

ESTUDIO DE LA MICROFLORA ASOCIADA A LA FORMACIÓN DE HISTAMINA EN SARDINA (*Sardinella aurita*)

A Study of Microflora Associated With Histamine Formation in Sardines (*Sardinella aurita*)

Crucita Graü, Dalmiro Sánchez, Aracelys Zerpa, Osmicar Vallenilla y Omar Bertí

INIA / Sucre / Nueva Esparta, Av. Carúpano-Caigüire, Apdo. 236, estado Sucre, Venezuela.

E-mail: ciapes@sucre.udo.edu.ve

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar la microflora asociada a la formación de histamina en la sardina (*Sardinella aurita*) y determinar la capacidad potenciadora de la bacterioflora en la producción de esta sustancia, durante el almacenamiento refrigerado a la temperatura de $7\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Se consideraron las dos variedades de presentación enteras y fileteadas provenientes de dos sitios de expendios de Cumaná (estado Sucre): Mercado municipal y la Boca del Río Manzanares, analizándose un total de 240 muestras. Para la detección, aislamiento e identificación de bacterias asociadas a la producción de histamina (HBF), se utilizó la metodología recomendada por APHA (1992). Los ensayos de inducción de formación de histamina se llevaron a cabo por inoculación directa de las muestras con dos microorganismos: *Morganella morganii* y *Escherichia coli*, seleccionados por su prevalencia y su condición fisiológica. La cantidad de histamina formada se cuantificó por el método recomendado por la AOAC (1995). Los resultados revelaron una elevada incidencia de microorganismos capaces de formar histamina, identificándose a *M. morganii*, *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris* y *Klebsiella pneumonia* como agentes potenciadores en la formación de esta sustancia. El mayor porcentaje de aislamiento le correspondió a *Morganella morganii*, representando el 39,2% de los aislamientos, seguido de *E. coli* con un 25%. En las muestras inoculadas con *E. coli*, el contenido de histamina alcanzó un valor de 2,8 mg/100g de muestra.

Palabras clave: Bacterias, histamina, sardina, especies bacterianas, localidad geográfica, especie de sardina (*Sardinella aurita*).

ABSTRACT

The purpose of this research was to study the microflora associated with histamine formation in sardines (*Sardinella aurita*), and to ascertain the bolstering capacity of the bacterial flora in the production of this substance during storage at $7\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. In order to induce the formation of histamine, 240 whole and filet samples from two sales outlets in Cumaná, Sucre state, the municipal market and the fish market at the mouth of the Manzanares River, were inoculated under the APHA (1992) guidelines with *Morganella morganii* and *Escherichia coli*, both selected for their prevalence and physiological condition. The amount of histamine produced was measured following the routine recommend by AOAC (1995). The results revealed a high incidence of microorganisms capable of forming histamine, identified as *M. morganii*, *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, and *Klebsiella pneumonia* as bolstering agents in the histamine-producing processes. *Morganella morganii* bore the highest isolation margin with 39.2% followed by *E. coli* with 25%. The content of histamine in the samples inoculated with *E. coli* reached 2.8 mg /100 g of sample.

Key words: Bacteria, histamine, sardine, bacterial species, geographic location, sardine species (*Sardinella aurita*).

INTRODUCCIÓN

La sardina (*Sardinella aurita*), representa la principal fuente de materia prima de plantas procesadoras de productos pesqueros instaladas en los estados Sucre y Nueva Esparta de Venezuela. Se consume en forma fresca y se utiliza como carnada para la pesca de otras especies entre las cuales se puede mencionar: atún, pargo, y mero. Genera mediante la actividad de extracción, procesamiento y comercialización alre-

dedor de 15.000 empleos directos. De allí su importancia agroalimentaria, económica y social, unida a su ubicación trófica como alimento preferencial comparado con otras especies pelágicas [15].

