

DETERMINACIÓN RÁPIDA DE COLIFORMES Y *E. COLI* EN CHORIZO MEDIANTE PROCEDIMIENTOS IMPEDIMÉTRICOS

M.^a Jesús Periago*, Gonçalo Almeida** y M.^a João Monteiro**

RESUMEN

En el presente trabajo se ha estudiado la utilización de las técnicas impedimétricas en la detección rápida de coliformes y *E. coli* en chorizo. Se seleccionaron dos muestras de chorizo, una contaminada por coliformes y *E. coli* de forma natural y otra inoculada. La cantidad de coliformes y la presencia/ausencia de *E. coli* en las muestras, fueron determinadas por los métodos clásicos de análisis microbiológico (utilizando agar bilis-rojo-violeta, VRBA, y caldo verde brillante, BGB) y por las técnicas impedimétricas utilizando el medio para coliformes (CM) y el medio CM con adición de 4-metilumbelliferol- β -D-glucuronido (reactivo de MUG) para la detección de *E. coli*. El tiempo de detección presentó un buen coeficiente de regresión ($r = 0.93$) con el logaritmo decimal UFC determinadas en VRBA para las muestras problemáticas. En general, las técnicas impedimétricas permiten cuantificar el número de coliformes en muestras de chorizo cuando el número de microorganismos supera las 50 UFC/g. Además, permiten detectar la presencia/ausencia de *E. coli*, mediante la hidrólisis del reactivo de MUG, que origina un sustrato fluorescente a 366 nm.

SUMMARY

In the present research have been studied the use of the rapid impedimetric procedures to the detection of the coliforms and *E. coli* in meat cured sausages, called «chorizo». Two samples of meat cured sausages were selected, one of this was naturally contaminated with coliforms and *E. coli*, and the other one was inoculated. Total coliforms and *E. coli* were determined following classic methods (violet red bile agar, VRBA, and brilliant green broth, BGB) and impedimetric procedures using coliform medium (CM) and CM with 4-methylumbelliferone- β -D-glucuronide (MUG reagent) for detection of *E. coli*. The detection time showed a high regression coefficient ($r = 0.93$) with the UFC logarithm detected in the VRBA in the studied samples. In general, the impedimetric procedures give the estimation of coliforms in the cured meat sausages, when the number of microorganism is up 50 UFC/g. Moreover, give the detection of *E. coli* for the hydrolysis of MUG reagent, releasing a fluorescent substrate at 366 nm.

INTRODUCCION

La importancia del control sanitario durante el procesado de los alimentos es fundamental para determinar la calidad microbiológica del producto final (Rowley y col., 1979). Así, durante la fabricación de los alimentos es necesario conocer la calidad microbiológica tan rápidamente como sea posible, para disminuir el riesgo de que artículos contaminados lleguen al consumidor.

* Unidad Docente de Bromatología e Inspección de Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus Universitario de Espinardo, 30071, Murcia, España.

** Centro de Qualidade Alimentar, Escola Superior de Biotecnologia, Centro Regional do Porto da Universidade Católica Portuguesa, Rua Dr. Antonio Bernardino de Almeida, 4200 Porto, Portugal.

El número de coliformes en los alimentos es usado como indicador de la calidad microbiológica, y da una indicación general de la contaminación (incluida fecal) durante la manipulación de los alimentos (Speck, 1976). Los métodos clásicos utilizados para enumerar coliformes incluyen la técnica del número más probable (NMP) y las pruebas en placa con agar bilis-rojo-violeta (VRBA). Estas pruebas requieren un período comprendido entre 48-72 horas para obtener resultados fiables (Pascual Anderson, 1992).

Para reducir el tiempo de análisis, métodos rápidos de detección y enumeración de bacterias han sido desarrollados, con la finalidad de ser aplicados durante el procesado de los alimentos y poder aplicar las consiguientes acciones correctivas (Martínez y Rodrigo, 1987;

