

CARACTERIZACION TAXONOMICA DE BACTERIAS ACIDO-LACTICAS AISLADAS DE CARNE DE VACUNO

(Taxonomic characterization of lactic-acid bacteria isolated from beef)

B. Prado Alderete*¹, R. Ilabaca Sáez¹, S. Zambrano López¹,

A. del Moral García², E. Sánchez Stephan¹.

1.-Laboratorio de Microbiología, Carrera de Control de Alimentos
, Universidad Técnica Federico Santa María, Sede Viña del Mar, Casilla 920, Viña del Mar, Chile.

2.-Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia,
Universidad de Granada, Granada, España.

*E-mail : bprado@jmc.utfsm.cl

Palabras clave: Taxonomía numérica, bacterias ácido lácticas, carne de vacuno molida.

Key words: Numerical taxonomy, lactic acid bacteria, ground beef.

RESUMEN

Empleando taxonomía numérica se realizó un estudio a 107 cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de carnes de vacuno molidas, junto a 5 cepas de referencia. Todas las cepas fueron determinadas con 114 características fenotípicas, de las cuales sólo 27 fueron consideradas variantes para el estudio taxonómico, utilizando el coeficiente de Ssm y la técnica de agrupación UPGMA. Las bacterias se agruparon en cuatro fenones a un nivel de semejanza del 83%. Las bacterias fueron incluidas dentro del género *Lactobacillus* en los subgéneros *Thermobacterium* (Fenon A), *Betabacterium* (Fenon B), *Streptobacterium* (Fenon C) y la especie *Lactobacillus acidophilus* (Fenon D).

SUMMARY

A numerical taxonomic study has been carried out in 107 strains of lactic acid bacteria isolated from ground beef together with five reference strains. All the strains revealed 114 phenotypic characteristics, being only 27 of them considered as variants for the taxonomic study, as for the Ssm coefficient and the (UPGMA) grouping technique. Bacteria became clustered in 4 phenon at an 83% similarity level. Bacteria were included within the genera *Lactobacillus* in the subgenera *Thermobacterium* (Phenon A), *Betabacterium* (Phenon B), *Streptobacterium* (Phenon C) and the species *Lactobacillus acidophilus* (Phenon D).

INTRODUCCION

Las bacterias ácido lácticas constituyen el mayor grupo de microorganismos responsables del deterioro de carnes de vacuno envasadas y molidas (1,4, 11, 22). y entre ellas se han aislado especies de *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Carnobacterium*, entre otras (2, 11). Las condiciones de conservación de carne de vacuno molida, favorecen el crecimiento de las bacterias ácido lácticas

psicrófilas debido a la tolerancia de estos microorganismos a las condiciones atmosféricas y a valores fluctuantes de pH, generalmente bajos (7,13). Las bacterias ácido lácticas capaces de multiplicarse en estas condiciones, pueden tener un importante efecto en la calidad de la carne de vacuno molida (15) y en particular, son difíciles de identificar (10). Aunque se han desarrollado numerosos métodos simplificados para este propósito (5, 12, 15), las cepas no siem-

La problemática taxonómica de muchas bacterias atípicas, se ha ido resolviendo paulatinamente mediante la descripción de nuevas especies tales como: *Leuconostoc gelidum* y *Leuconostoc carnosum* (16) o los nuevos integrantes del género *Carnobacterium* (3, 20, 21).

En el presente estudio, se caracterizan un total de 107 cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de muestras de carne de vacuno molida aplicando taxonomía numérica

MATERIALES Y METODOS

Selección de cultivos y mantenimiento

De un total de 340 aislamientos, se seleccionaron al azar 107 cepas de microorganismos ácido lácticos, colectados durante un estudio que consideró 30 muestras de carne de vacuno molida, durante un periodo de ocho meses.

Las cepas se aislaron en agar MRS (Oxoid) modificado mediante la adición del 1% de cisteína monohidrato y 0,2% de sorbato de potasio, para incrementar el crecimiento de los microorganismos ácido lácticos y prevenir el desarrollo de otros, tales como las levaduras (6). Las cepas fueron posteriormente subcultivadas en agar MRS. Se incluyeron 5 cepas de referencia: *Lactobacillus casei* DSM 20011, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Bacillus subtilis* NCIB 3610, *Bacillus pumillus* NCTC 2599 y *Bacillus cereus* NCTC 10337.

Las colonias purificadas, fueron mantenidas en tubos con agar MRS semisólido a una temperatura de 4°C y subcultivadas en el mismo medio cada dos meses.

