

EVALUACION DEL METODO PETRIFILM APLICANDO TAXONOMIA NUMERICA EN LA DETECCION DE BACTERIAS COLIFORMES EN CARNES DE VACUNO

(Evaluation of petrifilm method by the use of numerical taxonomy for the detection of coliform bacteria in beef)

B. Prado*, A. Montenegro y M.. Zazopulos

Laboratorio de Microbiología, Carrera de Control de Alimentos,
Universidad Técnica Federico Santa María, Sede Viña del Mar,
Casilla 920, Viña del Mar, Chile.

*E-mail: bprado@jmc.utfsm.cl

Palabras clave: Petrifilm, taxonomía numérica, carne de vacuno molida, *Escherichia coli* y *Enterobacter cloacae*

Key words: Petrifilm, numerical taxonomy, ground beef, *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae*

RESUMEN

Mediante la aplicación del método Petrifilm para coliformes, se aislaron un total de 33 cepas de bacterias procedentes de carnes molidas adquiridas en carnicerías y supermercados de Viña del Mar y Valparaíso (Chile). Todas las cepas junto a ocho microorganismos de referencia fueron examinadas para 20 caracteres fenotípicos y genotípicos. Los resultados fueron evaluados aplicando un análisis numérico, utilizando el coeficiente de similitud de Ssm y la técnica de agrupación UPGMA. A un nivel de semejanza del 97% quedaron definidos dos fenones representando a especies de la familia Enterobacteriaceae, *Escherichia coli* (Fenon A) y *Enterobacter cloacae* (Fenon B).

SUMMARY

By using the Petrifilm method designed to detect coliforms, 33 strains of bacteria collected from ground meat sold at butcher shops and supermarket of Viña del Mar and Valparaíso (Chile) were isolated. All the strains together with 8 reference microorganisms were examined in order to find 20 phenotypic and genotypic characters. Results were evaluated by means of a numerical analysis through the use of Ssm similarity coefficient and the UPGMA grouping technique. At a 97% similarity level, two phenons became identified, representing species from the Enterobacteriaceae family, *Escherichia coli* (Phenon A) and *Enterobacter cloacae* (Phenon B).

INTRODUCCION

En años recientes, el aumento de enfermedades bacterianas por consumo de productos cárnicos contaminados ha aumentado, demandando un mayor control sanitario de patógenos en productos cárnicos. En particular, cepas de enterobacterias como *Escherichia coli*, ocasionalmente pueden encontrarse en un gran número en las heces y fluidos del rumen en los animales vacunos, pudiendo así contaminar la carne a través del derramamiento del contenido intestinal (7).

La Asociación Americana de Salud Pública en su

16 edición reconoce al método de Petrifilm (PCC) como un método alternativo de recuento de organismos coliformes (6).

El propósito del presente estudio, ha sido evaluar el método Petrifilm en la recuperación y detección de microorganismos coliformes a partir de productos cárnicos y su posterior confirmación aplicando taxonomía numérica.

MATERIALES Y METODOS

Muestras.- Un total de 30 unidades de 500 gramos cada una de carne molida, procedentes de vacunos fueron ad-

quiridas en carnicerías y supermercados de comercialización. En cada local investigado se adquirieron cinco muestras.

Preparación de la muestra.

Las muestras de carne después de adquiridas, fueron transportadas al Laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica Federico Santa María, Sede Viña del Mar. Se refrigeraron y fueron analizadas en un plazo no superior a 18 horas. La preparación y dilución de la muestra fue realizada de acuerdo a las técnicas normalizadas por la Comisión Internacional de Microbiología y Especificaciones de los Alimentos (3), pesando 25 gramos de la muestra en vasos de homogeneizado y adicionando 225 ml de agua peptonada al 0.1%. A partir de esta suspensión inicial, fueron preparadas las diluciones decimales.

La metodología de enumeración para coliformes en Petrifilm fue realizada de acuerdo con el trabajo de Jordano (4), donde muestras de 1 ml fueron colocadas en el centro de las placas de Petrifilm. Luego se baja lentamente el film de plástico sobre el medio inoculado y se distribuye uniformemente la muestra dentro de la base del medio de cultivo, presionándose ligeramente en el centro del plástico con el aplicador incluido en el sistema. La temperatura de incubación fue de 35°C durante 24 horas (1).

