M 5 B en slant sobre tubos de 30 × 200 mm. con 25 cc. de medio por tubo.
2. Antimicrobianos incorporados al medio de cultivo: Compuestos de amonio cuaternario, cloruro de dodecil-bencil-dimetil-amonio, bromuro de alquil-dimetil-carbetoximetil-amonio, y cloruro de alquil-trimetil-amonio, disueltos en solución salina al 15 por 100. Se utilizó también el metabisulfito sódico, por ser el antimicrobiano comúnmente utilizado en la industria bacaladera española.
3. Las concentraciones probadas, en ppm, fueron las siguientes: 10.000, 1.000, 500, 250, 100, 50, 25, 10, 5, 2 y 1.
4. Siembra: La siembra se realizó con 0,1 cc. de una suspensión microbiana concentrada de *Sarcina litoralis* en solución salina al 15 por 100, diseminándola por toda la superficie del slant, previamente desecado hasta pérdida total del agua de condensación.
5. Incubación: a 37° durante un mes, con protección de las bocas de los slants con plástico para evitar la deshidratación.

TABLA III

### INHIBICION DEL DESARROLLO DE LA *SARCINA LITORALIS* POR ANTIMICROBIANOS

(Substrato Medio M 5 B, Incubación a 37° 1 mes)

Antimicrobianos	Concentración del antibiótico en ppm.									
	10.000	1.000	500	250	100	50	25	10	5	2
Cloruro de dodecil-bencil-dimetil-amonio ....	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
Bromuro de alquil-dimetil-carbetoximetil-amonio .....	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
Cloruro de alquil-trimetil-amonio .....	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
Metabisulfito sódico ...	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ = Desarrollo microbiano  
— = No desarrollo microbiano

Los resultados encontrados los resumimos en la tabla III, de cuyo estudio se puede deducir la extraordinaria sensibilidad de la *S. litoralis* frente a los compuestos de amonio cuaternario, y especialmente al cloruro de dodecil-bencil-dimetil-amonio, y su fuerte resistencia, por el contrario, al metabisulfito sódico.

#### Ensayos sobre pescado salado y seco.

En vista de los prometedores resultados obtenidos sobre medios de cultivo, planeamos una prueba de protección de bacalao seco y salado frente a la *S. litoralis* empleando solamente el compuesto de amonio cuaternario de más alto poder inhibitorio, el cloruro de dodecil-bencil-dimetil-amonio.

Como sustrato empleamos bloques de bacalao seco y salado de 5 centímetros de largo por 3 de ancho y alrededor de 1,5 centímetros de grosor. La incorporación del antimicrobiano se realizó sumergiendo los bloques en las soluciones de antimicrobiano durante un tiempo de diez minutos. Estas soluciones fueron hechas sobre solución salina al 15 por 100.

Después de sufrir un ligero oreo, 24 horas a 37°, los bloques se introdujeron en tubos de 30 × 200 y fueron sembrados con 0,1 cc. de una suspensión concentrada de *S. litoralis*, incubándoles, previa protección de las bocas de los tubos con plástico, a 37° durante un mes.

Los resultados obtenidos, inhibición del crecimiento a partir de concentraciones de 10 ppm., confirman los encontrados sobre medios de cultivo, e indican las amplias posibilidades de este producto en la lucha contra la *S. litoralis*.

#### DISCUSION

La presencia en todas las muestras de bacalao alterado por rojo de la *S. litoralis* hace suponer una única fuente de contaminación, probablemente la sal. Creemos sería de un gran interés en la lucha contra esta alteración el realizar un estudio microbiológico de todas las sales marinas españolas, al objeto de conocer la flora halofílica de las mismas y poder establecer en consecuencia planes razonados de lucha.

La gran capacidad bacteriostática de los compuestos de amonio cuaternario, y especialmente del cloruro de dodecil-bencil-dimetil-amonio para la *S. litoralis*, tanto en medios de cultivo como en bacalao salado y seco, sugieren su posible aplicación en los métodos industriales de lucha contra el rojo. Si a esto unimos, su amplia capacidad fungistática frente al *Sporendonema* del empolvado, y su atoxicidad, es posible se pudiera convertir en el producto ideal contra las alteraciones del bacalao.

#### RESUMEN

Se ha realizado un estudio sobre etiología y métodos de lucha contra el rojo del bacalao.

En las seis muestras examinadas de bacalao alteradas por rojo, se ha encontrado como único organismo halófilo pigmentado a la *S. li-*

*toralis*. Al proceder las muestras de una misma factoría, hace suponer una única fuente de contaminación.

Se ha realizado un estudio sobre los medios de cultivo más idóneos para el desarrollo y aislamiento de la *S. litoralis*, comprobándose la gran influencia que tienen en el mismo los hidratos de carbono.