Un aspecto importante a considerar en este recurso pesquero es la problemática presentada en nuestro país en cuanto al manejo de las capturas abordo de las embarcaciones y a la susceptibilidad de esta especie pelágica en particular, al deterioro bacteriano, enzimático y químico, debido a su alto contenido de proteínas y lípidos. Estudios realizados por Graü y colaboradores [16], determinaron la necesidad de introducir el uso del hielo para evitar el deterioro del producto y por ende la multiplicación de microorganismos de especial significación sanitaria, como son las bacterias vinculadas a la formación de "Histamina", sustancia muy activa que provoca diversos desordenes fisiológicos en individuos afectados. La histamina se produce en los alimentos por la descarboxilación de la histidina, esta reacción es catalizada por la enzima histidina descarboxilasa contenida en algunas bacterias. La enzima no se distribuye en forma amplia entre las bacterias, es concentrada en ciertas especies de *Enterobacteriaceae*, *Clostridium* y *Lactobacillus* [23].

Pescados pertenecientes a las familias *Scombridae* y *Clupeidae* como es el caso de la sardina, poseen grandes cantidades de histidina libre en sus tejidos musculares que sirven de sustrato para la histidina-descarboxilasa bacteriana. Al ingerir el hombre estos alimentos con elevado contenido de histamina se produce la metabolización de esta sustancia, ocasionando el envenenamiento del individuo, caracterizada por náuseas, vómitos, disfgia, dolor de cabeza, enrojecimiento facial, urticaria, sensación de ardor en el tórax, hinchazón de los labios, shock anafiláctico [1]. La aparición de los síntomas usualmente ocurre de unos pocos minutos a tres horas de la ingestión del alimento contaminado. En general, el desorden fisiológico ocasionado en el individuo al principio puede ser benigno, pero estos síntomas primarios pueden complicarse a lo largo del cuadro evolutivo de la intoxicación [4]. La intoxicación por histamina representa en la actualidad un problema de salud pública de alcance mundial en países donde los consumidores ingieren pescado con altos niveles de histamina, los cuales tienen su origen precursor para su formación en la proliferación de bacterias debido a condiciones deficientes de higiene y saneamiento e inadecuado almacenamiento del pescado [18].

Dada las circunstancias, en la que se ha demostrado la naturaleza perecedera de la carne del pescado y su susceptibilidad a sufrir deterioro por la acción microbiana, aunado a los innumerables casos que involucran a la sardina en intoxicaciones por histamina se realizó este trabajo con el objeto de estudiar las bacterias asociadas a la formación de estos metabolitos y que intervienen por ende en el deterioro del producto, determinándose a su vez la capacidad potenciadora de las mismas para producir esta sustancia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de este estudio se utilizó una de las especies de pescado de mayor importancia comercial y de consumo masivo como es la sardina (*Sardinella aurita*). Se consideraron las dos variedades de presentación del producto, fresco entero y fileteado. Las muestras fueron adquiridas en dos sitios de expendios de la localidad: Mercado Municipal y Boca del Río Manzanares. Los muestreos se realizaron entre abril 2000 y marzo 2001, analizándose un total de 240 muestras. Las muestras fueron clasificadas de la siguiente forma: 60 muestras de sardina fileteada, procedente del Mercado Municipal, 60 muestras fileteadas procedentes de la Boca del Río Manzanares, 60 muestras de sardinas enteras procedentes del Mercado Municipal y 60 muestras de sardinas enteras procedentes de la Boca del Río Manzanares. La toma y preparación de las muestras se realizó bajo estrictas condiciones de asepsia según las recomendaciones de la American Public Health Association [5]. Las muestras fueron colocadas en bolsas plásticas de cierre hermético y transportadas en cavas de anime con hielo al laboratorio de Microbiología del Instituto de Investigaciones Agrícolas del estado Sucre (INIA-Sucre).

