

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL METODO ESTANDAR Y LA TECNICA
MEJORADA CON SMCA PARA LA DETECCION Y RECUENTO DE
BACTERIAS PROTEOLITICAS*

(COMPARATIVE STUDY BETWEEN THE STANDARD METHOD AND THE IMPROVED
TECHNIC WITH SMCA, FOR THE DETECTION AND COUNT OF PROTEOLYTIC
BACTERIA)

por

J. ESPEJO SERRANO y D. PEREZ FERRIEU

La flora proteolítica que acompaña a la leche está constituida fundamentalmente por bacterias lácticas, algunas enterobacteriaceas y otros gérmenes Gram negativos, así como algunos cocos y bacterias esporuladas (Poznanski y Rymaszewski, 1965; Fish *et al.*, 1969; Chouldery y Mikolajcik, 1970; Thomas *et al.*, 1971; Overcast *et al.*, 1974).

A excepción de algunas bacterias patógenas como el *Streptococcus agalactiae*, que puede causar afecciones en las mamas y es capaz de proteolizar la caseína (Inverso *et al.*, 1958; Maleney *et al.*, 1958), los componentes de la microflora considerada como proteolítica suelen ser contaminantes exógenos de la leche, y es raro que se encuentren en el interior de la ubre. Su presencia en la leche, por tanto, es un índice del grado de higiene observado durante la obtención y manipulación del producto (Taylor, 1957; Lawrence *et al.*, 1970).

También se ha comprobado que una gran proporción de estas bacterias con actividad proteolítica son psicrófilas, lo que les permite desarrollarse a temperaturas de refrigeración (Mourgues y Auclair, 1965; Vassal y Auclair, 1966; Martley *et al.*, 1970).

Como resultado de su actividad metabólica degradan las proteínas: los componentes nutritivos más valiosos de la leche. A consecuencia de dicha acción confieren al producto olores y sabores desagradables (Morgues y Auclair, 1965; Vassal y Auclair, 1966; Ritter, 1970; Botazzi, 1970) al tiempo que afectan adversamente a algunas características físicas como la viscosidad.

* Trabajo realizado en el Departamento de Tecnología y Bioquímica de los Alimentos de la Facultad de veterinaria. Universidad de Córdoba (España).

Recibido para publicación el 30-1-78.

ESPEJO Y PEREZ: SMCA PARA DETECCIÓN Y RECuento BACTERIAS PRÓTEOLITICAS.

Aún en los casos en que la degradación proteolítica es discreta y no llega a afectar ostensiblemente a las características físicas y organolépticas de la leche, dicha acción no deja de tener importancia, ya que los subproductos de la hidrólisis proteica favorecen el crecimiento de otros microorganismos, cuyo desarrollo se halla limitado en la leche o productos lácteos por la escasa cantidad que contienen de compuestos nitrogenados de bajo peso molecular. Esta acción se utiliza a veces, en tecnología de la leche, para estimular el crecimiento de microorganismos que desempeñan un papel importante en el proceso madurador de determinados productos, como ciertos tipos de queso (Desmaceaud y Devoyod, 1970; Feuillat *et al.*, 1972; Kikuchi *et al.*, 1973).

La importancia tecnológica de la flora proteolítica de la leche, como indicadora de la limpieza observada en la obtención de la leche cruda, de la eficacia de los tratamientos térmicos a que se somete el producto como índice de recontaminación de las materias tratadas, ha inducido a investigar procedimientos y medios para la detección y recuento de gérmenes.

Los métodos de detección y recuento usados tradicionalmente se basan en el empleo de medios sólidos que contienen leche. En tales medios no transparentes aparecen, en torno a las colonias de bacterias proteolíticas, unas zonas transparentes, como consecuencia de la degradación de la caseína en productos solubles, por difusión, en el agar, de las proteasas extracelulares liberadas por la colonia.

Ya a principios de siglo se propuso en América el empleo de medios a base de agar y leche en polvo, para detectar y enumerar bacterias proteolíticas. La 12 edición de los "Métodos estándar para el examen de los productos lácteos" (A.P.H.A., 1967) recomienda añadir al medio *Standard Method Agar* (SMA) un 10 p. 100 (v/v) de leche en polvo estéril.