Barcina y col., 1989). Entre todas las técnicas rápidas de análisis microbiológicos, el método basado en la impedancia es el que presenta un mayor potencial de aplicación a la industria alimentaria. La actividad microbiana se detecta por la medida de la impedancia eléctrica del medio, la cual se ve modificada como consecuencia de los cambios químicos del medio, inducidos por el crecimiento de los microorganismos. Así, en un momento de ensayo la concentración de iones generados por las bacterias alcanza una determinada magnitud que origina un cambio en la impedancia, momento que se corresponde con el denominado tiempo de detección (Martínez y Rodrigo, 1987). El uso de técnicas impedimétricas para la enumeración de microorganismos, incluidos coliformes, ha sido aplicado en diversos

alimentos como son la carne (Martins y Selby, 1980; Firstenberg-Eden, 1983), los vegetales congelados (Hardy y col., 1977), la leche y productos lácteos (Firstenberg-Eden y col., 1984) y los quesos (Khayat y col., 1988). Las ventajas aportadas por este tipo de técnicas radican en una mayor rapidez de obtención de los datos, menor manipulación y mayor capacidad de análisis simultáneo y multiparametricidad.

La detección y enumeración de coliformes totales y *E. coli* en carnes y productos cárnicos puede realizarse mediante la utilización de medios específicos para dichas técnicas impedimétricas como son el medio para coliformes (CM) (Firstenberg-Eden y Klein, 1983) y el medio CM modificado con adición del reactivo de MUG (4-metilumbelliferrone- β -D-glucuronido) para la detección de *E. coli* (Rule, 1991). El reactivo MUG pone en evidencia la presencia de este microorganismo, al actuar la β -glucuronidasa presente en el 95-97% de las cepas de *E. coli* sobre el reactivo, lo que determina la aparición de un color fluorescente visible con una longitud de onda de 366 nm (Rule, 1991; Ferg y Hartman, 1982).

El objetivo del presente estudio ha sido evaluar la utilización de técnicas impedimétricas para la determinación del número de coliformes y la determinación de la presencia/ausencia de *E. coli* en chorizo, comparando los resultados con las técnicas clásicas de identificación y conteo de estos microorganismos.

MATERIAL Y METODOS

Muestras

Dos muestras de chorizo una de ellas contaminada de forma natural y otra inoculada con bacterias coliformes y *E. coli*, fueron utilizadas en el presente estudio. Las muestras correspondieron a dos productos elaborados en Portugal, y fueron analizadas cada una de ellas diez veces para comparar los resultados obtenidos mediante los métodos clásicos de análisis y los métodos impedimétricos.

Medios

Agar bilis-rojo-violeta (VRBA, núm. ref. 10275, Merck) fue utilizado para el

conteo de coliformes, mientras que el caldo verde brillante (BGB, Núm. ref. LAB 51, LABM) fue utilizado para confirmar las colonias típicas desde las placas de VRBA, mediante la formación de gas. El medio específico para la determinación de coliformes mediante técnicas impedimétricas (CM, núm. ref. 99061, BioMérieux) descrito por Firstenberg-Eden y Klein (1982) fue utilizado como método específico para la detección de coliformes. El medio CM (núm. ref. 99061, BioMérieux) con adición del reactivo MUG (Mug Supplement, núm. ref. BR 0171E, Oxoid) se utilizó para la detección de *E. coli*.

Procedimiento de conteo en placa

Tres diluciones de cada muestra fueron sembradas en placa con VBRA y las placas fueron incubadas a 30 ± 1 °C durante 48 horas, contando las colonias típicas de color rojo oscuro con un tamaño superior a 0,5 mm. Las colonias individuales fueron transferidas a tubos de ensayo con caldo BGB provistos de campana de Durham, incubándolos durante 48 horas a 30 ± 1 °C. El número de tubos positivos con formación de gas fue multiplicado por el número total de colonias para conocer así el número real de coliformes presentes en la muestra problema. Para la determinación de la presencia/ausencia de *E. coli*, a partir de las muestras positivas en BGB se realizó una siembra en agua de peptona y BGB, incubando las muestras a $44,5 \pm 0,5$ °C durante 48 horas. Tras la incubación se determinaron las muestras con presencia de *E. coli*, mediante el desprendimiento de gas y la reacción indol positiva.