Aislamiento e identificación de bacterias productoras de histamina: Para el aislamiento e identificación de microorganismos formadores de histamina (HFB) en sardinas enteras o en filetes, se procedió a remover asépticamente parte de la musculatura y a preparar un homogenizado tomando 25g del músculo y adicionándole 225ml de caldo tripticasa soya fortificado (TSBH) para la producción de histamina con adición de 0,1% histidina [24]. A partir del homogenizado (dilución 10^{-1}) se sembró 0,1 ml de la muestra en placas de TSA (Tripticasa soya agar), MacConkey, Endo, EMB agar (Merck), agar CLED con indicador de Andrade y azul de Bromothymol y agar Niven (NA) modificado [22]. Todas las placas, a excepción de las sembradas en agar NA, se incubaron a 35°C/48horas. Las sembradas en agar NA fueron incubadas 35°C/120 horas. Se tomaron en consideración las características morfológicas de las colonias desarrolladas. La pureza de los cultivos fue comprobada por repiques sucesivos en los medios de cultivos originales. Se aislaron colonias típicas, las cuales se caracterizaron morfológicamente mediante la técnica de Gram, modificada por Hucker y Conn [17] y se efectuaron pruebas bioquímicas diferenciales [13]. Los microorganismos aislados de las distintas muestras que resultaron ser bacilos Gram negativos fueron sembrados en tubos de agar tres azúcares y hierro (agar TSI, Merck), se incubaron a 37°C/24h y se consideraron los cambios producidos. A cada microorganismo desarrollado en este medio se le practicó las siguientes pruebas: citocromooxidasa [12], catalasa, según métodos descritos por Taylor y col. [25]; Blazevic y col. [10]. La reacción de oxidación y fermentación de carbohidratos, las pruebas de IMVIC, ureasa y motilidad se practicaron de acuerdo a las instrucciones del Manual Merck [21]. La prueba de fermentación de carbohidratos se utilizó el caldo base recomendado por Edwards y

Ewing [11]. Los carbohidratos considerados para esta prueba fueron lactosa, maltosa, manitol, dulcitol, sorbitol y xilosa, todos a una concentración de 1%. Las características bioquímicas desarrolladas por las distintas especies de microorganismos aislados fueron comparadas con esquemas establecidos en el Manual de Bergeys [9].

Inducción de la formación de histamina: Se seleccionaron dos microorganismos diferentes y de mayor predominancia en las muestras analizadas identificados como *Morganella morganii* y *Escherichia coli*. Para la inoculación de las muestras se consideraron las dos variedades de presentación del producto, enteras y fileteadas. El inóculo se preparó con una suspensión del microorganismo igual al patrón Mac Farland N 0,5 al cual le corresponde $1,5 \times 10^8$ UFC/ml [6]. El método de inoculación fue el directo. Las muestras inoculadas fueron colocadas en envases estériles y almacenados a temperatura de refrigeración de $7 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 6 días. Las muestras inoculadas con los distintos microorganismos fueron analizadas cada 24 horas. La determinación de histamina se realizó mediante el método recomendado por la AOAC [3]. Se preparó un homogenizado utilizándose 10 g de la muestra obtenida mediante un pool de las mismas, en 50 ml de metanol (CH_3OH). El homogenizado se sometió a baño maría (60°C) por 15 min. Al temperarse a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ se ajustó y filtró a un volumen de 100ml con etanol. El filtrado se adicionó a una columna de intercambio iónico (200 x 7 mm, Sigma). La histamina purificada derivada con O-f thaldehído (OPT) se determinó usando un fluorómetro (AmincoBowman.MD) a una longitud de onda de emisión de 350-444nm.

RESULTADOS

En la TABLA I, se indican importantes aislamientos realizados en muestras de *Sardinella aurita* fileteada y no fileteada,

procedente del Mercado Municipal y de la Boca del Río Manzanares. Los microorganismos aislados en su totalidad son considerados como bacterias de origen intestinal, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*.

Las características bioquímicas diferenciales de las distintas bacterias aisladas permitieron determinar su ubicación taxonómica. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter aerogenes* resultaron ser lactosa positivo, mientras que *Proteus vulgaris* y cepas de *Citrobacter freundii*, reaccionaron negativamente, catalogándose como lactosa negativa. Algunas especies produjeron Sulfuro de Hidrógeno a partir del TSI, formándose un precipitado de color negro en el fondo del tubo (*Proteus vulgaris* y *Citrobacter freundii*). La capacidad de los microorganismos de degradar el triptófano del medio pudo evidenciarse detectándose la presencia del Indol como producto de la deaminación del sustrato. La positividad de la reacción se manifestó mediante la formación de un anillo rojo en la parte superior del tubo que contenía el medio. *E. coli*, *Morganella morganii* y *Proteus vulgaris* resultaron positivas a la prueba de deaminación. La prueba de la catalasa considerada como otro criterio de identificación resultó positiva para todos los microorganismos.

En la FIG. 1, se presenta la frecuencia de bacterias formadoras de histamina (HFB) aisladas en las muestras de sardinas provenientes del Mercado Municipal y de la Boca del Río Manzanares.

