

Evaluación del crecimiento y producción de gas por *Enterobacter* sp. a diferentes temperaturas de incubación en medio caldo EC

Gabriela Pérez M., Lilibeth Cabrera S.*, Graciela Ojeda de Rodríguez
y Alexis Ferrer O.

Laboratorio de Alimentos, Departamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias
La Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela

Recibido: 18-12-96 Aceptado: 03-11-97

Resumen

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el crecimiento y la producción de gas de cepas de *Enterobacter* sp. en caldo EC, bajo diferentes temperaturas de incubación. 15 cepas de *Enterobacter* sp. aisladas de queso tipo Palmita comercial Venezolano proveniente de diversos mercados del área de la ciudad de Maracaibo, fueron sembrados en tubos con caldo EC por triplicado, con incorporación de tubos de fermentación Durham, e incubados a las siguientes temperaturas: 37,0 44,0, 44,5, 45,0, 45,5 y 46,0°C durante 24-48 h, en un baño termostatzado. Una vez crecidas las cepas se observó la presencia o ausencia de crecimiento y producción de gas. Todas las cepas mostraron un crecimiento óptimo a 37°C. A 44,0°C, el 67% de las cepas fueron capaces de producir gas. Este porcentaje fue disminuyendo a medida que se incrementó la temperatura, resultando en un 20, 13 y 7% de cepas productoras de gas a 44,5, 45,0 y 45,5°C, respectivamente. A 46,0°C hubo una inhibición total del crecimiento de todas las cepas. La producción de gas por *Enterobacter* a 45,0 y 45,5°C indican que especies no fecales pueden llegar a considerarse como especies fecales, ya que estas temperaturas son las establecidas por APHA (1992) y COVENIN (1977), respectivamente, para la determinación de coliformes fecales en alimentos, correspondientes a *Escherichia coli*. Los resultados mostrados en este estudio indican la posibilidad de obtener resultados falsos positivos para la prueba de coliformes fecales, debido al crecimiento y producción de gas, en caldo EC de especies no fecales como *Enterobacter*.

Palabras clave: Caldo EC; crecimiento; *Enterobacter* ; temperaturas de incubación.

Evaluation of growth and gas production by *Enterobacter* sp. under different incubation temperatures in medium EC broth

Abstract

This work was done in order to evaluated growth and gas production of *Enterobacter* sp. in EC broth under different incubation temperatures. Fifteen *Enterobacter* sp strains were isolated from Venezuelan "Palmita-type" cheese of some markets of Maracaibo City, were inoculated in EC broth by triplicate in tubes with Durham tube at the following temperatures:

* Autor para la correspondencia. e-mail: cabrera@una.ciens.luz.ve.

37.0, 44.0, 44.5, 45.0, 45.5 and 46.0°C and incubated for 24-48h in a water bath. The presence or absence of growth and gas production was observed. All the strains showed an optimum growth at 37°C. At 44.0°C, 67% of the strains were able to produce gas. This percent decreased as the temperature increased. At 46°C there was total inhibition of growth in all the strains tested. The gas production by *Enterobacter* at 45.0 and 45.5°C indicate that non fecal species can be erroneously detected fecal species, described by APHA (1992) and COVENIN (1977), for the determination of fecal coliforms in foods, corresponding to *Escherichia coli*. The results showed in this study, indicate the possibility of getting false positive results to the fecal coliform test, due to growth and gas production, in EC broth of non fecal species such as *Enterobacter*.

Key words: EC broth; *Enterobacter*; growth; incubation temperatures.

Introducción

El empleo del grupo coliforme como un indicador de contaminación fecal según Fishbein y col (1) está basado históricamente en el aprovechamiento de fuentes de aguas públicas y los problemas inherentes asociados a dichas fuentes. Dicho grupo está constituido por bacterias de los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Enterobacter* (2,3), las cuales se caracterizan por ser Gram negativas, no formadoras de esporas, aerobias y anaerobias facultativas, fermentadoras de lactosa con formación de ácido y gas en 24 a 48 horas a 35°C (4).