Taylor (1967) propone el empleo de agar-agua, como base no nutritiva, cuya superficie se impregna con la leche a examinar, o con diluciones de la misma en leche estéril. El propio inóculo actuará como medio nutritivo.

El principal inconveniente de estos medios es que en ellos las colonias de microorganismos productores de ácido aparecen también rodeadas por un halo difuso más claro que el resto del medio (Frazier y Rupp, 1928; Lightbody, 1961). Esto es debido a que cuando el ácido producido no llega a bajar el pH hasta alcanzar el punto isoelectrico de la caseína, determina su peptonización (Foster *et al.*, 1957), por lo que para diferenciar unas colonias de otras es preciso bañar la superficie del medio con ácido diluido, para precipitar las proteínas presentes en los halos de las colonias productoras de ácido.

En 1928, Frazier y Rupp intentaron evitar la aparición de halo por formación de ácido utilizando un medio no transparente de agar-caseína que carecía de carbohidratos. El medio no tuvo aceptación general, pues su uso quedaba restringido a microorganismos que no necesitaban azúcares.

ESPEJO Y PEREZ: SMCA PARA DETECCION Y RECuento BACTERIAS PROTEOLITICAS.

Martley *et al.*, (1970) idearon un nuevo medio mejorado para el recuento simultáneo de microorganismos proteolíticos y bacterias totales, basándose en la microtécnica descrita por Lawrence y Sanderson (1969) para la determinación cuantitativa de proteínas. Dadas las ventajas que se deducen de este método, particularmente en lo que se refiere al ulterior aislamiento de la colonia productora, hemos realizado el presente trabajo con el fin de adoptar el que resulte más adecuado a estudios futuros.

El material motivo de estudio lo constituían 83 muestras de leche cruda de las que aproximadamente 37 procedían de almacenamientos refrigerados.

Para la elaboración de los medios de cultivo se ha empleado reactivos y productos de calidad bacteriológica de las casas DIFCO y Merck, a excepción del caseinato cálcico, que era de calidad comercial, y que fue proporcionado por New Zealand Dairy Board, Wellington, New Zealand.

El SMA más un 10 p. 100 de leche estéril se hizo en el laboratorio según normas establecidas por la A.P.H.A. (1967).

El SMCA (*Standard Method Caseinate Agar*) fue elaborado siguiendo la pauta marcada por Martley *et al.*, (1970).

La siembra, tanto en un medio como en otro, se realizó por inundación de la superficie de la placa con 1 ml de la dilución adecuada, y una vez mojada toda la superficie se procedió a la extracción del excedente mediante una jeringuilla cuya aguja se introducía, previa inversión e inclinación de la placa, entre las paredes verticales del cuerpo y tapa de la misma.

El número de placas inoculadas con cada una de las diluciones (1×10^{-4} , 1×10^{-5}) estuvo comprendido entre 6 y 8.

Las incubaciones se realizaron a 30°C durante 48 h.

Como diluyente se empleó la solución de Ringer al 1/4.

Resultados y discusión.

En todas las pruebas realizadas se han encontrado diferencias bastante acusadas entre los recuentos obtenidos por uno y otro procedimiento. Dichas diferencias han oscilado entre un 12 p. 100 y un 35 p. 100, con una media total de un 29 p. 100. En todos los casos se obtuvo el mayor número de bacterias proteolíticas en las placas que contenían SMCA.

Hay que destacar que mediante el método estandar los recuentos obtenidos resultaban muchas veces un tanto aleatorios, pues utilizando diluciones que daban origen a una densidad mínima de 30 colonias proteolíticas por placa, ésta aparecía tan superpoblada de otros tipos de colonias que el recuento se hacía sumamente difícil

e impreciso. Aún al utilizar diluciones mayores se encontraron serias dificultades de interpretación, toda vez que, después de la adición del ácido, no desaparecían totalmente los halos producidos por las colonias productoras de ácido (no proteolíticas), al tiempo que se reducía el diámetro del halo en torno a las verdaderamente proteolíticas (ver figs. 1 y 2). Ya en 1970, Martley *et al.* hicieron notar que el halo de las débilmente proteolíticas, como ocurre con el *Staphilococcus aureus*, puede llegar a desaparecer con este proceder.

