

# F

## FRECUENCIA DE AISLAMIENTO DE *SALMONELLAS* Y *PSEUDOMONAS* EN CANALES DE POLLOS REFRIGERADAS PROCEDENTES DE MISIONES (ARG.)

Benassi, F. / von Specht, M. / García, M. / Pucciarelli, A. / Zubreski, E.

ISOLATION FREQUENCY OF *SALMONELLA* AND *PSEUDOMONAS* IN REFRIGERATED RAW CHICKEN CARCASSES FROM MISIONES (ARGENTINA)

The research was focused on the occurrence of psychrotrophic microorganisms, *Salmonella* and *Pseudomonas* in raw chicken carcasses from a poultry processing plant of Misiones, Argentina.

Microorganisms were removed from carcasses by the rinse method. Plate counts of psychrotrophic microorganisms were performed by plating Plate Count Agar (total microorganisms), Calcium Caseinate and Milk Agar (proteolytic psychrotrophic), Butter Agar and Triolein Agar (lipolytic psychrotrophic). *Pseudomonas spp.* were recovered from plates of Cetrimide Agar.

Elevated temperature technique for the isolation of *Salmonella spp.* was applied. The methodology consisted in applying an enrichment procedure by using Selenite-Cystine and Rappaport-Vassiliadis Broth. *Salmonella* organisms were recovered by streaking plates of Bismuth Sulphite Agar (BS), Xylose Lysine Deoxicholate Agar (XLD), and Eosin Methylene Blue Agar (EMB).

Out of 52 refrigerated carcasses (-2°C), *Salmonella spp.* were isolated from 12,5% of the samples [*Salmonella* Enteritidis (82%), *Salmonella* Hadar (18 %)]. Best isolation frequency of *Salmonella spp.* was obtained when the combination of RV Broth and XLD Agar was used. Also, *Pseudomonas fluorescens* (70,7 %) and *Pseudomonas putida* (19,5 %) were identified.

Average plate count of total psychrotrophic microorganisms was  $1,7 \times 10^6$  UFC/ml, proteolytic psychrotrophic prevailed among the studied samples.

These results show an important raw chicken carcasses contamination, therefore measures should be taken in order to correct this situation.

KEY WORDS: Chicken carcasses. *Salmonella*. *Pseudomonas*. Psychrotrophic microorganisms.

Se investigó la presencia de microorganismos psicrotrofos, *Pseudomonas* y *Salmonella* en canales de pollos refrigeradas, provenientes de una planta faenadora de la provincia de Misiones.

ABSTRACT

RESUMEN

La toma de muestras se realizó por el método del lavado de cada canal. Se efectuaron recuentos de microorganismos Psicrotrofos Totales (Plate Count Agar - PCA), Psicrotrofos Proteolíticos (Agar Leche y Agar Caseinato de Calcio), Psicrotrofos Lipolíticos (Agar Manteca y Agar Trioleína) y aislamiento y tipificación de microorganismos pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* (Agar Cetrimide) y *Salmonella* en caldos: Selenito-Cistina (SC) y Rappaport-Vassiliadis (RV) y placas de: Agar Bismuto - Sulfito (BS), Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD), Agar Eosina Azul de metileno (EMB).

Sobre un total de 52 canales evisceradas refrigeradas (-2°C), se aisló *Salmonella* en el 12,5% de las mismas [*S. Enteritidis* (82%), *S. Hadar* (18 %)]. La mejor combinación de medios resultó: Caldo RV / Agar XLD. Las especies del género *Pseudomonas* identificadas fueron *P. fluorescens* (70,7 %) y *P. putida* (19,5 %). El promedio de los recuentos psicrotrofos totales fue de  $1,7 \times 10^6$  UFC/ml, con predominio de flora proteolítica.

Los resultados demuestran una importante contaminación de las canales, lo que hace necesario aplicar medidas correctivas para optimizar la calidad del producto refrigerado.

**PALABRAS CLAVES:** Canales de pollos. *Salmonella*. *Pseudomonas*. Microorganismos alterantes.

## INTRODUCCIÓN

La industria aviar constituye una importante actividad económica en el país. En nuestro medio se considera de gran interés la actividad avícola y en los últimos años se ha verificado un aumento sostenido del consumo de carne de pollo.