Método impedimétrico

Para la identificación de coliformes y *E. coli* en las muestras problemas, se partieron de tres diluciones de cada muestra. Un volumen de 0,1 ml de cada una de las diluciones fue adicionado por siembra en superficie a cada una de las celdillas de las unidades de análisis, conteniendo 1 ml del medio específico para coliformes y del medio específico para *E. coli*, incubándolas posteriormente a 30 ± 1 °C y a $44,5 \pm 0,5$ °C, respectivamente, en cada uno de los módulos

de un Bactometer modelo 64 (Microbial Monitoring System, Vitek System, Inc., Hazelwood, Missouri, USA). Tras la incubación, las muestras positivas al crecimiento de *E. coli* fueron sometidas a un test para la confirmación de la presencia del microorganismo. Para ello, a aquellas celdillas que habían virado el medio de color desde púrpura a amarillo, se les adicionó 100 μ l de tampón Tris 1M a pH 8, preparado de acuerdo al método R-100 de la novena edición del *B.A.M. Manual*. El tampón Tris adicionado a las muestras sospechosas, alcaliniza el medio y permite la actividad de la enzima β -glucuronidasa que actúa sobre el reactivo MUG, dando lugar a un compuesto fluorescente que se visualiza a 366 nm.

RESULTADOS Y DISCUSION

La figura 1 muestra los cambios de impedancia detectados en el medio CM tras el crecimiento de los microorganismos coliformes presentes en las muestras de chorizo estudiadas. Durante el periodo necesario para la detección del crecimiento se producen además cambios de pH en el medio, que conlleva a una variación del indicador, el cual cambia de púrpura a amarillo. Los microorganismos que fermentan rápidamente la lactosa, capaces de producir gas en BGB, son los responsables del cambio de color.

La figura 2 muestra el análisis de regresión entre el logaritmo de las unidades formadoras de colonias, determinadas por los métodos clásicos y el tiempo de detección empleado para determinar el crecimiento de coliformes mediante la utilización de técnicas impedimétricas, para cada una de las diluciones de las muestras estudiadas. En estudios previos en los que se ha utilizado el Bactometer Microbial Monitoring System, se ha observado que el tiempo de detección proporciona una buena medida del total de microorganismos en varios alimentos (Hardy y col., 1977; Martins y Selby, 1980; Firstenberg-Eden, 1983; Martínez y Rodrigo, 1987). El coeficiente de regresión entre el tiempo de detección proporciona una buena medida del total de microorganismos en varios alimentos (Hardy y col., 1977; Martins y Selby, 1980; Firstenberg-Eden, 1983; Martínez y Rodrigo, 1987).

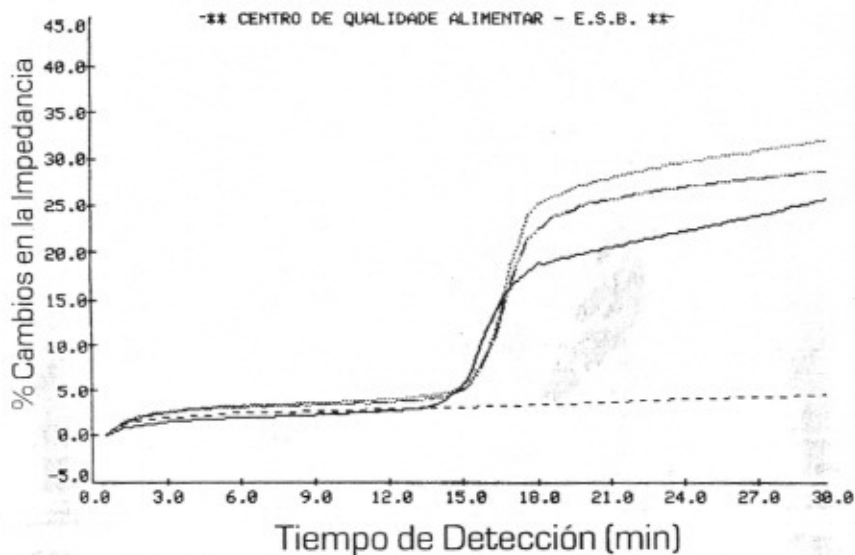


Fig. 1. Representación gráfica de los cambios típicos de impedancia observados en el medio CM durante el proceso de determinación de coliformes en chorizo. El momento del aumento de la impedancia del medio se corresponde con el tiempo de detección.