Estas dificultades nos obligaron a tener que realizar pruebas paralelas, con el método estandar, dedicando unas placas para el recuento, a la que se les adicionaba ácido, y otras que se impregnaban con azul de bromitol. Se comprobó que en las colonias de morfología similar a las que mantenían un halo residual (en las acidificadas) el indicador viraba al amarillo (en las adicionadas con azul de brominol), lo que demostraba la producción de ácido.

Frazier y Rupp (1928) y más recientemente Lightbody (1961) demostraron que del 37 al 45 p. 100 de los halos formados en el medio estandar no son debidos a proteolisis.

Sólo en las muestras de leche procedentes de depósitos refrigerados se encontraron las diferencias mínimas, y se obtuvieron lecturas satisfactorias mediante el método estandar. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en este tipo de leche apenas si se detectaron bacterias productoras de ácido, al tiempo que el número de proteolíticas estaba proporcionalmente muy aumentado con respecto al número total de gérmenes. Estos resultados corroboraron los obtenidos por Bockelman (1968, 1970), quien analizando un gran número de muestras de leche, tomadas de depósitos de refrigeración de las granjas, comprobó que de la mitad a los dos tercios de las bacterias totales eran fuertemente proteolíticas. También Kiuru *et al.*, (1970) hallaron que de 300 cepas psicrófilas aisladas, más de la mitad eran proteolíticas.

Además de lo expuesto, el método basado en el empleo del SMCA tiene la ventaja de que al no necesitar ningún aditivo permite el aislamiento de las colonias que puedan resultar interesantes para ulteriores estudios, lo que no es posible con el método estandar. Dadas las ventajas observadas en el SMCA, sobre el método estandar, creemos necesario hacer una discusión de ambos. En primer lugar es de destacar que al no tener el SMCA la misma base (SMA) y poseer caseinato en lugar de leche, el medio es transparente en vez de opaco, lo que lo hace apropiado para realizar a un mismo tiempo el recuento de bacterias totales. Los autores que lo recomiendan (Martley *et al.*, 1970) lo proponen con esta doble finalidad.

Por nuestra parte, hemos podido comprobar que ello es válido en pruebas realizadas en este sentido.

En el medio con leche las bacterias proteolíticas sólo producen halo transparente cuando tienen gran actividad proteásica, es decir, sólo cuando degraden la caseína a productos solubles, mientras que en el medio transparente y debido a la presencia