Las bacterias alterativas psicrotrofas, entran a la planta procesadora en las patas y en las plumas de las aves, y en menor número en el suministro de agua y de hielo. Posteriormente se multiplican sobre las superficies sucias del equipo, en los tanques de agua helada y sobre la superficie de las aves. Los microorganismos psicrotrofos, juegan un rol significativo en procesos de deterioro a bajas temperaturas. Su presencia en alto número puede causar diversos tipos de alteraciones en las canales evisceradas refrigeradas, que se manifiesta por malos olores, seguidos por la formación de limo y diversos cambios en la coloración de las carcasas, durante el período de almacenamiento, y a la vez indica un manejo sanitario deficiente [1, 2].

A medida que las bacterias se multiplican, el pH se eleva y aumenta la cantidad de amoníaco y compuestos afines, aunque estos cambios no son marcados hasta que el nivel de bacterias psicrotrofas no sobrepasa  $10^8$  UFC/ml [2, 3].

Uno de los principales factores que influyen en el crecimiento bacteriano de canales refrigeradas, es la carga inicial de microorganismos psicrotrofos alterativos. Si ésta es elevada, el tiempo de latencia se acortará, y por tanto la vida útil será menor [2, 4].

La mayor parte de los autores [1-5], coinciden en que el principal agente causal de deterioro a bajas temperaturas es el género *Pseudomonas*. Según la ICMSF [2], también intervienen especies de los géneros *Alteromonas*, *Acinetobacter* y *Moraxella*.

El género *Salmonella* comprende especies patógenas que ocasionan enfermedades entéricas en el hombre [6-9], siendo las principales causas la ingestión de agua y alimentos contaminados.

Se considera a la carne de pollo como uno de los vehículos importantes para la transmisión de *Salmonella* en humanos [10, 11].

Debido a que en nuestra zona no se han realizado hasta el presente, estudios microbiológicos durante el procesamiento en planta, se procedió a investigar microorganismos psicrotrofos totales, proteolíticos, lipolíticos y presencia de *Salmonella* y *Pseudomonas* en canales de pollos refrigeradas, provenientes de una planta procesadora de la provincia de Misiones, con el fin de contribuir a optimizar la calidad del producto refrigerado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Se realizaron 13 operaciones de muestreo en el período marzo-diciembre de 1994. Cada muestreo consistió en la toma de 5 canales de pollo evisceradas de la cámara (-2°C) de la Planta Faenadora. Se colocaron en bolsas de polietileno estériles y se trasladaron refrigeradas para ser procesadas inmediatamente en el laboratorio.

Investigación de microorganismos psicrotrofos. Se procedió de acuerdo con la siguiente metodología [12-16]:

Toma de muestra. Por el método no destructivo del lavado de cada canal con 300 ml de Agua de Peptona al 1% (suspensión madre).

Preparación de las diluciones. A partir de la suspensión madre se efectuaron diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  empleando Agua de Peptona al 0,1%.

Psicrotrofos totales. Se inocularon por duplicado placas de PCA, mediante el método de siembra en volumen [17].

Psicrotrofos proteolíticos. Se inocularon en superficie y por duplicado placas de Agar Caseinato de Calcio y Agar Leche. Se efectuaron recuentos de colonias que presentaron halos debidos a la proteólisis.

Psicrotrofos lipolíticos. En placas de Agar Manteca y Agar Trioleína, por duplicado. Se contaron colonias que presentaron halos de lipólisis [18].

Condiciones de cultivo. En todos los casos la incubación se realizó a 7°C durante 10 días, efectuándose luego los recuentos correspondientes.

**Pseudomonas** psicrotrofas. Se inocularon en superficie, placas de Agar Cetrimide (AC). Se incubaron a 7°C durante 10 días. Se seleccionaron colonias características en Agar Infusión de Cerebro y Corazón, se incubaron 24 horas a 30°C y se efectuaron las siguientes pruebas bioquímicas [19]: Tinción de Gram, prueba de la oxidasa, prueba de la catalasa, formación de H<sub>2</sub>S, movilidad, O/F (oxidación fermentación) fermentación de los siguientes compuestos: glucosa, inositol, sorbitol, manitol, ramnosa; producción de indol, de lisina descarboxilasa y de fenil alanina deaminasa.

Las cepas presuntivas de género *Pseudomonas*, se enviaron al Instituto Nacional de Microbiología «Dr. Carlos G. Malbrán», para confirmación bioquímica.