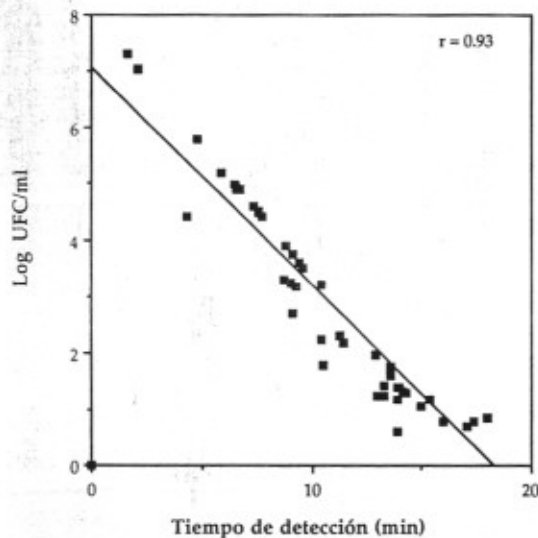


Fig. 2. Representación gráfica de la recta de calibrado para coliformes obtenida entre el tiempo de detección determinado con el bacteriometer Microbial Monitoring System y el logaritmo decimal de las UFC/ml determinadas mediante los métodos clásicos de análisis microbiológico en VRBA.

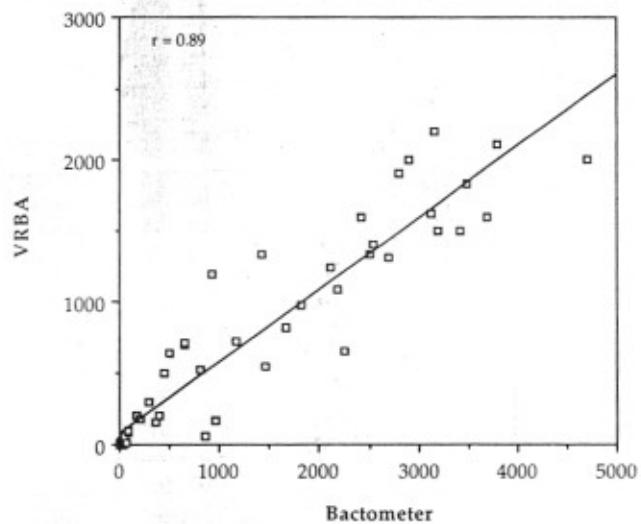


Fig. 3. Representación gráfica de la nube de puntos entre el número de UFC/g de chorizo determinadas por el método clásico de siembra en VRBA comparado con el método impedimétrico.

El coeficiente de regresión entre el tiempo de detección y el logaritmo del número de unidades formadoras de colonias en los métodos impedimétricos para la identificación y conteo de coliformes ha sido considerado bajo ($r = 0,77$, Firstenberg-Eden y Klein, 1983). Para ello, en el momento de realizar este estudio de regresión es necesario aplicar un índice de corrección, ya que algunos de los microorganismos no

coliformes (*Vibrio*, *Proteus* y *Achromobacter*) son capaces de crecer en VRBA (Hartman, 1960; Rosen y Levine, 1970), por lo que se deben confirmar las colonias típicas de VRBA en BGB. Una vez confirmadas y aplicado al valor de corrección al número de unidades formadoras de colonias inicialmente obtenido, el índice de regresión entre el tiempo de detección y el logaritmo de las unidades formadoras de colonias se

incrementa, llegando a un valor de 0,93, quedando establecido la relación por una ecuación lineal con una pendiente de $-0,43$, similar a los valores mostrados por Firstenberg-Eden (1983) para la estimación de microorganismos totales en carne.

Martins y Selby (1980) determinaron que las muestras de productos cárnicos que dan tiempos de detección superiores a las 20 horas deben ser tratadas como negativas, ya que por encima de este tiempo existe un débil crecimiento que no es suficiente para inhibir el crecimiento de los microorganismos no coliformes, por lo que se considerarían errores en las técnicas al darlos como falsos positivos. Del análisis de regresión realizado, y de acuerdo a la recta de calibrado (figura 2), observamos que aquellas muestras con un tiempo de detección superior a las 20 horas darían

valores negativos, por lo que la técnica no sería específica para determinar este tipo de microorganismos en muestras de chorizo.

La figura 3 muestra la relación entre el número de unidades formadoras de colonias, de microorganismos coliformes, determinadas por los métodos clásicos de vertido en placa con VRBA confirmadas en BGB, y las determinadas según la recta de calibrado obtenida

para el método impedimétrico utilizando el Bactometer Microbial Monitoring System. En general existe una buena relación entre ambos métodos existiendo una linealidad entre la nube de puntos representada. El análisis de regresión realizado entre ambos parámetros pone de manifiesto un coeficiente de regresión alto con un valor de $r = 0,89$.