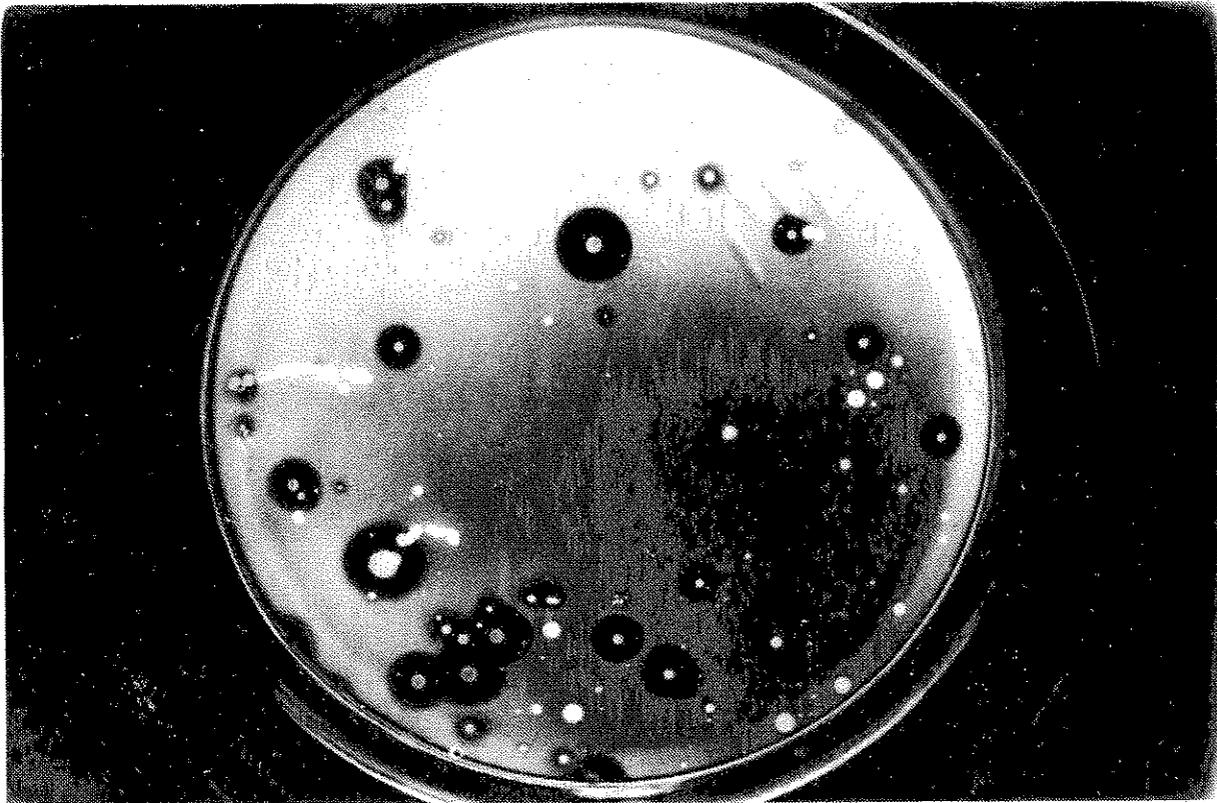


FIGURA 1. Placa con SMA + 10 p. 100 v/v de leche estéril, a las 24 h de incubación y antes de añadir el ácido. ϕ de la placa: 100 mm.

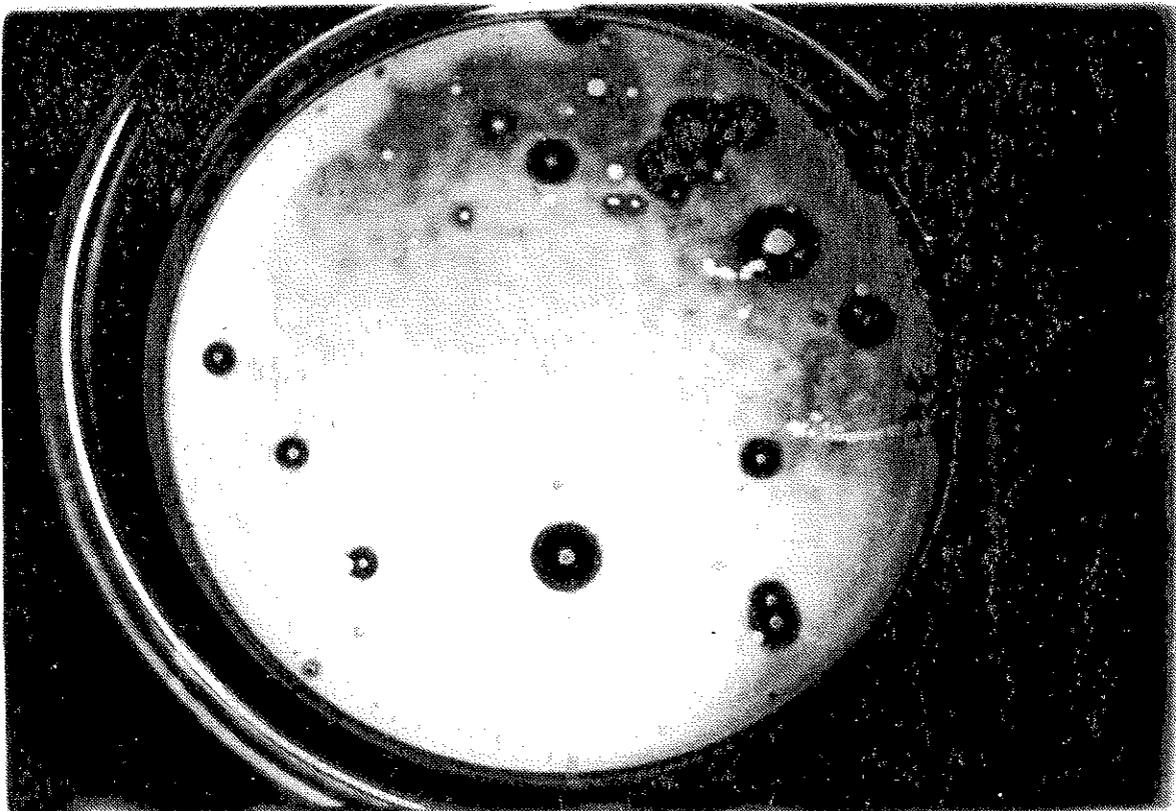


FIGURA 2. La misma placa anterior ya acidificada. Las colonias puntiformes que mantienen halo transparente resultaron ser formadoras de ácido y no proteólicas.