La prevalencia de las distintas cepas aisladas en total de 240 muestras analizadas de sardinas enteras y en filetes provenientes de los dos sitios de expendios seleccionados se presenta en la FIG. 2. *Morganella morganii*, representó el mayor porcentaje de aislamiento, correspondiéndole el 39,2%; seguido por *E. coli* con un 25% y *Proteus vulgaris* un 14,2%. El menor porcentaje de aislamiento le correspondió a *Citrobacter freundii* (2,1%).

TABLA I
AISLAMIENTOS DE ESPECIES BACTERIANAS FORMADORAS DE HISTAMINA (HFB)
EN MUESTRAS DE SARDINA (*Sardinella aurita*)

Tipo de muestras	Procedencia	Microorganismo Aislados	Nº muestras positivas	% de Aislamiento
Sardinas enteras	M. Municipal	<i>M. morganii</i>	30	50
		<i>E. coli</i>	25	41,7
		<i>C. freundii</i>	5	8,3
Sardinas Filetes	M. Municipal	<i>E. coli</i>	23	38,4
		<i>M. morganii</i>	20	33,3
		<i>E. aerogenes</i>	17	28,3
Sardinas enteras	Boca del Río Manzanares	<i>E. aerogenes</i>	28	46,7
		<i>P. vulgaris</i>	17	28,3
		<i>M. morganii</i>	15	25
Sardinas filetes	Boca del Río Manzanares	<i>M. morganii</i>	29	48,4
		<i>P. vulgaris</i>	17	28,3
		<i>E. coli</i>	12	20
		<i>K. pneumoniae</i>	2	3,3

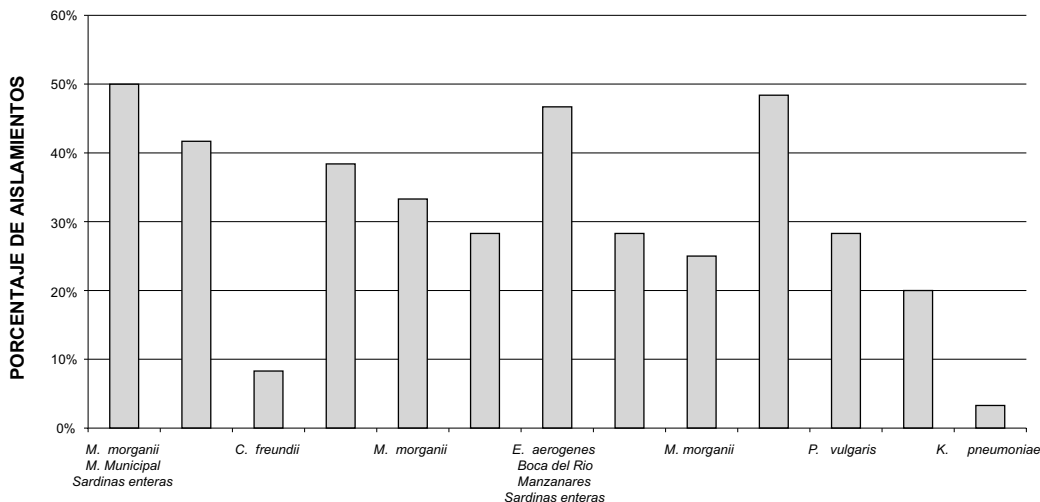


FIGURA 1. FRECUENCIA DE BACTERIAS FORMADORAS DE HISTAMINA (HFB) AISLADAS EN MUESTRAS DE SARDINAS (*Sardinella aurita*) ENTERAS Y FILETEADAS PROCEDENTES DEL MERCADO MUNICIPAL Y DE LA BOCA DEL RIO MANZANARES.