En general comparando con otros métodos actualmente disponibles para la determinación de coliformes en alimentos, las técnicas impedimétricas son simples de ejecutar proporcionan resultados automáticamente en un período de 24 horas, y además la determinación de la carga microbiana en función del tiempo de detección requiere únicamente una dilución de la muestra, lo que repercute directamente en un ahorro de dinero y trabajo. Así, tras el estudio aquí presentado podemos decir que las técnicas impedimétricas pueden ser aplicadas a la determinación de coliformes en productos cárnicos curados y concretamente en chorizo, para asegurar de forma rápida la calidad microbiológica del producto final. En la tabla 1 queda recogida la relación entre el tiempo de detección y la carga de coliformes presentes inicialmente en la muestra, lo que permite claramente agrupar las muestras de estudio en tres grupos. Aquellas muestras con una carga microbiana inferior a 50 ufc/g de chorizo dieron tiempos de detección superiores a 20 min. Tal y como se ha mencionado anteriormente estas muestras darían valores negativos en nuestra recta de calibración, por lo que las muestras con menos de 50 ufc/g deberían ser analizadas siguiendo métodos clásicos microbiológicos cuando lo que se quiere es cuantificar el número de microorganismos. Sin embargo, sí sería válida la técnica im-

pedimétrica para determinar la presencia/ausencia de estos microorganismos. En las muestras con una carga microbiológica entre 50 y 500 ufc/g, el tiempo de detección oscilaría entre 13-20 min, mientras que para las muestras con más de 500 ufc/g se requieren tiempos de análisis menores a los 13 minutos. Estos resultados están de acuerdo con el hecho de que este tipo de análisis requiere niveles umbrales de bacterias, cuando se quiere proceder a un proceso de cuantificación de la carga bacteriana presente en la muestra problema (Martínez y Rodrigo, 1987).

En cuanto al crecimiento de *E. coli*, la presencia de este microorganismo en las muestras de chorizo estudiadas se realizó mediante la utilización de métodos clásicos y mediante la técnica impedimétrica utilizando el medio CM modificado por adición del reactivo MUG (Rule, 1991). Todas aquellas muestras en la que se detectó la presencia de *E. coli* mediante métodos clásicos, fueron igualmente positivas con el método impedimétrico. Aunque en este caso, las curvas de crecimiento, mostraron distintos tiempos de detección en función de la carga de *E. coli* presente inicialmente en la muestra. A las muestras que dieron positivas al cambio de color del medio CM a amarillo tras la incubación a $44,5 \pm 0,5$ °C, se les adicionó el reactivo de MUG dando lugar al compuesto fluorescente a 366 nm, que determina la presencia de este microorganismo. Por lo que la técnica impedimétrica utilizando el medio CM más reactivo MUG es adecuada para presenciar *E. coli* en las muestras de chorizo. No obstante, este medio puede presentar una pequeña limitación cuando las muestras están contaminadas por *E. coli* O157:H7, ya que este serotipo no da una reacción fluorescente (Rule, 1991), por lo que no podría determinarse y la muestra podría resultar como un falso positivo a la presencia de *E. coli*. Sin embargo, la presencia de este serotipo en carnes es relativamente bajo, sobre todo en carne de cerdo en la cual únicamente un 2 % de las 50 muestras analizadas, dio positivo a la presencia de *E. coli* O157:H7 (Benezet y col., 1995).

La legislación portuguesa no establece ninguna especificación en cuanto a la calidad microbiológica que debe de reunir el chorizo destinado al mercado

nacional (Anónimo, 1987). Sin embargo, sí que existen unos patrones bacteriológicos de la carga microbiana que se estima adecuada en los alimentos conservados como son los productos cárnicos curados, entre los que se incluye el chorizo. De acuerdo a este patrón los microorganismos coliformes y *E. coli* deben estar ausentes en 0,01 g y 1 g de producto. De este modo, podemos establecer que las técnicas impedimétricas son válidas para la realización de un control de calidad microbiológica en productos cárnicos curados y concretamente en chorizo, ya que los niveles admisibles pueden ser perfectamente obtenidos mediante el tiempo de detección, debido a que la presencia de cualquier microorganismo coliforme o *E. coli* daría un cambio en la impedancia del medio que pondría en evidencia su presencia.