Investigación de **Salmonella**: Para aislamiento y tipificación se procedió de acuerdo con la siguiente metodología [19-24]:

Toma de Muestras. La toma de muestras se realizó por el método no destructivo del lavado de cada canal, utilizando 300 ml. de caldo peptonado bufferado en bolsas de polietileno estériles.

a) Preenriquecimiento. En caldo peptonado bufferado, incubado a 37°C, durante 24 hs.

b) Enriquecimiento selectivo. Se sembraron al 10 % caldos Selenito-Cistina (SC) y Rappaport-Vassiliadis (RV), que se incubaron durante 48 hs. a 41,5°C.

c) Aislamiento. Se utilizaron placas de los siguientes medios: Agar Bismuto-Sulfito (BS), Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD), Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) y Agar Verde Brillante-Rojo fenol-Lactosa-Sacarosa (BPLS). Se incubaron a 37°C por períodos variables según requerimientos. Los ensayos se realizaron por duplicado. De cada placa se aislaron 5 colonias que se sembraron en Agar Tripticosa Soya (TSA), con el fin de lograr cultivos adecuados para realizar las pruebas bioquímicas.

d) Identificación primaria. Se realizaron las siguientes pruebas: oxidasa, ureasa, fenil-alanina deaminasa, fermentación de hidratos de carbono: glucosa, lactosa, sacarosa; producción de sulfhídrico; lisina decarboxilasa, producción de indol; pruebas de Voges-Proskauer y licuefacción de gelatina. Se efectuaron las pruebas de beta-galactosidasa (ONPG) y utilización de citrato con cepas lisina decarboxilasa negativas.

e) Tipificación serológica. Fue realizada en el Centro Nacional de Referencia de Enterobacterias del Instituto Nacional de Microbiología «Carlos G. Malbrán», utilizando sueros somáticos y flagelares polivalentes, monovalentes y factores. La identificación de serovariedades se realizó de acuerdo con los criterios de Popoff y Le Minor.

f) Análisis Estadístico. Se utilizó el Test de Student para comparar los valores medios de psicrotrofos proteolíticos y lipolíticos y el test de las proporciones para evaluar la combinación de medios [25].

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se aisló *Salmonella* en el 12,5 % de las canales. La identificación serológica demostró la presencia de *Salmonella* Enteritidis (82%) y *Salmonella* Hadar (18%).

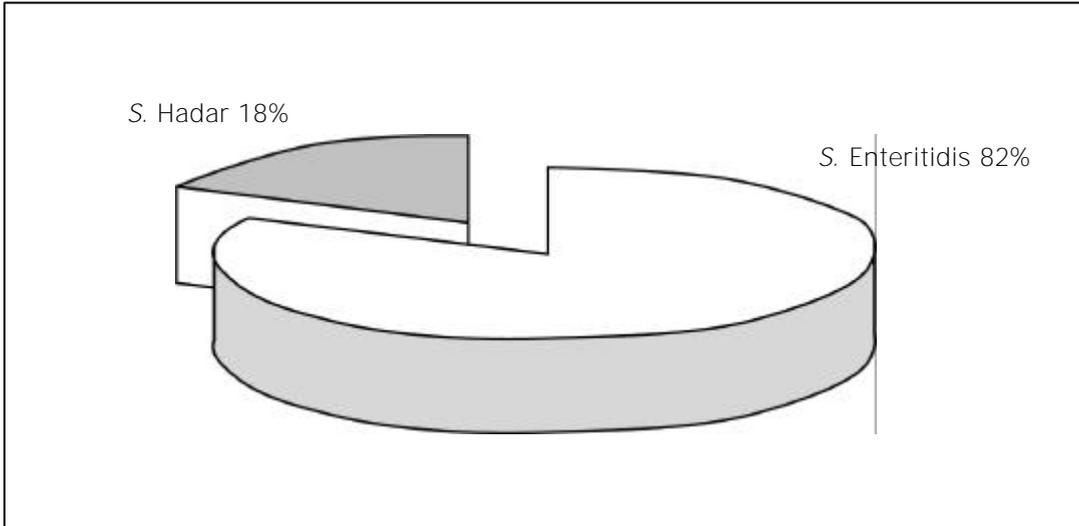


GRÁFICO 1. Aislamientos de *Salmonella*. Porcentajes.

La eficiencia de aislamiento de los medios de cultivo se aprecia en el cuadro 1. La combinación más adecuada resultó XLD - SC ( $p < 0,05$ ).