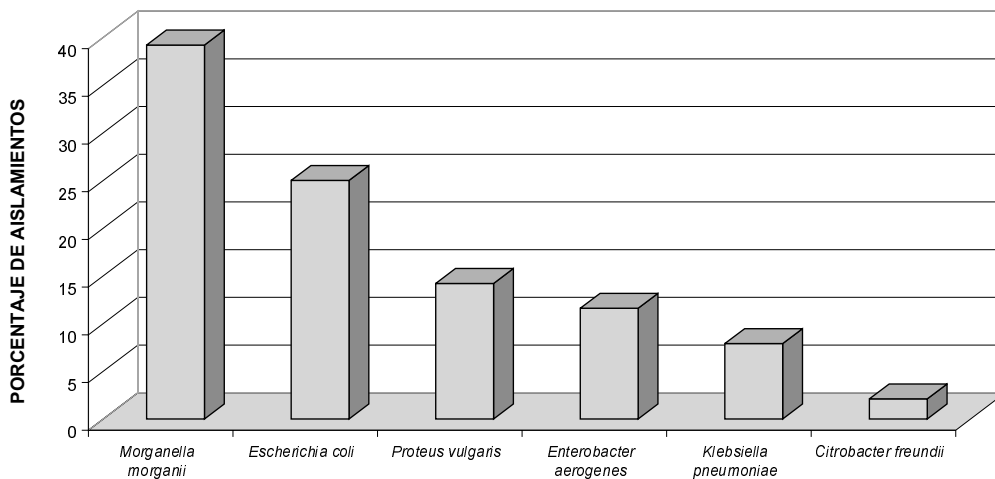


FIGURA 2. PREVALENCIA DE BACTERIAS FORMADORAS DE HISTAMINA (HFB) AISLADAS EN 240 MUESTRAS DE SARDINAS (*Sardinella aurita*) ENTERAS Y FILETEADAS PROCEDENTES DEL MERCADO MUNICIPAL Y DE LA BOCA DEL RIO MANZANARES.

Con respecto al ensayo de inducción de formación de histamina en las muestras de sardinas fileteadas y enteras por inoculación directa de *M. morganii* y *E. coli* seleccionados por su prevalencia, los resultados obtenidos indicaron que *M. morganii*, fue más prolífico en la producción de esta sustancia con respecto a *E. coli*, a la temperatura de almacenamiento de $7 \pm 0,5^\circ\text{C}$. El contenido de histamina en las muestras fileteadas inoculadas con este microorganismo obtuvo un valor máximo de 4,8mg/100 g a los seis días de almacenamiento, mientras que en las enteras el valor máximo obtenido fue de 3,6mg/100g. En las muestras inoculadas con *E.coli*, sólo en las fileteadas a los seis días de almacenamiento se obtuvo un valor máximo de 2,8mg/100g.

DISCUSIÓN

Muchos estudios coinciden en que las bacterias que producen histamina son ciertas *Enterobacteriaceae*, algunos *Vibrios sp*, unos pocos *Clostridium* y *Lactobacillus sp*. Del grupo de las enterobacterias, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Hafnia alvei* y *E. coli* han sido señaladas como las bacterias productoras más potentes de histamina en pescados [24].

De acuerdo a los resultados obtenidos en las muestras de sardinas, *M. morganii* resultó ser el microorganismo más prolífico en la producción de esta sustancia con respecto a *E. coli*, a los seis días de almacenamiento del producto a la tem-

peratura de $7\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Estos resultados coinciden con los reportados por López-Sabater y col. [20].

Investigaciones realizadas por Behling y Taylor [7] demostraron que *Klebsiella pneumoniae* (pero no *Morganella morganii*) era capaz de producir cantidades significativas de histamina a la temperatura de almacenamiento de 7°C . Sin embargo, Ababouch y col. [2]; comprobaron que *M. morganii* y un aislamiento de *Proteus sp* eran capaces de generar niveles tóxicos de histamina a bajas temperaturas ($0-5^{\circ}\text{C}$) después de estar 24 horas almacenada a altas temperaturas ($10-25^{\circ}\text{C}$), si bien a 5°C o por debajo no hubo proliferación bacteriana.

Es importante hacer mención sobre la capacidad fisiológica que tienen *M. morganii* y *E. coli* para descarboxilar la histidina, aún cuando dicha enzima está presente en ambas bacterias, la producción de histamina no depende del número de estas bacterias en el alimento sino de su capacidad para sintetizar la histidina descarboxilasa y de la temperatura de almacenamiento, la cual constituye un factor importante como agente potenciante de la actividad de la enzima, la cual se ve favorecida cuando el pescado es almacenado a temperaturas superiores de 5°C [8].