Posteriormente a la incubación, se seleccionaron un total de 33 cepas que presentaron un área de crecimiento de colonias azules con gas. Se sembraron en agar nutritivo (Difco) y luego de purificadas fueron guardadas en agar nutritivo inclinado (Difco) para su posterior identificación bioquímica.

Cepas de referencia:

Las siguientes cepas de colecciones de cultivo fueron incluidas en el presente estudio: *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* K-12, *Escherichia coli* 1559, *Escherichia coli* C, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens*.

Caracterización de los aislamientos:

Las cepas seleccionadas fueron caracterizadas morfológica y bioquímicamente de acuerdo con la metodología de McFaddin (5).

Análisis Numérico:

Para la obtención del dendrograma los caracteres fenotípicos fueron codificados en forma binaria dando el valor 1 al carácter positivo y 0 al negativo. Como índice de similitud taxonómica se utilizó el de Ssm (8) y la técnica de agrupación UPGMA (9).

El análisis Computacional fue realizado utilizando el programa Taxan de taxonomía numérica en un Computador PC en la Universidad Técnica Federico Santa María, Sede Viña del Mar, Chile.

RESULTADOS Y DISCUSION

Al analizar el coeficiente de similitud taxonómica Ssm y la técnica de agrupación UPGMA, las 33 cepas aisladas aplicando el método del Petrifilm quedaron agrupadas en dos fenones característicos, con un porcentaje de similitud taxonómica muy alto (97%), lo cual indica un alto grado de homogeneidad fenotípica de los aislamientos (Figura 1).

Todas las cepas fueron positivas para las siguientes características: catalasa, producción de ácidos a partir de glucosa, lactosa, manitol, xilosa y ONPG. Todas las cepas fueron negativas para las siguientes pruebas: oxidasa, producción de H₂S en agar TSI (Difco), DNAasa, hidrólisis de la urea y gelatina. Todos los microorganismos fueron Gram negativos y con forma bacilar corta.

Tabla 1.- Características fenotípicas diferenciales de las cepas de color azul con presencia de gas aisladas de las placas de Petrifilm para coliformes.

FENON	A	B
Nº de cepas	18	15
CARACTERÍSTICAS:		
Lisina descarboxilasa	100	60
Ornitina descarboxilasa	100	0
Indol	100	0
Voges-Proskauer	100	0
Citrato	0	73
Acido de Rafinosa	5	100

Las características fenotípicas diferenciales de cada fenon se presentan en la Tabla 1. De acuerdo con estos resultados, podemos señalar que el fenon A constituido por 18 cepas (incluyendo las cepas de referencia) de *Escherichia coli*, representa el caso típico de contaminación fecal del producto analizado, resultados que concuerdan con los detectados por Jordano (4) y Power (7). Esto indicaría el poco cuidado en la manipulación de la carne, lo cual al ser molida ofrece una mayor superficie de contacto con su medio ambiente y la hace más susceptible de ser colonizada por insectos voladores, mientras se mantiene la venta en los lugares de expendio. Es necesario destacar que el almacenamiento a temperaturas no adecuadas, la elevada cantidad de proteínas del producto, la carga inicial de bacterias y la escasa atención en el manejo de venta podrían influir en el incremento de los microorganismos contaminantes.

El segundo fenon, con una menor cantidad de cepas fue identificado como *Enterobacter cloacae* de acuerdo a sus características fenotípicas, dado que este

