

## RECUESTO DE *Staphylococcus aureus* Y DE COLIFORMES, CON PREVIA RECUPERACION DE CELULAS INJURIADAS

F. C. González (1), María C. Mans de Marión (1), y Laura Fantuzzi (1)

Recibido: 3/6/83

Aceptado: 5/9/83

### RESUMEN

En el presente trabajo se analizaron 20 muestras de leche en polvo con el objeto de determinar el porcentaje de células injuriadas de *Staphylococcus aureus* y de coliformes durante los procesos de elaboración de dicho producto (calor y desecación).

Estas muestras fueron seleccionadas de un total de 80 por haber sido detectada en ellas presencia de *Staphylococcus aureus*. Se siguió una metodología de aceptación general (Speck, 1976) y las determinaciones fueron efectuadas con y sin recuperación previa de células injuriadas.

Se encontró que el porcentaje de células injuriadas osciló entre el 18,5 y el 77,7 por ciento en el caso de *Staphylococcus aureus* y entre el 25 y el 62,5 por ciento, en el caso de los coliformes. Cuando no se observó aumento en el recuento, con previa recuperación de células injuriadas, debe asumirse que la contaminación es posterior a la elaboración.

En el caso de las bacterias coliformes, esta contaminación posterior parece más factible y los numerosos recuentos negativos se explican por el muy bajo porcentaje de supervivencia a los procesos de elaboración de la leche en polvo: 0,002 por ciento (Chopin, Mocquot y Le Graet, 1977).

### ENUMERATION OF *Staphylococcus aureus* AND COLOFORMS WITH PREVIOUS RECOVERY OF INJURED CELLS

### SUMMARY

This paper deals with the analyze of 20 powdered milk samples to determine the percentage of injured cells of *Staphylococcus aureus* and coliforms during the elaboration process of the product (heat and drying).

These samples were selected from 80 samples because of the detection in some of them of *Staphylococcus aureus*.

A methodology of universal general acceptance was used (Speck, 1976).

The analyzes were done with and without previous cells recovery.

The percentage of injured cells was between 18,5 and 77,7 in *Staphylococcus aureus*, and 25 and 62,5 per cent in coliforms. When the enumeration was not improved with previous cells recovery, the contamination may be after the elaboration. In coliforms bacteria this last contamination is more common and the great number of negative enumeration is due to a low percentage of cell survival during the elaboration process of powdered milk (0,002 por cent).

---

(1) Cátedra de Microbiología Agrícola, Departamento de Industrias Agrícolas y Alimentarias, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Av. San Martín 4453, (1417) Buenos Aires, Argentina.

## INTRODUCCION

Diversos trabajos (Clark, *et al.*, 1968; Hurst, 1977; Postgate y Hunter, 1963; Straka y Stokes, 1959) han demostrado que las células bacterianas pueden ser afectadas en su estructura o en sus funciones metabólicas por diferentes tratamientos subletales como desecación, congelamiento, calentamiento, radiación, alta presión osmótica generada por sal o azúcar, acción de sustancias agresivas como detergentes, ácidos, conservadores, etc.. Estos tratamientos son corrientes en la elaboración de los alimentos, de modo que es dable esperar que en dichos productos se tenga, dentro de la microflora existente en los mismos, una cierta cantidad de células con daño subletal (estructural o metabólico). Las bacterias así dañadas se denominan "injurias" o "estresadas" y son incapaces de reproducirse en medios pobres en nutrientes o que contengan sustancias selectivas.