En el estudio de coliformes es común utilizar la técnica del Número Más Probable (NMP) ya sea en alimentos (3) como en aguas (5), donde se determinan coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli* mediante pruebas de fermentación en tubos con la consecuente producción de gas, en diferentes caldos de cultivos. En la determinación de coliformes totales se utilizan los medios caldo lauril sulfato triptosa y caldo bilis verde brillante lactosa 2%, donde la fermentación y producción de gas en estos medios constituye una prueba confirmativa. En la determinación de coliformes fecales se utiliza además del caldo lauril sulfato triptosa, el caldo EC, y para esta prueba resulta importante la temperatura de incubación. Según APHA (5) la temperatura de incubación que favorece el crecimiento de coliformes fecales es 44,5°C ± 2°C. Sin embargo, hay evidencias (1,6-9) que han mostrado

que otros coliformes como *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Klebsiella*, diferentes de *Escherichia coli* pueden desarrollarse en caldo EC a dicha temperatura, lo que sugiere que esta temperatura no es exclusiva para la determinación de *E. coli*.

En trabajos realizados en el queso tipo Palmita Venezolano en los cuales se hizo la evaluación de su microflora (10) se pudo observar que de las muestras procedentes de caldo EC, no todas resultaron confirmatorias de *E. coli* (datos no publicados), hubo cepas de *Enterobacter* que lograron crecer y producir gas en dicho medio a la temperatura de 44,5°C. Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue evaluar cepas de *Enterobacter* sp. previamente aisladas de queso tipo Palmita comercial Venezolano, en caldo EC, bajo diferentes temperaturas de incubación, con el fin de confirmar la prueba como medida de estimación del crecimiento de especies diferentes a *E. coli*.

Materiales y Métodos

Aislamiento e Identificación de las cepas

Quince cepas de *Enterobacter* sp. fueron aisladas de queso blanco tipo Palmita comercial proveniente de diversos mercados del área de Maracaibo, Estado Zulia. Para ello se utilizaron muestras de 250 g. Con el uso de un sacabocado estéril se tomaron 11 g y se homogeneizaron con 99 mL de agua peptonada estéril al 0,1% en una licuadora, por 1 minuto (11).

Tabla 1
Características bioquímicas de 15 cepas de *Enterobacter* sp. aisladas de queso tipo Palmita comercial

Cepa	Características Bioquímicas								
	TSI	Indol	Rojo de Metilo	Voges Prokauer	Citrato	Motilidad	Lisina	Arginina	Ornitina
E1	A/A gas +	-	-	-	+				
E2	A/A gas +	-	+	-	-				
E3	A/A gas +	-	-	+	+	+	+	+	+ ^d
E4	A/A gas +	-	-	+	+	+	+	+	+
E5	A/A gas +	-	-	+	+	+	-	+	+
E6	A/A gas +	-	-	+	+	+	+ ^d	+	+
E7	A/A gas +	-	-	+	+	+	+ ^d	+	+
E8	A/A gas +	-	-	+	+	+	-	+	+
E9	A/A gas +	-	-	+	+	+	-	+	+
E10	A/A gas +	-	-	+	+	+	+ ^d	+	+
E11	A/A gas +	-	-	+	+	+	-	+	+
E12	A/A gas +	-	-	+	+	+	-	+	+
E13	A/A gas +	-	-	+	+	+	+	-	+
E14	A/A gas +	-	-	+	+	+	+ ^d	+	+
E15	A/A gas +	-	-	+	+	+	-	+	+

A/A: ácido/ácido; d: débil.

A partir de este homogeneizado se prepararon diluciones hasta 10^{-5} y de éstas se aislaron los microorganismos, utilizando 0,1 mL de cada dilución en placas con agar eosina azul de metileno Levine (Merck, Germany) por el método de extensión superficial con la ayuda de una espátula de Drigalsky y se incubaron a 37°C por 24 horas. Todas las siembras se hicieron por duplicado (12).

Las colonias procedentes del agar fueron identificadas mediante las siguientes pruebas bioquímicas: fermentación de azúcares en TSI, IMVIC, motilidad, descarboxilación de lisina, arginina y ornitina (13). Una vez identificadas las colonias, éstas se inocularon en medio Infusión Cerebro Corazón (BHI, Merck -Germany) hasta el momento de su uso y en agar conservación a 4°C para su mantenimiento.