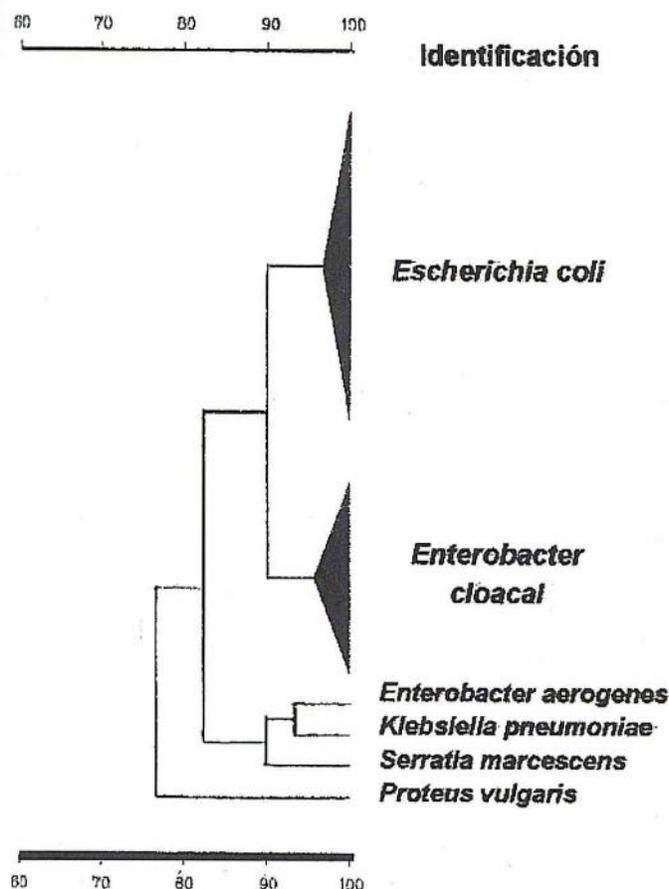


Fig. 1. Dendrograma simplificado mostrando la agrupación de las 33 cepas aisladas del Petrifilms para coliformes, aplicando el índice de semejanza de Ssm y la técnica de agrupación UPGMA

son altamente coincidentes con la especie señalada de bacteria. Este microorganismo es frecuentemente aislado del hombre y los animales de sangre caliente. Como patógeno es importante en los hospitales especialmente en las unidades de cuidado intensivo y salas de urología (2).

Ambos fenones se encuentran constituidos por microorganismos Gram negativos de forma bacilar corta y anaerobios facultativos, pertenecientes a la Familia *Enterobacteriaceae*, cuyos miembros se encuentran muy difundidos en la naturaleza, por ser microorganismos poco exigentes nutricionalmente, siendo su hábitat principal el intestino del hombre y animales (7). Dado lo anterior, es posible señalar que pueden llegar a ser contaminantes serios de las carnes.

El análisis de taxonomía numérica, permitió dividir al grupo de 33 cepas con coloración azul y formadoras de gas, en dos grupos característicos de enterobacterias, encontrándose en un mayor número el indicador de contaminación fecal *Escherichia coli*. Esto indica que el método de Petrifilm para coliformes, proporciona una buena guía de identificación presuntiva de este microorganismo, entregando un panorama del estado sanitario del alimento en 18 a 24 horas.

En posteriores estudios se podrá evaluar en detalle este método ampliando el número de cepas y de pruebas de identificación.

REFERENCIAS

1. **Bacteriological Analytical Manual.** (1995). 8th Edition. AOAC International. MD.USA.
2. **Haba, J.H & Pérez, D.F.**(1992). Sistemática Bacteriana. Ed. Valencia, España.
3. **International Commission on Microbiological Specification for Foods (ICMSF)** (1990). Microorganisms in food, Vol 1. Their significance and methods of enumeration. Univ. Press. Toronto.
4. **Jordano, R.; López, C.; Rodríguez, V.; Cordova, G.; Medina, L.M.; Barrios, J.** (1995). Comparison of Petrifilm method to conventional methods for enumerating aerobic bacteria, coliforms *Escherichia coli* and yeast and moulds in food. Act. Microbiol. et Immunol. Hung. 42(3) 255-259
5. **McFaddin, J.F.** (1989). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Panamericana.
6. **Marshall, R.T. (ed).** (1992). Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 16 th ed. American Public Health Association, Washington D.C.
7. **Power, C.A.; De Grandis, S.; Jhonson, R.; Rahe, K.; Griffiths, M.; McEwen, S.** (1999). Repeatability of the Petrifilm test and Agreement with a hydrophobic gried membrane filter (HGMF) methods for the enumeration of *Escherichia coli* 0157:H7 on beef carcasses. In Ontario Beef Reserch Updole. pag. 1-4
8. **Sokal, P.H.A. & Michener, C.D.** (1958) A statistical methods for eveluating systematic relationships. Univ. Os Kansas. Sci. Bull. 38: 1409-1438
9. **Sneath, P.H.H & Sokal, R.R.** (1973) Numerical Taxonomy. The principles and practice of Numerical classification. San Francisco, Freeman.