

Medios de cultivo cromogénicos y fluorogénicos para el análisis de muestras de agua y alimentos

Vivian de Jesús Quesada Muñiz, Claudio Rodríguez Martínez y Anna Tsoraeva.

Dpto. de Investigaciones de Medios de Cultivo, Centro Nacional de Biopreparados, Apartado Postal 6048, Habana 6, Cuba.

Recibido: 2 de junio de 1998. Aceptado: 21 de agosto de 1998.

Palabras clave: cromogénicos, fluorogénicos, sustratos, cultivo, agua, alimentos.

Key words: chromogenic, fluorogenic, substrates, culture, water, foods.

RESUMEN. La facilidad en la identificación microbiana y en la interpretación de los medios de cultivo con sustratos cromogénicos y fluorogénicos, ha motivado su amplia utilización en la actualidad. En el análisis de aguas y alimentos se han utilizado, en los últimos años, medios cromogénicos y fluorogénicos para la identificación de especies como *E. coli* y *Salmonella*. Se ha hecho particular énfasis en el grupo coliformes como índice de contaminación fecal. El objetivo del trabajo consistió en demostrar, de forma preliminar, la efectividad de la utilización de algunos medios con sustratos cromogénicos y fluorogénicos en la identificación de microorganismos, fundamentalmente los de la familia *Enterobacteriaceae*. Primeramente, la evaluación se realizó utilizando cepas de colección, comprobando, en todos los casos, una coloración y morfología de las colonias, así como una promoción del crecimiento adecuadas según lo esperado para cada microorganismo en cada uno de los medios. Se realizó la evaluación de dichos medios con muestras de agua y alimentos contaminados para compararlos con los medios y métodos tradicionales. Se detectó la presencia de salmonelas, en carne, y coliformes en muestras de agua y leche. La comparación de los recuentos de *E. coli* y coliformes en las muestras ensayadas se realizó mediante la determinación del Índice Relativo de Crecimiento (IRC), obteniéndose resultados superiores al 94 % en la mayoría de los casos. El tratamiento estadístico realizado no arrojó diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los recuentos, por lo que además de la buena identificación microbiana, con estos medios se logra una buena recuperación, permitiendo el recuento de las especies pertenecientes al grupo coliformes. Se demostró además, la factibilidad de la combinación de reacciones bioquímicas tradicionales con reacciones cromogénicas en la identificación de microorganismos.

ABSTRACT: The possibility of microbial identification and the interpretation of culture media with chromogenic and fluorogenic substrates, have motivated its wide use at present. In the last few years the utilization of this media has become more common in water and food analysis, specially for identification of *E. coli* and *Salmonella*, being focused to determine coliform group as fecal contamination indicator. The objective of the work was to demonstrate, in a preliminary way, the effectiveness of the use of some media with chromogenic and fluorogenic substrates in the identification of microorganisms (*Enterobacteriaceae* family mainly). The first evaluation was based on the use of a collection of microorganisms, confirming in all the tests, that the color and morphology of colonies, as well as the expected growth promotion for each microorganism was as expected for all media. All of them were evaluated with contaminated samples of water and foods. A comparison between these results and those obtained by traditional methods was established. The presence of *Salmonella* in meat and coliforms in water and milk was detected. The Relative Growth Index of *E. coli* and coliforms counts were compared in the assayed samples showing results better than 94 % in most of the cases. The statistical study does not give remarkable differences ($p \leq 0,05$) among the colony counts. This fact demonstrates that in addition to a good microbial identification with these media, it is possible to achieve a good recovery allowing an accurate count of the coliforms group species. The feasibility of the combination of biochemical and chromogenic reactions was demonstrated.

INTRODUCCION

El análisis microbiológico de los alimentos es de vital importancia para evitar el brote de numerosas enfermedades provocadas por microorganismos, dentro de las cuales desempeñan un importante papel algunas enterobacterias como son las del grupo coliforme y *Salmonella*.