Otro aspecto a considerar es el efecto deteriorativo que estas bacterias pueden ocasionar en el producto en condiciones inadecuadas de almacenamiento. La proteólisis bacteriana juega un papel fundamental en la liberación de la histidina libre. Aún cuando los resultados presentados en el presente trabajo sobre los niveles de histamina son bajos, la práctica ha demostrado que en brotes de intoxicación por escómbridotoxina, el contenido de histamina es normalmente superior a 20 mg / 100 g de pescado, y se ha sugerido este nivel como patrón internacional por la Unión Europea [18]. Pero resulta poco práctico establecer límites reguladores de histamina en productos pesqueros. Estados Unidos de Norte América ha establecido un doble límite: de 50 mg / 100 g como nivel de intervención por razón de riesgos y de 10 ó 20 mg / 100 g como indicador de manipulación deficiente [24].

Debe recalarse que una vez producida la histamina en el pescado, el riesgo de que se desencadene la escombroidosis o intoxicación histamínica asociada a su consumo es muy elevado, resultando tóxico el pescado, aún cuando sea desde el punto de vista organoléptico aceptable al consumidor.

Ahora bien, numerosas investigaciones [2, 14, 19] han demostrado que la alteración de la carne del pescado y en especial la de sardina, es sumamente rápida debido a su naturaleza propia, es decir que por su composición intrínseca, está sujeta a sufrir deterioro por la acción microbiana, siendo la temperatura de almacenamiento y manejo postcaptura del producto, herramientas fundamentales como alternativas a considerar para contrarrestar los efectos del incremento bacteriano y la capacidad potenciante de estas bacterias en la formación de histamina, premisas importantes a cumplir dada la condición de almacenamiento sin hielo, manejo inadecuado de la sardina y precarias condiciones sanitarias en los sitios de expendios de la región.

CONCLUSIONES

El estudio demostró una alta prevalencia de miembros de la familia *Enterobacteriaceae* en las muestras enteras y fileteadas de sardinas analizadas, con predominancia de los microorganismos de significación sanitaria como son *M. morganii*, *E. coli* y *Proteus vulgaris*. Siendo, *M. morganii* el microorganismo más prolífico en la producción de histamina en las muestras de sardinas fileteadas almacenadas a temperatura de $7\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. *E. coli* fue capaz de inducir también la formación de histamina pero en menor proporción.

El predominio de estas bacterias pudiera estar vinculado probablemente a un proceso de contaminación postcaptura. Se confirma una marcada relación entre la macroecología de la especie en particular y la acción potenciadora de ciertas bacterias, combinada a una serie de factores como son tiempo y temperatura de almacenamiento, los cuales son determinantes en la colonización del producto por una flora bacteriana no propia, es decir no autóctona. Como precaución válida se recomienda mantener una estricta atención a las normas sanitarias con mucho énfasis en los aspectos higiénicos en el manipuleo de la sardina que debe iniciarse desde la captura aunada a la necesidad de introducir el uso del hielo para evitar el deterioro y a su vez la multiplicación de microorganismos de especial significación desde el punto de vista sanitario como son las bacterias vinculadas a la formación de histamina. Es necesaria la unificación de criterios entre las autoridades del sector salud para resolver el problema de incumplimiento de las normas sanitarias en los sitios de expendios del producto que determinan la implicación de la sardina en brotes de intoxicación por histamina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABABOUC, L. Envenenamiento de alimentos por histamina. **Fish tech news**. Programa de investigación cooperativa en tecnología de productos pesqueros en África, Asia y Latinoamérica. Vol. 11, Nº 1: 3-9p. FAO/DANIDA. 1991.
- [2] ABABOUC, L.; AFILAL, M.E.; BENABDELJELIL, H.; BUSTA, F. F. Quantitative changes in bacteria, aminoacids and biogenic amines in sardine (*Sardina pilchardus*) stored at ambient temperature ($25-28^{\circ}\text{C}$) and in ice, Int. **J. Food Sci. Technol.** 26: 297-306. 1991.
- [3] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Fish and other marine products, Ch.35 in **Official Methods of Analysis**, Assoc. of Analytical Chemist, Arlington, VA. 16-17 p. 1995.
- [4] ARNOLD, S. H.; BROWN, W.D. Histamine toxicity from fish products. **Adv. Food Res.** 24: 113-154. 1978.
- [5] AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Compendium of Methods for the Microbiological Exami-