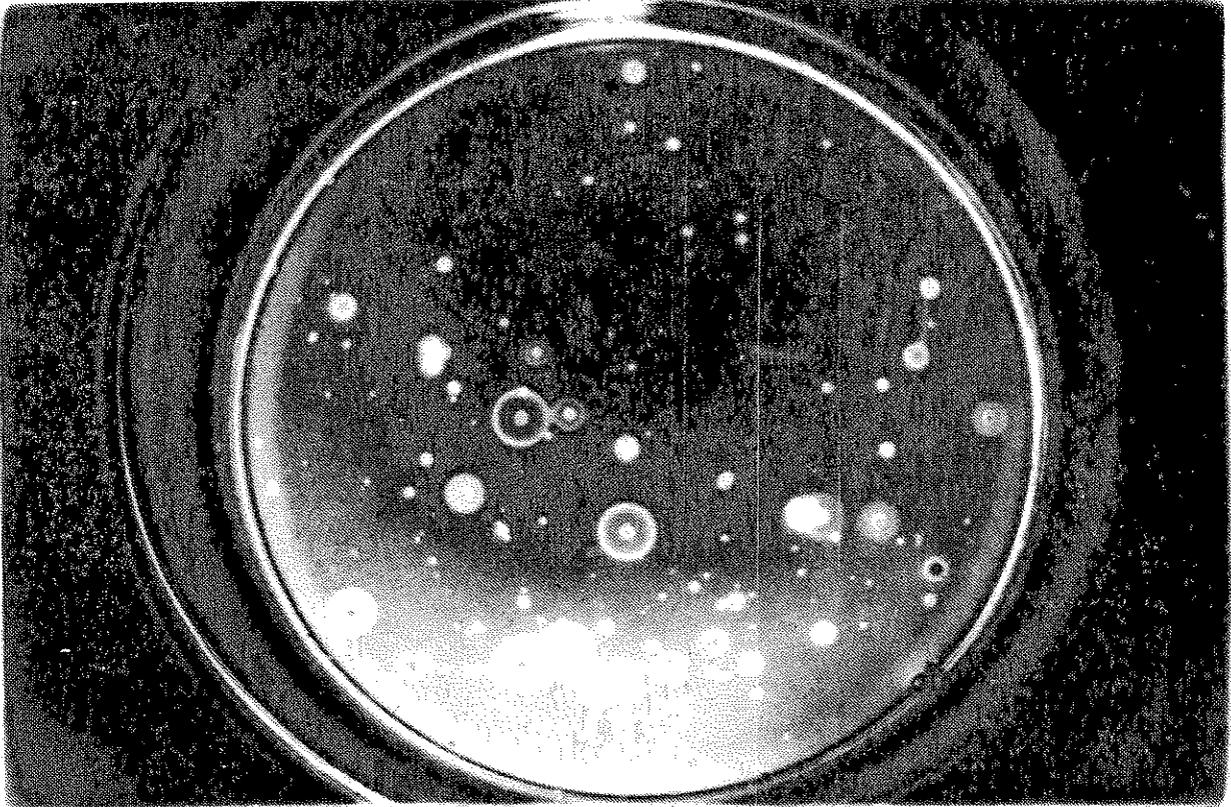


FIGURA 3. Placa con SMCA a las 16 h de incubación. Se pueden apreciar los distintos tipos de halos. ϕ de la placa: 100 mm.