Como en las determinaciones o recuentos de los microorganismos toxicogénicos o patógenos o indicadores, en las diversas técnicas que se emplean en los controles bacteriológicos de alimentos, se utilizan medios selectivos, se tienen el problema de que las células injuriadas subletalmente de tales microorganismos, no aparecerán en los resultados comportándose, pues, como si no estuviesen vivas. Sin embargo, esas células injuriadas tienen la capacidad de "recuperarse" o "repararse" en un medio rico en nutrientes y libre de agentes selectivos o agresivos. De tal modo, podría suceder que un cierto porcentaje de células injuriadas no apareciese en las pruebas bacteriológicas de control pero que sí prosperasen posteriormente en el alimento al llegar a recuperarse en él. Por lo tanto, es de suma importancia lograr la recuperación de tales células injuriadas, previamente al análisis bacteriológico de rutina. Existen técnicas desarrolladas para lograr esa recuperación (Houster, 1972; Speck, 1976; Baird Parker, 1965; Powers y Latt, 1978). La recuperación de las células injuriadas puede hacerse en un medio rico en nutrientes y ca-

rente de agentes selectivos y con una incubación cuya temperatura y tiempo sean tales que permitan dicha recuperación pero no la multiplicación de las células, ya fueren éstas injuriadas o sanas. Así pues, el aumento de los recuentos debido a las técnicas de reparación de injuriados debe corresponder sólo a la reparación de células dañadas pero no a multiplicación celular.

La injuria celular puede ser de variada naturaleza (Hurst, 1977; Ray, 1979): daño en la estructura superficial; lipopolisacáridos, de la pared celular de los Gram negativos (Hichener y Eagn, 1977; Hurst, 1977); probable deterioro de los ácidos teicoicos de la pared celular de los Gram positivos (Hoover y Gray, 1977); daño en la estructura y selectividad de la membrana celular (Jackson, 1974; Russell y Harris, 1968; Strange y Postgate, 1964); daño en la estructura de algunas enzimas (Tomlins, Pierson y Ordal, 1971); daño en los ribosomas (Allwood y Russell, 1970); daño en el ADN (Ohnishi, *et al.*, 1977; Sedgewick y Bridges, 1972).

Las células injuriadas, cualquiera sea el daño que presenten, se caracterizan por su sensibilidad a los agentes selectivos pues, como se ha dicho, no son capaces de reproducirse en presencia de tales agentes. Una sustancia selectiva es capaz de inhibir el desarrollo de ciertos microorganismos pero no el de los que se desea cultivar, ya que las barreras de permeabilidad de éstos últimos son capaces de evitar el ingreso a la célula de las sustancias selectivas, cosa que no pueden hacer los microorganismos susceptibles o sensibles.

Si las estructuras que tienen que ver con la permeabilidad selectiva, como los ácidos teicoicos o los lipopolisacáridos de la pared, o la membrana celular, estuviesen dañadas, las sustancias selectivas podrían ingresar a la célula dañando otras estructuras subletal o letalmente.

La leche en polvo, como producto que ha sufrido la acción de varios agentes físicos durante su elaboración (calor y desecación) debe presentar entonces, entre los microorganismos que contiene, una cierta cantidad

de células injuriadas (Chopin, *et al*, 1978; Crossley y Campling, 1957). En los ensayos realizados se trabajó con 20 muestras de leche en polvo seleccionadas de un total de 80 muestras, selección que se basó en la presencia de *Staphylococcus aureus* en las muestras elegidas y el objeto de los ensayos fue determinar el porcentaje de células injuriadas de *Staphylococcus aureus* y de coliformes.

## MATERIALES Y METODOS

La metodología utilizada corresponde a normas internacionalmente aceptadas (Speck, 1976).

### 1. Preparación de la muestra

En pesafiltro estéril se pesaron 20 g de leche en polvo entera y se diluyó con 80 ml de citrato de sodio al 1,25 por ciento. Se agitó 25 veces en un trayecto de 33 cm durante 7 segundos.

### 2. Aislamiento y recuento de *Staphylococcus aureus*

#### 2.1. Procedimiento sin recuperación previa de células injuriadas

De la muestra preparada tal como se detalla en 1. se tomaron 50 ml y se agregaron 50 ml de caldo triptona soja (T.S.B.). Esta dilución corresponde a 1/10.

Se sembró 1 ml de esta dilución en tres cajas con medio de Baird Parker distribuyendo uniformemente sobre la superficie con espátula de Drigalsky. El ml se distribuyó en las cajas a razón de 0,4 ml en la primera, 0,3 ml en la segunda y 0,3 ml en la tercera, evitando los bordes extremos de la caja y manteniendo las placas durante 10 minutos sobre la mesa para favorecer la absorción del inóculo por el medio de cultivo. Se incubó a 35-37° C durante 48 horas.