Tras de analizar los diversos métodos de lucha contra el rojo de bacalao, se ha realizado un estudio de inhibición del desarrollo de la *S. litoralis* sobre medios de cultivo, utilizando diversos compuestos de amonio cuaternario y metabisulfito sódico, comprobándose la extraordinaria capacidad inhibitoria de los primeros y en especial la del cloruro de dodecil-bencil-dimetil-amonio, frente a la escasa del metabisulfito sódico. Realizado el mismo estudio sobre bacalao salado y seco, empleando solamente el cloruro de dodecil-bencil-dimetil-amonio, se logran resultados muy similares a los anteriores.

#### RESUME

On a effectué une étude sur l'étiologie et les méthodes de lutte contre le rouge de la morue.

Dans les six échantillons de morue altérés par le rouge qui ont été examinés on a trouvé un seul halophile pigmenté, le *S. litoralis*. Les six échantillons provenant d'une même origine, on suppose qu'il y a une source de contamination commune.

On a effectué une étude sur les milieux de culture les plus appropriés pour le développement et l'isolement du *S. litoralis* et on a constaté la grande influence qu'ont les hydrates de carbone sur ce micro-organisme.

Après avoir analysé les différentes méthodes de lutte contre le rouge de la morue on a effectué également une étude sur l'inhibition du développement du *S. litoralis* sur des milieux de culture en employant divers composés quaternaires d'ammonium et du metabisulfite sodique et on a constaté l'extraordinaire pouvoir inhibitoire des susdits composés quaternaires surtout celui du chlorure de Dodécyl-benzyl-diméthyl ammonium contre celui du metabisulfite sodique qui est très pauvre.

On obtient des résultats semblables aux antérieurs quand on effectue la même étude sur de la morue salée et séchée en employant seulement le chlorure Dodécyl-benzil-diméthyl ammonium.

## S U M M A R Y

A study has been carried out on the ethiology and methods of fight against red of codfish.

Six samples of codfish altered by red of codfish have been assayed and examined and the only halophile which has been found is *S. litoralis*. As all the six samples proceded from the same factory we suppose there is only one common source of contamination.

A study on the most suitable culture media for the growth and isolation of *S. litoralis* has also been carried out and we have seen that Carbohydrates have great influence on this microorganism.

Besides the analysis of the different methods of fighting against red of codfish we also have carried out a study on the inhibition of the growth of *S. litoralis* on culture media by using various quaternary ammonium compounds and sodium bisulfite and we have found that the quaternary ammonium compounds and specially Dodecyl-benzyl-dimethyl ammonium chloride have a remarkable inhibitory ability while that of sodium metabisulfite is very poor.

Very similar results to those above are obtained when the same study is carried out on dried salted codfish by using only Dodecyl-benzyl-dimethyl ammonium chloride.

## BIBLIOGRAFIA

1. ANON, 1951.—La revue de la conserve, 46-51.
2. BREED, R. S., y otros, 1957.—*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Williams-Wilkins, Baltimore.
3. BOY, J. W., y TARR, H. L. A., 1954.—Progress Reports of the Pacific Coast Stations, 99, 22-24.
4. CASTELL, C. H., 1950.—Progress Reports of the Atlantic Coast Stations, 48, 8-10.
5. CASTELL, C. H., 1950.—Progress Reports of the Atlantic Coast Stations, 50, 9-13.
6. CASTELL, C. H., 1950.—Progress Reports of the Atlantic Coast Stations, 50, 13-18.
7. CASTELL, C. H., y MAPPLEBECK, E. G., 1952.—Progress Reports of the Atlantic Coast Stations, 52, 23-36.
8. DUSSAULT, H. P., 1953.—Progress Reports of the Atlantic Coast Stations, 55, 7-10.
9. DUSSAULT, H. P., 1954.—Progress Reports of the Atlantic Coast Stations, 58, 3-6.
10. FREIXO, J. A., 1952.—Conservas de Peixe, 71, 25-37.
11. GIBBONS, N. E., 1957.—Canadian Journal of Microbiology, 2, 249.
12. PENSO, G., 1950.—*I Prodotti della Pesca*, U. Hoepli, Milán.
13. REJAS, F., 1956.—*Contribución al Estudio del poder bactericida y fungicida de los Compuestos de Amonio cuaternario*. Tesis doctoral de la Universidad de Oviedo.
14. RESSUGGAN, J. C. L., 1951.—*Quaternary ammonium compounds in chemical sterilization*, United Trade Press Ltda, Londres.
15. ROWAN, M. K., 1960.—Annual Report, Fishing Industry Research Institute, 13, 11-12.
16. ROWAN, M. K., 1960.—Annual Report, Fishing Industry Research Institute, 13, 12-13.
17. TORRES, A., 1958.—Boletín da Pesca, 58, 11-23.
18. TROPA, E., y GALAMBA, A., 1955.—*Bacterias halófilas do vermelho do bacalhau*, Ministerio da Economía, Lisboa.
19. VENKATARAMAN, R., y SCRENIVASAN, A., 1954.—Proceedings of the Indian Academy of Sciences, 1, 17-24.
20. VENKATARAMAN, R., y SCRENIVASAN, A., 1956.—Current Science, t. 25, 190-192.