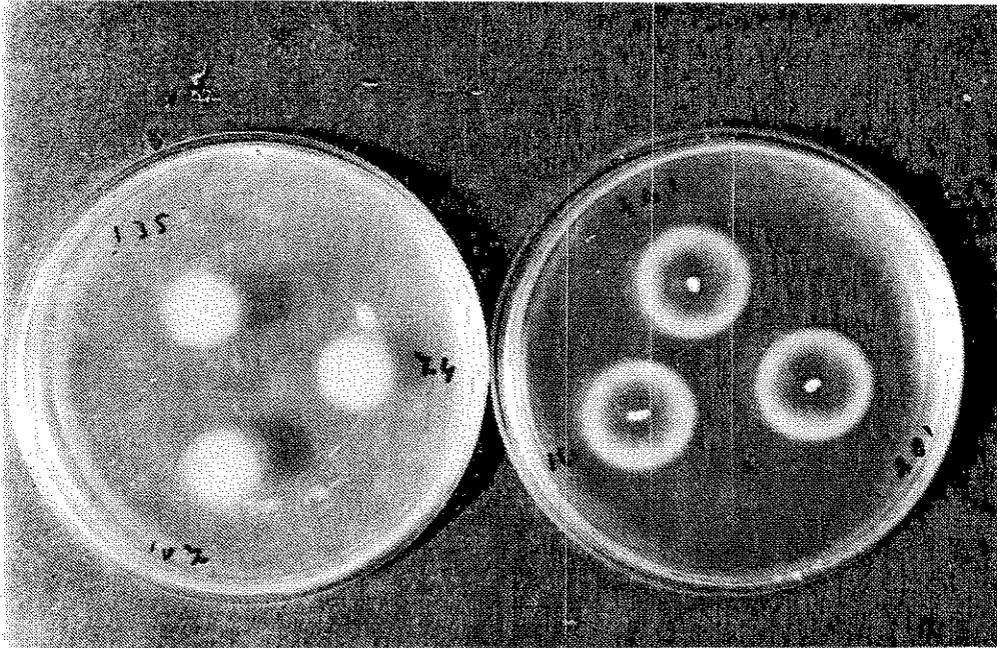


FIGURA 4. Placas con SMCA a las 24 h de incubación. Se puede apreciar la distinta capacidad proteolítica de seis cepas diferentes de estafilococos.

ESPEJO Y PEREZ: SMCA PARA DETECCIÓN Y RECuento BACTERIAS PROTEOLITICAS.

del caseinato y de una concentración adecuada de iones Ca^{++} la sensibilidad es mucho mayor, ya que el para-k-seinato formado en las primeras fases de la hidrólisis produce un precipitado blanco inicial en torno de la colonia proteolítica. En el SMCA, que también contiene citrato, las colonias productoras de ácido no forman halo en el medio tamponado, lo que hace que las proteolíticas puedan enumerarse directamente sin confusiones ni errores de identificación (ver fig. 3).

En este método las enzimas proteolíticas liberadas por las colonias difunden radialmente en el agar produciendo un halo cuyo diámetro depende de la cantidad de enzima excretada. Si la actividad proteolítica es débil, las caseínas presentes en la zona de difusión son transformadas a p-caseínas, que al precipitar por la presencia de iones Ca^{++} forman un halo blanquecino en el medio (ver fig. 4). Si las enzimas proteolíticas liberadas son muy activas se degradan las p-caseínas y aparece una zona anular transparente entre el frente de ataque (blanco) y la colonia.

Otra gran ventaja observada por nosotros y que creemos interesante es que más de un 85 p. 100 de las bacterias proteolíticas encontradas en nuestros estudios ya eran detectables en las placas con SMCA, a las 12-18 horas de incubación.

Conclusiones.

1. Consideramos que el método basado en el uso del SMCA es muy superior al método estandar, para el recuento de bacterias proteolíticas de la leche, por su mayor sensibilidad y facilidad de lectura.
2. Al no haberse detectado diferencias significativas con respecto al SMA, el SMCA tiene la ventaja de servir a la doble finalidad de utilizarse para detectar y enumerar tanto las bacterias proteolíticas como las totales de la leche.
3. Creemos que el SMCA es el método más adecuado para detectar, en principio, las distintas capacidades de degradación de la caseína que poseen las diferentes bacterias con actividad proteolítica.

Resumen.