Como control se utilizaron 5 cepas de *E. coli* previamente aisladas de queso tipo Palmita e identificadas según Bergey (4).

Evaluación del crecimiento en caldo EC

Las cepas de *Enterobacter* fueron sembradas en tubos con caldo EC por triplicado, con incorporación de tubos de fermentación Durham; al igual que los controles. Los tubos se incubaron a las siguientes temperaturas: 37,0, 44,0, 44,5, 45,0, 45,5, 46,0°C en baño de agua termostatzado de 24 a 48 horas. Una vez crecidas las cepas se observó la presencia o ausencia de crecimiento y producción de gas (12).

Resultados y Discusión

En la Tabla 1 se observan los resultados de las pruebas bioquímicas llevadas a cabo a las cepas de *Enterobacter* sp.

Tabla 2
Influencia de la temperatura sobre el crecimiento y producción de gas por 15 cepas de *Enterobacter* sp.

Cepa	Temperaturas °C					
	37,0	44,0	44,5	45,0	45,5	46,0
E1	C + gas	C + gas	C + gas	C + gas	i	i
E2	C + gas	C + gas	C + gas	i	i	i
E3	C + gas	C + gas	C sin gas	i	i	
E4	C + gas	C sin gas	i	i	i	i
E5	C + gas	C sin gas	C sin gas	C sin gas	i	i
E6	C + gas	C + gas	C sin gas	i	i	i
E7	C + gas	i	i	i	i	i
E8	C + gas	C + gas	C + gas	C + gas	C + gas	i
E9	C + gas	C + gas	i	i	i	i
E10	C + gas	C + gas	i	i	i	i
E11	C + gas	C + gas	i	i	i	i
E12	C + gas	C + gas	i	i	i	i
E13	C + gas	i	i	i	i	i
E14	C + gas	C sin gas	i	i	i	i
E15	C + gas	C + gas	i	i	i	i

C: Crecimiento; i: inhibido.

En la Tabla 2 se observa que el crecimiento junto con la producción de gas de todas las cepas de *Enterobacter* sp. fue de máxima actividad a 37°C, ya que esta temperatura según APHA (3) y APHA (5) resulta óptima tanto para el crecimiento como para la fermentación de la lactosa por parte de estas bacterias. A temperaturas superiores hubo diferencias marcadas relacionadas con el desarrollo de cepas individuales de acuerdo con la temperatura de incubación. A 44°C, se observó que el 86,6% de las cepas crecieron, de las cuales el 76,9% de éstas fueron capaces de producir gas a dicha temperatura. A 44,5°C, el 20% de las cepas crecieron. Esta temperatura fue sugerida por Kelly citado en Tennant y col. (14) como confirmatoria de *E. coli* en caldo EC en muestras de ostras. APHA (3) señala esta

misma temperatura para conteo de pescado y productos marinos. Tennant y Reid (15) mencionan porcentajes de 77% de crecimiento y producción de gas por *Aerobacter* (*Enterobacter*) en caldo EC a 44,5°C en un período de 48 h. Otros autores han indicado que temperaturas mayores a ésta, son esenciales para la supresión de tipos de coliformes distintos a *E. coli* (9). Fishbein y Surkiewicz (1) en el análisis de alimentos congelados y nueces encontraron un 44,89% y 54,66% de falsos positivos, respectivamente a dicha temperatura.

A 45,0°C, se observó una marcada inhibición del crecimiento, representada por el 80% de las cepas; sin embargo, hubo cepas (13%) que crecieron y produjeron gas a esta temperatura. Estos resultados coinciden con los reportados por Geldreich y col. (8)