- nation of foods. C. Vanderzaut and D.F. Sphittstoesser Edit. Washington, D.C., USA. 1.134pp. 1992.
- [6] BARRY, A.L.; THORNSBERRY, C. Susceptibility testing: diffusion test procedures. In Lennette, E. H., Balows, A., Hausler, W.J., and Shadomy, H.J., editor. **Manual of clinical microbiology**, ed. 4. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 76-78pp. 1985.
- [7] BEHLING, A.R.; S.L. TAYLOR. Bacterial histamine production as a function of temperature and time of incubation. **J.Food Sci.**, 47:1311-1.317. 1982.
- [8] BENNOUR, M.; MARRAKCHI, A.E.; BOUCHRITI, N.; HAMAM, A.; OUADAA, M.E. Chemical and microbiological assessments of mackerel (*Scomber scombrus*) stored in ice. **J. Food Prot.** 54: 789-792. 1991.
- [9] BERGEY, D. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 8th Ed. Williams & Wilfings Co. Baltimore. USA. 1246 pp. 1993.
- [10] BLAZEVIC, D. J.; G. M. EDERER. Principles of biochemical test in diagnostic microbiology. John Wiley & Sons N.Y. 136 pp. 1975.
- [11] EDWARDS, P. R.; W.H. EWING. Identification of Enterobacteriaceae. Burgess Publishing Co. Minneapolis. Minnesota. 134 pp. 1962.
- [12] EWING, W. H.; J. G. JOHNSON. The differentiation of Aeromonas and C-27 Cultures from Enterobacteriaceae. **Int. Bull. Bat. Nomencl.** 10: 223-230. 1960.
- [13] FADDIN, J.F. Biochemical test for investigation of medical bacteria. The Williams & Wilkins Company. Baltimore. 301 p. 1980.
- [14] FRANK, H.A.; YOSHINAGA, D.H.; NIP.W.K. Histamine formation and honey-combing during decomposition of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*), at elevated temperatures. **Mar. Fish. Rev.** 43 (10): 9-14. 1981.
- [15] GRAÜ, C. Enfermedades alimentarias ocurridas en el estado Sucre asociadas con pequeños pelágicos. **Memorias. Taller: Evaluación, Tecnología e Industrialización de Pequeños Pelágicos**. Instituto de Ciencias y Tecnología. Facultad de Ciencias. UCV. Cumaná. Edo. Sucre. 06-08/12. Venezuela. 130-134pp. 2000.
- [16] GRAÜ, C.; ZERPA A.; VALLENILLA, O. Bacterias formadoras de Histamina. L Convención anual de la ASOVAC **Acta Científica Venezolana**. Vol 52- Suplemento N° 3: 176pp. 2001.
- [17] HUCKER, G. J.; CONN, J.H. Methods of Gram Staining. New York. Arg. Exp. Sta. **Tech. Bull.** 93: 1-37. 1923.
- [18] HUSS, H.H. El pescado fresco: su calidad y cambios de calidad. **Colección FAO: Pesca**. N° 29. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. Italia. 132p. 1988.
- [19] KIM, S.H.; AN, H.; PRICE, J.R. Histamine Formation and Bacterial Spoilage of Albacore Harvest off the U.S. Northwest Coast. **Journal of Food Science**. Vol. 64. N2. 341-343. 1999.
- [20] LÓPEZ-SABATER, E.J.; RODRÍGUEZ-JEREZ; J.J.; ROIG-SAGUÉS, A.X.; MORA-VENTURA, M.A Bacteriological quality of tuna (*Thunnus thynnus*). **J. Food Prot.** 57: 318-323. 1994.
- [21] MERCK, E. Manual de Medios de Cultivos. Darmastads. Alemania. 364p. 1994.
- [22] NIVEN, C.F. JR.; JEFFREY M.B.; CORLETT, D.A. Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 41: 321-322. 1981.
- [23] RAWLES, D. D.; FLICK, G. J.; MARTIN, R.E. Biogenic amines in fish shellfish. **Adv. Food Nutr. Res.** 39: 329-364. 1996.
- [24] STRATTEN, J.E.; TAYLOR, S.L. Scombroi poisonig. In **Microbiology of Marine Food Products**. Eds: D.R.Ward and C.R. Hackney. Van Nostrand Reinhold. 351 pp. 1991.
- [25] TAYLOR, S.L.; WOYCHICH. N.A. Simple medium for assessing quantitative production of histamine by Enterobacteriaceae. **J. Food Protect.** 45: 747-51. 1982.