Pruebas bioquímicas

Para la realización de las pruebas bioquímicas, cada cepa a examinar fue cultivada a 30°C en medio MRS líquido (Oxoid) durante 18 horas. Inóculos de este cultivo fueron utilizados para realizar las pruebas de identificación. Todas estas pruebas se realizaron siguiendo la metodología de Samelis (14), Dicks (4), Collins (3).

Taxonomía numérica

Del total de 114 pruebas de identificación, sólo se consideraron 27 para el análisis de taxonomía numérica, por ser discriminantes entre sí. Los caracteres taxonómicos fueron codificados como 1 y 0 respectivamente, siendo 1 para el carácter positivo y 0 para el carácter negativo. La similitud entre las cepas fue calculada utilizando el coeficiente de Ssm (17) y el agrupamiento de las cepas fue realizado a través de la técnica de agrupación UPGMA. El test de error fue calculado examinando el 10% de las cepas por duplicado (18). La correlación cofenética fue también estimada (19).

El análisis computacional fue realizado en un Computador modelo 1108 UNIVAC utilizando el programa MINT

del Dr. F.J. Rolf (Departamento de Ecología y Evolución, de la Universidad Estatal de Nueva York) en el Centro de computación de la Universidad de Granada, Granada, España.

RESULTADOS Y DISCUSION

Cada cepa en estudio fue examinada para 114 características fenotípicas. Todas las cepas fueron heterofermentativas y positivas para las siguientes pruebas: tinción de Gram, descarboxilación de ornitina, hidrólisis de esculina, producción de DNAasa, ácido de glucosa, producción de H₂S, ácido de lactosa, crecimiento en jugo de tomate, crecimiento en agar acetato y agar lactato, crecimiento a temperaturas de 10, 15 y 37°C en agar MRS, crecimiento a pH 3, 4, 5, 6 y 7 en agar MSR, rojo de metilo, óxido fermentación de la glucosa, ácido a partir de manitol esculina, inulina, xilitol y sorbosa. Utilizaron como única fuente de carbono y energía: arginina, triptofano, caprilato, isoleucina, lisina, histidina, galactosa, benzoato, alanina, valina, asparragina, serina, succinato, glucosa, sacarosa, xilosa, inulina, sorbosa, salicina, ribosa, celobiosa, trahalosa, arabitol, ramnosa y lactosa.

Las siguientes pruebas fueron negativas para todas las cepas: movilidad, catalasa, oxidasa, crecimiento a 3, 5, 7 y 10% de NaCl, pH 8, 9 y 10, crecimiento a 4 y 42°C, descarboxilación de la lisina, hidrólisis del almidón, caseína, gelatina, lecitina y Tween 80, reducción de KNO₃ al 0,01%, reducción de nitrito a nitrato, crecimiento en caldo verde brillante, lauril sulfato triptosa, caldo EC y caldo MacConkey, crecimiento en agar Salmonella-Shigella, crecimiento en agar nutritivo, agar Levine, agar LIA, crecimiento en agar MRS con verde brillante, telurito de potasio, indol, citrato, Voges Proskauer, ureasa y homofermentación.

El análisis taxonómico fue realizado utilizando las 27 pruebas variantes. El error calculado fue de 1.79% estimado por el método de Sneath y Johnson (18).

Los resultados del análisis de taxonomía numérica utilizando el coeficiente de Ssm y la técnica de agrupación UPGMA se muestran en la Figura 1. Las cepas quedaron agrupadas en cuatro fenones a un nivel de semejanza del 83%. En la Tabla 1 se presentan las características diferenciales entre los cuatro fenones.

La correlación cofenética del presente estudio fue de 0.9367 la cual representa el grado de calidad del dendrograma, como representación gráfica de la matriz de semejanza que lo origina.

Fenon A: Constituido por 10 cepas relacionadas a un nivel de semejanza del 84%. Gram positivas, catalasa y oxidasa negativas, inmóviles, producen amoniaco a partir de arginina. Producen ácidos de manosa, sacarosa, maltosa, trahalosa, celobiosa, glicerol, rafinosa, xilosa, glucosa.