Desde 1892, Shardingger sugirió la utilización de la *E. coli* como índice de contaminación fecal porque los miembros de esta especie son más fácilmente recobrados que las especies de *Salmonella*. Posteriormente, se han utilizado las bacterias coliformes como grupo indicador, específicamente las capaces de proliferar a elevadas temperaturas. La tendencia en los últimos años ha sido la detección y recuento de todos los organismos Gram-negativos fermentadores, o sea, los de la familia *Enterobacteriaceae*.¹

Para la detección de estos microorganismos en muestras contaminadas de alimentos existen métodos tradicionales recogidos, en Cuba, en un conjunto de normas donde se establecen los procedimientos a seguir en cada caso.^{2,7} Estos métodos coinciden, en gran medida, con lo recomendado por la American Public Health Association (APHA)⁸ para el análisis de aguas y alimentos. Los procedimientos tradicionales abarcan la preparación de un conjunto de medios de cultivo y materiales auxiliares, así como, la inoculación consecutiva de cada medio durante varios días.

En la actualidad, se han desarrollado medios de cultivo con sustratos cromogénicos y fluorogénicos que

permiten diferenciar con mayor precisión, en menos tiempo e inclusive en una sola placa varios microorganismos.⁹⁻¹¹ Se ha hecho particular énfasis en la diferenciación de *Escherichia coli* basado en la presencia en este microorganismo de la enzima β-glucuronidasa.¹²⁻¹⁶ El objetivo del presente trabajo fue la evaluación de medios de cultivo cromogénicos y fluorogénicos desarrollados a escala de laboratorio en BIOCEN con cepas certificadas de interés y con muestras de alimentos contaminadas, así como, la comparación de estas técnicas con los procedimientos tradicionales.

MATERIALES Y METODOS

Se evaluaron tres medios de cultivo cromogénicos y fluorogénicos desarrollados en BIOCEN estos fueron:

- CROMOCEN SC
- CROMOCEN FCC
- CROMOCEN FE

Se utilizaron los medios de cultivo tradicionales producidos en BIOCEN:

- Caldo lactosado
- Agar S.S.
- Caldo bilis verde brillante
- Agar hierro de Kligler
- Agar violeta rojo bilis
- Agar urea
- Caldo tetrationato
- Agar lisina hierro
- Agar verde brillante
- Agar nutriente

Para la dilución de las muestras se empleó disolución reguladora de peptona al 0,1 %, (Peptona bacteriológica Z, BIOCEN).

Los medios cromogénicos desarrollados fueron evaluados con diferentes microorganismos de colección, entre ellos:

- Escherichia coli* ATCC 25922.
- Escherichia coli* O 157 H7 ATCC 35150.
- Enterobacter aerogenes* ATCC 13048.
- Salmonella typhi* ATCC 7251.
- Salmonella typhimurium* ATCC 14028.
- Shigella flexneri* ATCC 12022.
- Proteus vulgaris* ATCC 13315.

Se evaluaron muestras de carne, leche y aguas contaminadas comparando los resultado por los procedimientos tradicionales y con la utilización de los medios cromogénicos. Las muestras se probaron directamente y realizando diluciones 1/10 y 1/100 de ellas.

A las muestras de alimentos se les determinó:

- la presencia de microorganismos coliformes en leche y aguas.⁴
- la presencia de *Salmonellas* en carnes y derivados.⁵
- la presencia de *Escherichia coli* en leche y aguas.⁶
- el número más probable (NMP) de microorganismos coliformes.⁷

La determinación de la producción de indol se realizó mediante la colocación de un fragmento de papel de filtro en la tapa de las placas del medio CROMOCEN FE, después de 18 h de incubación. Las pruebas positivas mostraron una coloración rosada.

Se determinó el Índice Relativo de Crecimiento (IRC) por la relación:

$$IRC = \frac{\text{Recuento obtenido en el medio experimental}}{\text{Recuento obtenido en el medio control}} \cdot 100$$

Los medios cromogénicos y fluorogénicos evaluados se inocularon directamente con la muestra y con sus diluciones y en algunos casos después del enriquecimiento en un medio de cultivo selectivo.

Se utilizó la prueba t de Student para comparar las diferencias entre las medias de los recuentos microbianos. Los cálculos se realizaron con ayuda del paquete de programas Statistica.

RESULTADOS Y DISCUSION

La diferenciación de los microorganismos en los tres medios evaluados resultó satisfactoria tanto por las reacciones de color o por la fluorescencia emitida (Tablas 1, 2 y 3).