donde un 10,6% de coliformes no fecales correspondientes al tipo IMVIC —++, característico de *Enterobacter*, fueron capaces de crecer y producir gas a 45,0°C. En este estudio el crecimiento de *Enterobacter* determina la presencia de falsos positivos, donde microorganismos no fecales fueron capaces de formar gas en caldo EC, indicando la poca confiabilidad en la prueba empleando dicha temperatura. En este sentido, Weiss y col. (9) señalan la presencia de falsos positivos (1%) a 45,0°C de coliformes aislados de muestras de leche. Para poder diferenciar *E. coli* de otros tipos de coliformes, Hajna y col. (7) indican el uso de temperaturas por encima de 45°C. A 45,5°C, el 93% de las cepas fueron inhibidas en su crecimiento y en la producción de gas, a excepción de una cepa. APHA (3) y COVENIN (12) sugieren el empleo de temperaturas de incubación en el rango de 45,5°C ± 0,2 para la recuperación de *E. coli* en caldo EC. La aplicación de esta temperatura ha sido recomendada para el aislamiento de *E. coli* que se encuentra mezclado con otras bacterias contaminantes en alimentos tales como comidas congeladas y frutas secas (1,14), mariscos, agua potable, aguas residuales y otros materiales (7); sin embargo, esta temperatura no resultó selectiva en este estudio, ya que una cepa de *Enterobacter* (E8) fue capaz de crecer y producir gas a dicha temperatura. Algunos autores señalan la presencia de falsos positivos que corresponden a coliformes diferentes a *Escherichia coli* cuando se utilizan temperaturas de incubación de 45,5°C (1,6,9,16).

A 46,0°C se observa la inhibición total de todas las cepas. Estos resultados coinciden con lo reportado por Hajna (17) en donde sólo bacterias del género *Escherichia* producen gas a 46,0°C, mientras que resultan suprimidos los demás miembros del grupo coliformes, entre los cuales se encuentra *Enterobacter*.

Conclusiones

Los resultados obtenidos demuestran que la prueba confirmatoria para coliformes fecales en caldo EC por la técnica del Número Más Probable, debe ser tomada en cuenta sólo como una medida de estimación presuntiva y no confirmatoria de *Escherichia coli*. Es por esto que resulta necesario el empleo de temperaturas adecuadas para la determinación de *Escherichia coli* con la consecuente utilización de pruebas bioquímicas específicas para su confirmación.

Referencias Bibliográficas

1. FISHBEIN M., SURKIEWICZ B. *Appl Microbiol* 12:127-131, 1964.
2. BROCK T., SMITH D., MADIGAN, M. *Microbiología*, Prentice-Hall, México, pp. 640-642, 1987.
3. American Public Health Association (APHA). *Compendium of Methods for the microbiological examination of foods*, M. L. Speck. Washington, D. C. (USA), 1992.
4. **BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY**. Vol 1. Krieg, N. (Ed) Williams & Wilkins, Baltimore (USA), 1984.
5. American Public Health Association (APHA) *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. 18th Ed. APHA, Washington, D.C., 1992.
6. PERRY C., HAJNA A. *Am J Public Health* 34:735-738, 1944.
7. HAJNA A., PERRY C. *J Bacteriol* 38:275-283, 1949.
8. GELDREICH E., CLARK H., KABLER P., HUFF C., BORDNER R. *Appl Microbiol* 6:347-348, 1958.
9. WEISS K., CHOPRA N., STOTLAND P., RIEDEL G., MALCOLM S. *J Food Prot* 46:172-177, 1983.
10. FERRER A., URDANETA D., RINCÓN Z., CABRERA L., BASANTA Y. *J Food Prot* 54:856-860, 1991.

11. **COVENIN:** Comisión Venezolana de Normas Industriales. Identificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico. (Categoría C-1126-89). Caracas, Venezuela, 1989.
12. **COVENIN:** Comisión Venezolana de Normas Industriales. Determinación del Número Más Probable de coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli*. (Categoría D-1104-77) Caracas, Venezuela, 1977.
13. KONEMAN E., ALLEN S., DOWELL V., JANDA W., SOMMERS H., WINN W. **Diagnóstico Microbiológico**, Panamericana, Buenos Aires, pp. 230-232, 258-264, 1992.
14. KELLY C.B. *Can J Microbiol* 7:733-739, 1961.
15. TENNANT A.D., REID J.E. *Can J Microbiol* 7:725-731, 1961.
16. HAJNA A., PERRY C.A. *Am J Public Health* 33:550-560, 1943.
17. HAJNA A. *J Bacteriol* 38:275-283, 1949.