Para la detección y recuento de bacterias proteolíticas, en 83 muestras de leche cruda, se han empleado paralelamente el método estandar (A.P.H.A., 1967) y la técnica mejorada por Martley *et al.*, 1970), basada en el empleo de SMCA (Standard Method Caseinate Agar).

En todas las pruebas se ha podido comprobar que el recuento obtenido en las placas que contenían SMCA era superior en un 29 p. 100 (como media total) al proporcionado por las que contenían el medio estandar; siendo también, más fácil, rápida y segura la lectura en el primer caso, toda vez que ya a las 12-18 h. de incubación eran detectables más del 85 p. 100 de las colonias con actividad proteolítica.

Summary.

For the detection and count of proteolytic bacteria in 83 samples of raw milk we have used the standard method (A.P.H.A., 1967) and the improved technics by Martley *et al.*, 1970, with SMCA (Standard Method Caseinate Agar).

In the plates with SMCA the count was always higher than in the standard method (29 p. 100 as the total average) and the reading in that medium was easier and quicker because after 12-18 h. of incubation it was possible to detect more than p. 100 of the proteolytic bacteria.

Bibliografía.

- Anónimo, 1967.--Standard Method for the Examination of Dairy Products. 12th Edit. American Public Health Association. N. Y. 10019.
- Bockelman, I. 1968.--Svenska Majeriernas Ricksforening, Report., 91.
- Bockelman, I. 1970.--XVIII Inter. Dairy Congr. 1E: 106.
- Botazzi, V. 1970.--Mondo Latte. 24: 177.
- Chouldhery, A. K. and E. M. Mikolajcik, 1970.--J. Dairy Sci., 53: 363.
- Desmaceaud, M. et J. J. Devoyod, 1970.--Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys, 10: 412.
- Feuillat, M., M. Demaymay, J. C. Gaudin, P. Grude et C. Dumarche, 1972.-- Le Lait, 52: 519.
- Fish, N. L., PH. J. Pinkston and T. J. Claydon, 1969.--J. Dairy Sci., 52: 2039.
- Foster, E. M., F. E. Nelson, M. L. Speck, R. N. Doetsch and J. C. Olson Jr, 1957.-- Dairy Dairy microbiology. Prentice-Hall, Inc. Eglewod Cliffs, N. Y.
- Frazier, W. C. and P. Rupp, 1928.--J. Bacteriol., 16: 35.
- Inverso, M., Q. Van Winkee and H. H. Weiser, 1958.--History of Randleing Farm. Kenan, N. Y.
- Kikuchi, T., M. Desmaceaud et J. L. Bergere, 1973.--Le Lait, 527: 369.
- Kiuru, K., E. Eklund, H. Gylleberg and M. Antila, 1970.--XVIII Intern. Dairy Cong., 1E: 108.
- Lawrence, R. C. and W. B. Sanderson, 1969.--J. Dairy Res., 36: 21.
- Lawrence, R. C., F. G. Martley, J. G. Teese and D. F. Newstead, 1970.--New Zeal. Dairy Res. Inst, m Publi., 517.
- Lightbody, L. G. 1961.--Od. J. agr. Sci., 18: 109.
- Malaney, G. W., H. H. Weiser, Q. Van Winkle and J. M. Peck, 1958.--Appl. Microbiol., 6: 407.

ESPEJO Y PEREZ: SMCA PARA DETECCION Y RECUENTO BACTERIAS PROTEOLITICAS.

Martley, F. G., S. R. Jayashankar and R. C. Lawrence, 1970.--*J. Appl. bacteriol.*, 33: 206.

Mourgues, R. et J. Auclair, 1965.--*Ind. Lait.*, 220. Extr.

Overcast, W. W. and J. Atmaram, 1974.--*J. Milk Food Techn.*, 37: 233.

Poznanski, S. and J. Rimaszewski, 1965.--*D. K. 637. O., Milchw. Orduung. Bibliotheca lactis*, 54.

Ritter, W. 1970.--*Indus. Aliment.*, Pinerdo, 9: 108.

Taylor, M. M. 1967.--*Dairy Industries*, Abril 1967: 278.

Thomas, S. B., R. G. Druce and M. Jones, 1971.--*J. Appl. Bacteriol.*, 34: 659.

Vassal, L. et J. Auclair, 1966.--*Rev. Lait Franc.*, 237: 666.