Con el medio CROMOCEN SC se logra una clara diferenciación de las salmonelas no typhi (coloreadas en rojo debido a la metabolización del propilenglicol presente en el medio), responsables de serias infecciones alimenticias, además de la diferenciación de las bacterias del grupo coliforme, las cuales adquieren con una coloración azul verdosa debido a la presencia en este grupo de la enzima β-galactosidasa. Las salmonelas del grupo tifoides permanecen incoloras en el medio al igual que las especies de proteus, presentando este último una ligera inhibición.

En el medio CROMOCEN FCC se diferenció la *Escherichia coli* ATCC 25922 de la cepa O157H7 y de otras enterobacterias. Las bacterias del grupo coliforme mostraron una coloración azul característica por la presencia de la enzima β-galactosidasa y la *E. coli* expuesta a la luz ultravioleta fluoresce, lo que demuestra la existencia en este microorganismo de la enzima β-glucuronidasa. Las restantes enterobacterias permanecen incoloras en el medio.

En este medio se combinan las reacciones cromogénicas con las fluorogénicas y algunas bioquímicas, muy útiles en la diferenciación de enterobacterias tales como: la fermentación del sorbitol y la producción de indol a partir del triptófano. Se logró una buena diferenciación de los microorganismos estudiados teniendo en cuenta que los galactosidasa positivos y negativos al sorbitol debían mostrar una coloración azul verde debida al sustrato cromogénico. Por su parte, los microorganismos glucuronidasa positivos deben

Tabla 1. Evaluación del medio CROMOCEN SC.

Microorganismo	Cepa	Color	
		Del medio	De la colonia
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	rojo naranja	roja
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	naranja	azul verde
<i>Salmonella typhi</i>	ATCC 14028	rojo naranja	incolora
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 13315	rojo naranja	incolora, algo inhibida

Tabla 2. Evaluación del medio CROMOCEN FCC.

Microorganismo	Cepa	Color		Fluorescencia
		Del medio	De la colonia	
<i>Escherichia coli</i> O157H7	ATCC 35150	beige	azul	negativa
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	beige	azul	positiva
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048	beige	azul	negativa
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 13315	beige	incolora	positiva

Tabla 3. Evaluación del medio CROMOCEN FE.

Microorganismo	Cepa	Color		Fluorescencia	Cuento de colonias (dilución 10 ⁵)	Indol
		Del medio	De la colonia			
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12022	naranja (alrededor de la colonia)	rosada	-	136	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	rosado	roja	-	324	.
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 13315	rosado	beige con centro rosado	-	144	+
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	rosado	violeta con halo azul	+	344	+
<i>Aeromonas hidrofila</i>	sp.	naranja (alrededor de la colonia)	azul verde	-	255	+
<i>Escherichia coli</i> O157H7	ATCC 35150	rosado	azul verde	-	- ^a	+

^a Se inoculó por agotamiento del inóculo en la superficie.

fluorescer en presencia de luz ultravioleta, independientemente de su coloración. Las enterobacterias galactosidasas y sorbitol positivas deben colorearse de violeta por la combinación del azul del sustrato con el rojo del indicador de pH. Los microorganismos que son productores de indol mostraron en todos los casos una coloración rosada en el papel de filtro impregnado con reactivo de Kovacs.

Se inoculó en paralelo un medio de propósito general con la misma dilución de *Escherichia coli* con el objetivo de observar si existía algún tipo de inhibición en el medio para los microorganismos coliformes obteniendo un conteo promedio de 342 colonias, por lo que el índice de crecimiento respecto al medio control fue superior al 100 %.

A continuación, se procedió a analizar algunas muestras de alimentos contaminados por el procedimiento tradicional, proceso que se repitió utilizando medios cromogénicos con el objetivo de comparar ambos resultados.