Tabla 1.- Frecuencia de caracteres positivos encontrados en cada fenon expresados como porcentaje del total de pruebas realizadas.

| Fenon | A | B | C | D |
|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|
| N° de Cepas | 10 | 87 | 8 | 3 |
| Crecimiento en: | | | | |
| 0% NaCl | 0 | 1 | 13 | 0 |
| 5% | 0 | 5 | 0 | 0 |
| 8% | 30 | 9 | 0 | 0 |
| 10% | 0 | 3 | 0 | 0 |
| Crecimiento a: | | | | |
| 10°C | 0 | 3 | 0 | 0 |
| 45°C | 20 | 64 | 0 | 100 |
| Acidos a partir de: | | | | |
| Arabinosa | 70 | 100 | 100 | 67 |
| Ramnosa | 10 | 89 | 25 | 0 |
| Manosa | 100 | 35 | 100 | 100 |
| Sacarosa | 90 | 100 | 100 | 100 |
| Maltosa | 90 | 94 | 100 | 33 |
| Trehalosa | 80 | 80 | 38 | 100 |
| Celobiosa | 90 | 92 | 100 | 100 |
| Sorbitol | 70 | 77 | 75 | 0 |
| Glicerol | 90 | 54 | 50 | 33 |
| Fructosa | 60 | 74 | 100 | 100 |
| Dulcitol | 70 | 53 | 63 | 67 |
| Rafinosa | 100 | 94 | 88 | 0 |
| Galactosa | 20 | 56 | 88 | 100 |
| Adonitol | 50 | 92 | 100 | 100 |
| Xilosa | 90 | 54 | 75 | 0 |
| Glucosa | 90 | 94 | 75 | 67 |
| Ribosa | 90 | 86 | 88 | 100 |
| Arabitol | 70 | 74 | 75 | 33 |
| Salicina | 90 | 78 | 100 | 67 |
| Hemólisis | 80 | 82 | 75 | 67 |
| NH ₃ de arginina | 80 | 93 | 100 | 33 |

ribosa y salicina. Son hemolíticos e incapaces de crecer en 0, 5 y 10% de cloruro de sodio. Las características fenotípicas de este grupo lo clasifican taxonómicamente dentro del género *Lactobacillus* grupo 1, subgénero *Termobacterium* (8). La única diferencia con este subgénero, se debe a que las cepas incluidas en el fenon A producen ácido de la ribosa (9).

Fenon B: Está representado por 86 cepas unidas a un nivel de semejanza del 83%. Son microorganismos Gram positivos, catalasa y oxidasa negativos e inmóviles, incapaces de reducir los nitratos. Producen ácidos a partir de arabinosa, ramnosa, sacarosa, maltosa, trehalosa, rafinosa, celobiosa, adonitol, glucosa, ribosa. Son hemo-

líticas y producen NH₃ de arginina. Por las características que presentan estas bacterias, quedan incluidas en el género *Lactobacillus* grupo III, subgénero *Betabacterium*, que es heterofermentativo estricto. Algunas especies de este subgénero se desarrollan a 45°C y otras únicamente a 15°C.

Fenon C: Se encuentra constituido por ocho cepas unidas a un nivel de semejanza del 85%. Todos son bacilos Gram positivos, inmóviles, catalasa y oxidasa negativos. No reducen los nitratos. Producen hemolisina. Incapaces de crecer en medios con 10% de cloruro de sodio y a una temperatura de 45°C, producen ácido a partir de arabinosa, manosa, sacarosa, maltosa, celobiosa, fructosa,

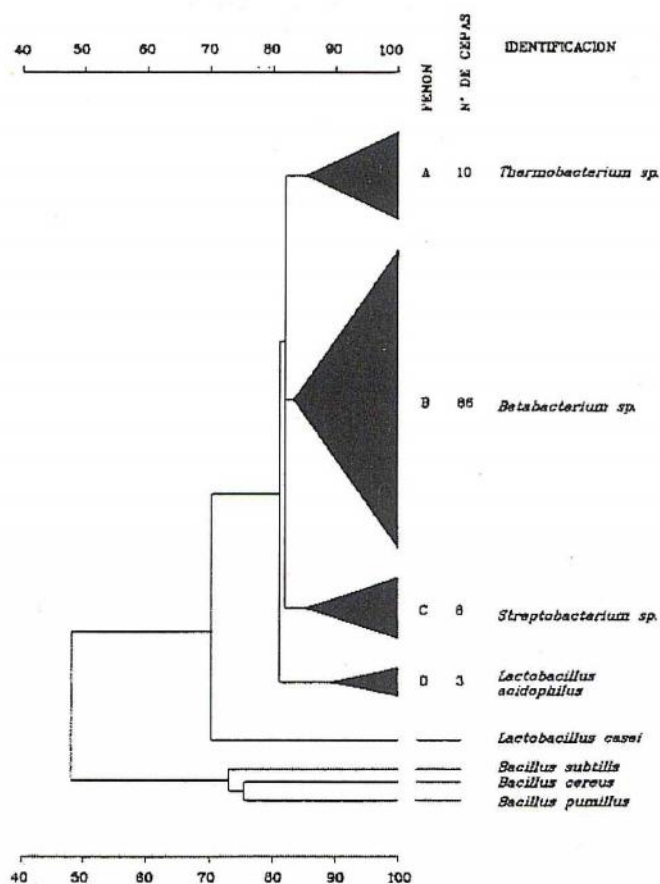


Figura 1.- Dendrograma simplificado basado en : el coeficiente de Ssm, la técnica de agrupación UPGMA y las relaciones entre los 4 fenones definidos (83% de similitud).