BIBLIOGRAFIA

- Anónimo (1967): «Normalização Portuguesa NP 149. Géneros alimentícios conservados».
- Anónimo (1987): «Norma Portuguesa. Carnes, derivados e productos carneos», Instituto Português da Qualidade, DR III Serie núm. 70.
- Barcina, Y.; Mora, T., y Herrera, A. (1989): «Métodos de detección rápida en microbiología de alimentos», *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 29, 149.
- Benezet, A.; De la Osa, J. M.; Botas, M.; Olmo, N., y Pérez Flórez, F. (1995): «Presencia de *Escherichia coli* O157:H7 en carnes y productos cárnicos españoles», *Alimentaria*, mayo, 51.
- Feng, P. C., y Hartman, P. A. (1982): «Fluorogenic assay for immediate confirmation of *E. coli*», *Applied and Environmental Microbiology*, 43, 1320.
- Firstenberg-Eden, R. (1983): «Rapid estimation of the number of microorganisms in raw meat by impedance measurement», *Food Technology*, enero, 64.
- Firstenberg-Eden, R., y Klein, C. S. (1983): «Evaluation of a rapid impedimetric procedure for the quantitative estimation of coliforms», *Journal of Food Science*, 48, 1307.
- Firstenberg-Eden, R.; Van Sise, M. L.; Zindulis, J., y Khan, P. (1984): «Impedimetric estimation of coliforms in dairy products», *Journal of Food Science*, 49, 1449.
- Hardy, D.; Kraeger, S. J.; Dufour, S. W., y Cady, P. (1977): «Rapid detection of microbial contamination in frozen vegetables by automated impedance measurements», *Applied and Environmental Microbiology*, julio, 14.
- Hartman, P. A. (1960): «Further studies on the selectivity of violet red bile agar», *Journal of Milk and Food Technology*, 23, 45.
- Khayat, F. A.; Bruhn, J. C., y Richardson, G. H. (1988): «A survey of coliforms and *Staphylococcus aureus* in cheese using impedimetric and plate count methods», *Journal of Food Protection*, 51, 53.

TABLA 1

Distribución de microorganismos coliformes en chorizo. Comparación de UFC/g con el tiempo de detección empleado en la determinación impedimétrica

Métodos clásicos UFC/g	Tiempo de detección min
< 50	> 20
50-500	13-20
> 500	>13

Martínez, A., y Rodrigo, M. (1987): «Métodos rápidos en el análisis microbiológico de alimentos», *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 27, 1.

Martins, S. B., y Selby, M. J. (1980): «Evaluation of rapid method for the quantitative estimation of coliforms in meat by impedimetric procedures», *Applied and Environmental Microbiology*, 39, 518.

Pascual Anderson, M. R. (1992): «Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas», Ed. Diaz de Santos, S. A., Madrid.

Rosen, A., y Levine, R. E. (1970): «Vibrios from fish pen slime which mimic *Escherichia coli* on violet red bile agar», *Applied Microbiology*, 20, 107.

Rowley, D. B.; Vandemark, P.; Johnson, D., y Shattuck, E. (1979): «Resuscitation of stressed

fecal coliforms and their subsequent detection by radiometric and impedance techniques», *Journal of Food Protection*, 42, 335

Rule, P (1991): «Understanding Mug», Tek Talk, BioMérieux Vitek Inc.

Speck, M. L. (1976): «Compendium of methods for the microbiological examination of foods», *American Public Health Association*, Washington, DC.

alimentalex

Biannual Publication—Publication semestrielle—Publicación semestral

International
FOOD LAW Review
 Revue Internationale de
DROIT DE L'ALIMENTATION
 Revista Internacional de
DERECHO ALIMENTARIO

	1989	1990	1991	1992
	N.º 1 y 2	N.º 3 y 4	N.º 5 y 6	N.º 7 y 8
— Abonnement: (2 números)	7.500 PTA	7.500 PTA	8.500 PTA	9.000 PTA
— Subscription: (2 issues)	1993	1994	1995	1996
— Subcripciones: (2 números)	N.º 9 y 10	N.º 11 y 12	N.º 13 y 14	N.º 15 y 16
	9.500 PTA	10.000 PTA	10.000 PTA	10.000 PTA
	1988	1990	1992	1994
	N.º 1	N.º 2	N.º 3	N.º 4
Especial number Número special Número especial	4.000 PTA	4.000 PTA	GRATUITO	GRATUITO

(*) Más 4% de IVA y gastos de envío.