Para la detección de salmonelas en carne, se inocularon diluciones de la muestra directamente en el medio CROMOCEN SC, detectándose en 24 h la presencia de salmonelas, coliformes y otras enterobacterias. Por el método tradicional la muestra debe incubarse en disolución reguladora de peptona, enriquecerse en caldo tetraciónato y posteriormente, inocularse en dos medios diferenciales para este microorganismo, lo que demora el resultado presuntivo de tres a cuatro días. A las colonias sospechosas obtenidas por ambos métodos, se les realizaron las pruebas bioquímicas correspondientes inoculándolas por triplicado en agar hierro de Kligler, agar urea, caldo triptonato (para la prueba de indol) y agar lisina hierro. Se confir-

mó por ambos métodos la presencia de salmonelas.

Para el recuento de microorganismos coliformes en una muestra de leche contaminada se inocularon placas de agar violeta rojo bilis (VRB) y, en paralelo, se realizó la detección y conteo con los medios cromogénicos CROMOCEN FCC (CFCC) y CROMOCEN FE (CFE) que permitieron, además del conteo de coliformes (coloreados en azul o violeta), la diferenciación de las colonias de *E. coli* entre otros coliformes por la emisión de fluorescencia al ser iluminadas con luz ultravioleta. Los resultados obtenidos se confirmaron con la aparición de gas en tubos de caldo bilis verde brillante inoculados con las colonias sospechosas por ambos métodos (Fig. 1).

El tratamiento estadístico se realizó mediante la prueba t de Student. No se encontraron diferencias significativas entre las medias. El índice de crecimiento del medio CROMOCEN FE respecto al agar violeta rojo bilis (IRC) resultó del 97,4 % y el del CROMOCEN FCC, del 86,1 % por lo que la recuperación de coliformes en ambos medios fue muy cercana a la del medio tradicional.

A esta muestra se le determinó el número más probable de microorganismos coliformes por la inocula-

ción de cinco tubos de caldo lactosado y resiembra de los positivos en caldo bilis verde brillante y se observó la producción de gas en los cinco tubos inoculados, por lo que el número más probable, en este caso, se consideró mayor que 16 organismos coliformes por 100 mL de muestra, lo que coincidió con el recuento realizado con los medios agarizados tradicional y cromogénicos.

Se inocularon además, dos muestras de agua en el agar violeta rojo bilis y en el medio CROMOCEN FE (Fig. 2). En las dos muestras de agua analizadas no se observaron diferencias significativas en cuanto a las medias de los recuentos de microorganismos coliformes y el IRC fue de 125 % para la muestra 1 y de 94,4 % para la 2. La diferenciación de *Escherichia coli* fue muy clara en el medio por fluorescencia, producción de indol y fermentación del sorbitol, lo que evidencia las ventajas de la utilización de este medio cromogénico.

CONCLUSIONES

Se demostró la funcionalidad de los medios CROMOCEN SC, CROMOCEN FCC Y CROMOCEN FE en la diferenciación de enterobacterias.

Se comprobó la factibilidad de la combinación de varias reacciones bioquímicas como la fermentación

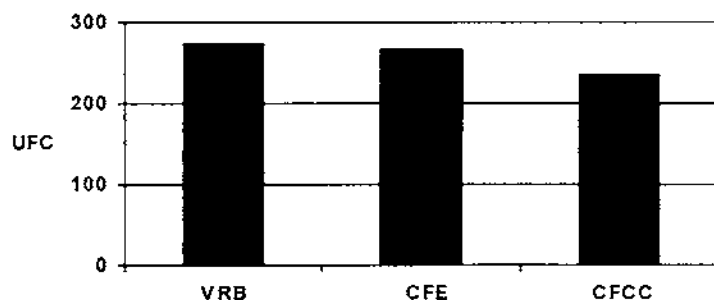


Fig. 1. Conteo de coliformes totales en leche obtenidos con el medio tradicional y con los medios cromogénicos.

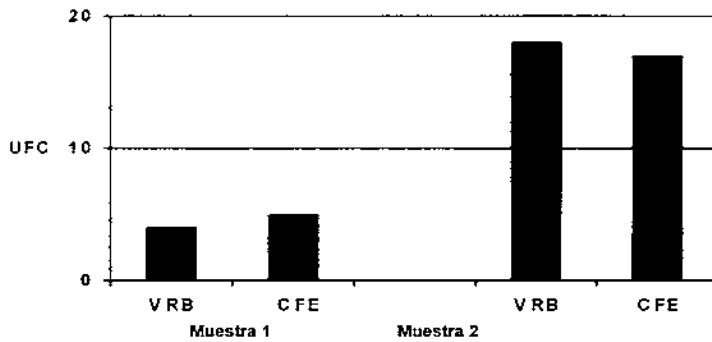


Fig. 2. Conteo de coliformes totales en agua.

del sorbitol y la producción de indol, con reacciones cromogénicas y fluorogénicas, para la diferenciación de varias especies de microorganismos de interés en alimentos.