CUADRO N° 1: Eficiencia de los medios de cultivo					
CALDOS DE ENRIQUECIMIENTO	MEDIOS DE AISLAMIENTO				TOTAL (%)
	XLD	EMB	BS	BPLS	
SC	40%	27%	13%	0%	80%
TT	0%	2%	0%	0%	2%
RV	16%	0%	2%	0%	18%

Se identificaron *Pseudomonas fluorescens* (70,7%), *Pseudomonas putida* (19,5%) y *Stenotrophomonas maltophilia* (9,8%) lo que se ilustra en el gráfico 2.

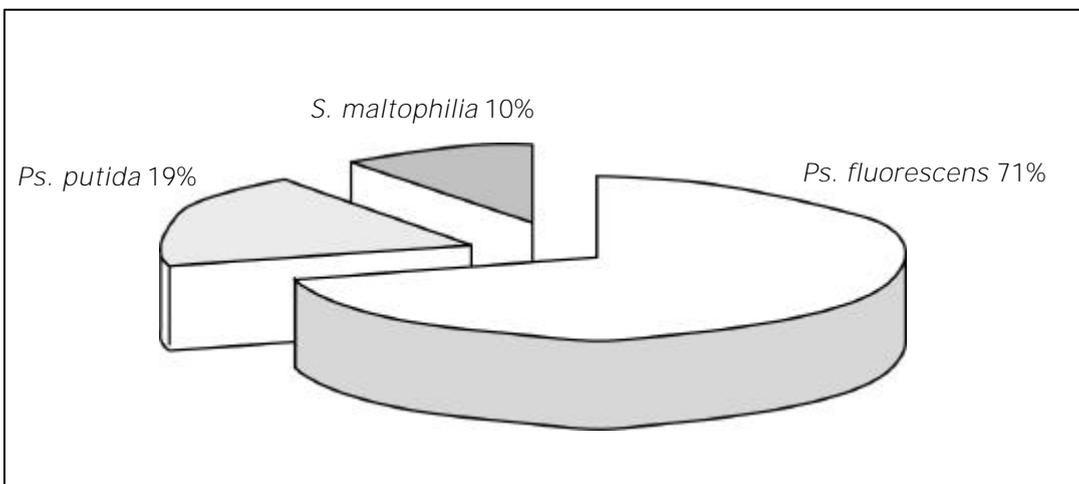


GRÁFICO 2. Distribución de *Pseudomonas* spp en canales de pollos evisceradas refrigeradas.

El promedio de los recuentos de psicrotrofos totales fue de  $6,2 \times 10^5$  UFC/ml, con una mínima de  $2,3 \times 10^5$  UFC/g y máxima de  $3 \times 10^7$  UFC/g. El coeficiente de variación resultó elevado en todos los casos, dando valores entre 100 y 240.

Las diferencias entre los valores medios de psicrotrofos proteolíticos ( $2,9 \times 10^4$  UFC/g) y lipolíticos ( $2,0 \times 10^3$  UFC/g), demuestran predominio de los primeros ( $p < 0,004$ ).

Los resultados obtenidos muestran una importante contaminación de las canales de pollos, lo que hace necesario la aplicación de medidas correctivas a través de la aplicación del análisis de riesgos y puntos críticos de control como así también, introducir innovaciones durante el faenamiento de las canales de pollos, como ser el tratamiento con compuestos orgánicos de manera tal de minimizar la contaminación en el producto final [5].

Según Ayres y colaboradores [2], para una carga microbiana inicial comprendida entre  $10^3$  y  $10^4$  UFC/g, el período de vida útil a  $4^\circ\text{C}$  es de una semana. En nuestro caso, la carga microbiana inicial oscila entre el orden de  $10^5$  y  $10^6$  UFC/g, lo que asegura una vida útil de 2 a 5 días.

BENASSI, F.; VON SPECHT, M.; GARCIA, M.; PUCCIARELLI, A.; ZUBRESKI, E. / Cátedra de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones.

#### AGRADECIMIENTOS

A las divisiones: Bacteriología Especial y Enterobacterias del Instituto Nacional de Microbiología Dr. Carlos G. Malbrán, por la confirmación bioquímica y tipificación serológica de cepas aisladas.