Se efectuó el conteo de colonias y la confirmación por el test de coagulasa previa siembra en caldo cerebro-corazón.

#### 2.2. Procedimiento con recuperación previa de células injuriadas

La dilución 1/10 tal como se detalla en 2.1. se incubó a 35-37° C durante dos horas y se sembró en cajas con medio de Baird Parker utilizando la misma metodología que en 2.1.

### 3. Aislamiento y recuento de bacterias coliformes

#### 3.3. Procedimiento sin recuperación previa de células injuriadas

La preparación de la dilución 1/10 se realizó del mismo modo que para *Staphylococcus aureus*.

Se sembró 1 ml por duplicado en cajas con medio violeta-rojo-bilis-agar (V.R.B.A.).

Una vez solidificado el medio se agregó una sobrecapa de 4 ml del mismo medio.

Se incubaron a 35° C durante 24 horas.

Se efectuó el recuento de las colonias de color rosado a rojo.

#### 3.2. Procedimiento con recuperación previa de células injuriadas

Se procedió en la misma forma que en el caso anterior pero antes de sembrar la dilución 1/10, se la incubó a 25° durante 1 hora.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados consignados en el Cuadro 1 corresponden a 20 muestras de leche en polvo en las cuales se había confirmado, previamente, una cierta carga de *Staphylococcus aureus*.

Los resultados obtenidos permiten arribar a las siguientes consideraciones:

- 1) El porcentaje de células injuriadas varía, en las muestras analizadas entre el 18,5 y el 77,7 por ciento para *Staphylococcus aureus* y entre el 25 y 62,5 por ciento en el caso de los coliformes.

CUADRO 1: Recuento de *S. aureus* y coliformes, normales y subletalmente dañados, en muestras de leche en polvo entera.

Muestra No	<i>S. aureus</i> col/g			Coliformes col/g		
	Sin recuperación previa b	Con recuperación previa c	Recuperación %	Sin recuperación previa d	Con recuperación previa e	Recuperación %
1	120	150	25	0	0	-
2	40	60	50	0	0	-
3	160	220	37,5	0	0	-
4	120	170	41,6	0	0	-
5	130	170	30,7	0	0	-
6	30	40	33,3	20	20	0
7	160	190	18,7	0	0	-
8	120	150	25	0	0	-
9	80	100	25	0	0	-
10	250	250	0	0	0	-
11	180	230	27,7	0	0	-
12	160	190	18,7	65	85	30,7
13	380	480	26,3	0	0	-
14	310	520	67,7	0	0	-
15	270	320	18,5	35	35	0
16	190	280	47,3	0	0	-
17	150	180	20	0	0	-
18	150	200	33,3	80	130	62,5
19	90	160	77,7	120	150	25
20	310	370	19,3	0	0	-

b: BP; c: TSB-BP; d: VRBA; e: TSB-VRBA.

- 2) Estas cifras son considerablemente inferiores a las consignadas por la bibliografía: 56 a 95 por ciento (Ray, 1979).
- 3) Se observan casos en los que no existe recuperación, como en el recuento de *Staphylococcus aureus* de la muestra 10 o en el recuento de coliformes de las muestras 6 y 15. En estos casos puede inferirse que la contaminación ha sido posterior al proceso de elaboración.
- 4) El bajo porcentaje de supervivencia al proceso de elaboración de leche en polvo de los coliformes, 0,002 por ciento (Chopin, et al, 1977), aparece claro en los resultados obtenidos.  
En los casos de las muestras 12, 18 y 19 debe suponerse una contaminación relativamente alta de la leche original.
- 5) Como es de prever, no existe relación entre el recuento de *Staphylococcus aureus* y el de coliformes de una misma muestra.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1) Allooowd, M. C. and Russell, A. D. 1970. Mechanisms of thermal injury in nonsporulating bacteria. *Adv. Appl. Microb.* 12: 89 - 119.
- 2) Baird-Parker, A. C. and Davenport, E. 1965. The effect of recovery medium on the isolation of *Staphylococcus aureus* after heat treatment and after the storage of frozen or dried cells. *J. App. Bact.* 28: 390 - 402.
- 3) Calcott, P. H. et Mac Leod, R. A. 1975. The survival of *Escherichia coli* from freeze-thaw damage: permeability barrier damage and viability. *Can J. Microb.* 21: 1724 - 1732.