Se evaluaron diferentes muestras de alimentos contaminados lográndose una buena detección y diferenciación de *Salmonella*, *E. coli* y coliformes sin necesitar, en la mayoría de los casos, de un medio de aislamiento o enriquecimiento, lo que aventaja a los métodos tradicionales en cuanto al tiempo mínimo requerido para el diagnóstico y ahorra recursos materiales y humanos.

El número más probable de microorganismos coliformes presentes en la muestra coincidió con el resultado obtenido utilizando los medios cromogénicos por lo que el recuento directo en estos medios podría sustituir el método del *Número más Probable* en estudios más completos.

La determinación del IRC, permite comprobar la buena recuperación de los microorganismos pertenecientes al grupo coliformes en los medios evaluados, no existiendo di-

ferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las medias de los recuentos obtenidos en los medios experimentales y tradicionales utilizados.

BIBLIOGRAFIA

1. Mossel D.A.A. Media for *Enterobacteriaceae*. *Int. J. Food Microbiol.*, 2, 27, 1985.
2. NC 76-02. Preparación de medios de cultivo y reactivos. Comité Estatal de Normalización, Cuba, 1982.
3. NC 76-03. Preparación de la porción de ensayo. Comité Estatal de Normalización, Cuba, 1982.
4. NC 76-04-3. Determinación de microorganismos coliformes. Comité Estatal de Normalización, Cuba, 1982.
5. NC 76-04-8. Búsqueda e Identificación de salmonelas. Comité Estatal de Normalización, Cuba, 1982.
6. NC 76-04-11. Determinación de *E. coli*. Comité Estatal de Normalización, Cuba, 1982.
7. NC 76-04-4. Determinación del número más probable de microorganismos coliformes. Comité Estatal de Normalización, Cuba, 1982.
8. Speck (ed.). Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 2nd edition. APHA. Washington D.C., 1984.

9. Merlino J., Siarakas S., Robertson G. J., Funnell G.R., Gottlieb T., Bradbury R. Evaluation of CHROMagar Orientation for differentiation and presumptive identification of Gram-negative bacilli and *Enterococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 1788, 1996.
10. Martin C., Orenga S., Doleans F., Denis F. Interest of the use of media with chromogenic substrates for the identification and the enumeration of urinary microorganisms. *Pathol.-Biol.*, 43, 749, 1995.
11. Manafi M., Kneifel W. Fluorogenic and Chromogenic Substrates used in Bacterial Diagnostics. *Microbiological Reviews*, 55, 335, 1991.
12. Pellizari V.H., Pedroso D.M., Kirschner C.C., Silva L.A.G., Martins M.T. Assessment of media using beta -D-glucuronidase activity for the detection of *Escherichia coli* in water. *Rev. Microbiol.*, 24, 182, 1993.
13. Sartory D.P., Howard I. A medium detecting beta -glucuronidase for the simultaneous membrane filtration enumeration of *Escherichia coli* and coliforms from drinking water. *Let. Appl. Microbiol.*, 15, 273, 1992.
14. Augoustinos M.T., Grabow N.A., Genthe B. and Kfir R. An improved membrane filtration method for enumeration of faecal coliforms and *E. coli* by a fluorogenic β -glucuronidase assay. *Wat. Sci. Tech.*, 27, 267, 1993.
15. Jermini M., Domeniconi F., Jaeggli M. Evaluation of C-EC-agar, a modified m-FC agar for the simultaneous enumeration of faecal coliforms and *Escherichia coli* in water samples. *Let. Appl. Microbiol.*, 19, 332, 1994.
16. Ciebin B. W. et al. Comparative evaluation of modified m-FC and m-TEC media for membrane filter enumeration of *Escherichia coli* in water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 3940, 1995.