#### REFERENCIAS

1. BARNES, E.; IMPEY, C. Psychrotrophic spoilage of poultry. *J. Appl. Bacteriol.* 31: 97-107. 1968.
2. INTERNATIONAL COMMISSION FOR MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS ON FOODS. (ICMSF). *Ecología Microbiana de los Alimentos*. Tomo II. Ed. Acribia. 1980.
3. BRYAN, F. L. Foodborne diseases in the United States associated with meat and poultry. *J. Food Prot.* 43 (2): 140-150. 1980.
4. HALBINGER, R. E.; VIDDAL, M. S.; FRIEDMAN, R. *Microbiología de los alimentos conservados por el frío*. Ed. Hemisferio Sur. 1992.
5. LILLARD, H. S. The impact of commercial processing procedures on the bacterial contamination and cross-contamination of broilers carcasses. *J. Food Prot.* 53 (3): 202-204. 1990.
6. BULLETIN EPIDEMIOLOGIE HEBDOMADAIRE. Francia, Les Infections a *Salmonella* Enteritidis en 1987. 26: 101. 1988.
7. BUTTA, N.; EIGUER, T. *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia coli* enteropatógena infantil (EPI). Datos registrados de la República Argentina durante el período 1979-1981. *Bact. Clin. Arg.* 1: 117-128. 1982.
8. CAFFER, M. I.; EIGUER, T. *Salmonella* Enteritidis in Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* 21: 15-19. 1994.
9. CAYLE, F.; RIVEIRO, C. D.; HOWARD, A. J.; ROWER, B.; PALMER, S.R.; JONES, H. I.; WARD, J. *Salmonella* Enteritidis phage type 4 infection association with hen's eggs. *Lancet*: 1295-1297. 1988.
10. MERCADO, E. C. *Salmonella* en pollos eviscerados provenientes de plantas procesadoras del Gran Buenos Aires. *Rev. Arg. Microbiol.* 15 (4): 187-191. 1983.
11. ANONYMOUS. REPORTS OF OUTBREAKS OF FOODBORNE ILLNESS. Increasing rate of *Salmonella* Enteritidis infections in the Northeastern United States. *J. Food. Protection.* 50: 435. 1987.
12. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods*. 13ª Ed. 1976.
13. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. 14ª Ed. 1978.
14. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF)

- Microorganisms in Foods. I - 2ª Ed. 1978.
15. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF) Microorganisms in Foods. I - 2ª Ed. 1978.
16. RAFAGHELLI, R. C.; MASSEL, P.; JIMENEZ, S.; TIBURZI, M. C.; MOGUILEVSKY, M. A. Características de la microflora psicrotrofa de canales evisceradas conservadas a 5°C. La Ind. Cárnica Latinoamericana 17 (76): 31-35. 1989.
17. VIEHWEG, S.; SCHMITT, R.; SCHMIDT LORENZ, W. Microbial spoilage of refrigerated fresh broilers. Production of off odours from poultry skin by bacterial isolates. Lebensm. Wiss. u. Technol. 22: 356-367. 1989.
18. UMEMOTO, Y. A Method for the Detection of weak lipolysis of dairy lactic acid bacteria on double-layered agar plates. Agr. Biol. Chem. (33) 11: 1651-1653. 1969.
19. MAC FADDIN, J. F. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica, Ed. Med. Panam. Bs. As. 1980.
20. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. Isolation and identification of **Salmonella** species, p. 701-718. In Bacteriological Analytical Manual. 6th Ed. Ed. Arlington. V.A. 1984.
21. BAILEY, J.S.; CHIE, J.Y.; COX, N.A.; JOHNSON, R. W. Improved selective procedure for detection of **Salmonella** from poultry and sausage products. J. Food Prot. 51 (5): 391-396. 1988.
22. BLANKENSHIP, L. C.; COX, N. A. Modified water rinse sampling for sensitive non adulterating **Salmonella** detection on eviscerated broiler carcasses, J. Food Prot. 39: 680-681. 1976.
23. HAWA, S. G.; MORRISON, G. J.; FECT, G. H. Method to rapidly enumerate **Salmonella** on chicken carcasses. J. Food Prot. 47 (12): 932-936. 1984.
24. NOTERMANS, S.; KAMPELMACHER, E. J. Attachment of some bacterial strains to the broiler chickens. Br. Poult. Sc. 15: 573-585. 1988.
25. STATGRAPHICS PLUS (VERSION 7 FOR DOS). STATGRAPHICS User Manual. Manugistics, Inc. Rockville, Maryland. U.S.A. 1993.