- 4) Chopin, A. Mocquot G. et Le Graet Y., 1977. Destruction de *Microbacterium lacticum*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* au cours du séchage du lait par atomisation. II. Influence des conditions de séchage. *Can J. Microb.* 23: 756 - 762.
- 5) Chopin, A, Tesone S., Vila J. P., Le Graet, et Mocquot, G., 1978. Survie de *Staphylococcus aureus* au cours de la préparation et de la conservation de lait écrémé en poudre. Problemes posés par le dénombrement des survivants. *Can. J. Microb.* 24: 1371 - 1380.
- 6) Clark, C. W. Witter, D., and Ordal, Z. J., 1968. Thermal injury and recovery of *Streptococcus faecalis*. *App. Microb.* 16: 1064 - 1769.
- 7) Crosley E. L. and Campling M., 1957. The influence of certain manufacturing processes on the *Staphylococcus aureus* content of spray-dried milk. *J. Appl. Bact.* 20: 65 - 70.
- 8) Hichener B. J. and Eagn A. F. 1977. Outer membrane damage in sublethally heated *Escherichia coli* K-12. *Can J. Microb.* 23: 311-318.
- 9) Hoover A. W. and Gray R. J. H. 1977. Function of cell wall teichoic acid in thermally injured *Staphylococcus aureus*. *J. Bact.* 131: 477 - 485.
- 10) Hurst A., 1977. Bacterial injury: a review. *Can. J. Microb.* 23: 935 - 944.
- 11) Hausler W. J. Ed. 13 th. 1972. Standard method for the examination of dairy products. American Public Health Association. Inc., Washington D. C.
- 12) Jackson H., 1974. Loss of viability and metabolic injury of *Staphylococcus aureus* resulting from storage at 5° C. *J. Appl. Bact.* 37: 59 - 64.
- 13) Ohnishi T., Tanaka Y., Yoh M., Tanaka Y. and Miwatani T., 1977. Dexoxyribonucleic acid strand breaks during freeze-drying and their repair in *Escherichia coli*. *J. Bact.* 130: 1393 - 1396.
- 14) Postgate J. R. and J. R. Hunter, 1963. Metabolic injury in frozen bacteria. *J. Appl. Bact.* 26: 405 - 414.
- 15) Powers E. M. and Latt Th. G., 1978. Rapid enumeration and indentification of stressed fecal coliforms. *J. Food Protect.* 42: 342 - 345.
- 16) Ray B. 1979. Methods to detect stressed microorganisms. *J. Food Protect.* 42: 346 - 355.
- 17) Russell A. D. and Harris D. 1968. Factors influencing the survival and revival of heat treated *Escherichia coli*. *Appl. Microb.* 16: 335 - 339.
- 18) Sedgewick S. G. and Bridges B. A. 1972. Evidence for indirect production of DNA strand scissions during mild heating of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microb.* 71: 191 - 193.
- 19) Speck M. L. Ed. 2nd ed. 1976. Compendium Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association. Inc., Washington D. C.
- 20) Straka R. P. and Stokes J. L. 1959. Metabolic injury to bacteria at low temperatures. *J. Bact.* 78: 181 - 185.
- 21) Strange R. E. and Postgate J. R., 1964. Penetration of substances in cold-shock bacteria. *J. Gen. Microb.* 36: 393 - 403.
- 22) Tomlins R. L., Pierson M. D. and Ordal Z. J., 1971. Effect of thermal injury on TCA cycle enzymes of *Staphylococcus aureus* MF 31 and *Salmonella typhimurium* 7136. *Can J. Microb.* 17: 759 - 765.