rafínosa, galactosa, adonitol, ribosa y salicina. Producen amoníaco a partir de arginina. Este grupo queda incluido en el género *Lactobacillus*, grupo II y subgénero *Streptobacterium*. Este subgénero es heterofermentativo facultativo, capaz de utilizar la glucosa como única vía homofermentativa. Estos microorganismos no crecen a 45°C, pero sí a 15°C. Nuestras cepas coinciden en la mayor parte de las pruebas con las características de este subgénero (9).

Fenon D: Formado por tres cepas unidas a un nivel de semejanza de un 87%. Es el único fenon en el que ha quedado incluida una de las cepas de referencia, *Lactobacillus acidophilus*. Todas las cepas de este fenon producen ácido a partir de: manosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa, fructosa, galactosa, adonitol y ribosa. No producen ácido a partir de ramnosa, sorbitol, rafínosa y xilosa. No crecen en presencia de cloruro de sodio. Crecen a 45°C. *L. acidophilus* pertenece a las especies de *Lactobacillus* homofermentativos estrictos, que crecen a 45°C, pero no a 15°C y producen CO₂. Este microorganismo es uno de los

lactobacilos simbiotes en el intestino, debido a su interacción o inhibición con otros microorganismos. Se encuentra también en los cereales y leches fermentadas(9)

REFERENCIAS

- Allen, J.R. & Foster, E. M. (1960). Spoilage of vacuum packed sliced processed meats during refrigerated storage. Food Research 23:19-25
- Borch, E. & Molin, G.(1988). Numerical taxonomy of psychrotrophic lactic acid bacteria from prepacked meat and meat products. A. van Leeuwen. 54:301-323
- Collins, M.D.; Samelis, J.; Metaxopoulos, J.; Wallkanks, J. (1993). Taxonomic studies of some *Leuconostoc* - like organism from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* from the *Leuconostoc* paramesenteroides group of species. J. App. Bacteriol. 75:595-603
- Dicks, L.M.T.; Dellaglio, F & Collins, M.D. (1995). Propos to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* gen. nov comb nov. Int. System. Bacteriol. 45:395-397
- Döring, B.; Ehrhardt, S.; Lücke, F. K.; Schillinger, V. (1988) Computer-assisted identification of lactic acid bacteria from meat System. and Appl. Microbiol. 11:67-74
- Dykes, G.A.; Britz, T.J. & von Holey A. (1994). Numeric taxonomy and identification of lactic acid bacteria from spoiled vacuum pakkaged vienna sausages. J. Appl. Bacteriol. 76:246-251
- Egan, A.F. (1983). Lactic acid bacteria of meat and meat product A. van Leeuwen. 49:327-336
- Gasser, F. (1994). Safety of lactic acid bacteria and the occurrence in human clinical infections. Bull. Ins. Past. 92:45-6
- Kandler, O. & Weiss, N. (1986). Genus *Lactobacillus*. In P.H.L. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and T.G. Holt (editors), Bergey Manual of Systematic Bacteriology, Vol 2. William and Wilkin Baltimore M.D. pp. 1209-1234
- Kandler, O. (1984). Current taxonomy of lactobacilli. Developments in Industrial Microbiology, Vol 25 ed. Nash, C.I and Underkofler. L.A. pp. 109-123. Baltimore:Victor Grepheis.
- Korkeala, H.; Suortti, T. & Mäkela, P. (1988). Ropye slin formation in vacuum-packed cooked meat products caused by homofermentative lactobacilli and a *Leuconostoc* species. Int. Food Microbiol. 7:339-347
- Lee, B.H. & Simard, R.E. (1984). Three system for biochemic characterization of lactobacilli associated with meat spoilage. Food Protect. 47:937-942
- Reuter, G. (1981). Psychrotrophic lactobacilli in meat produc In: Psychrotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenici Reber, T.A., Hobbs, G., Christian, J.H.B and Skoygaard, N. (ed) London: Academic Press. pp. 253-258
- Samelis, J.; Maurogenakis, F. & Metaxopoulos, J. (1994) Characterization of lactic acid bacteria isolated from natural fermented greek dry salami. Int. J. Food Microbiol. 23:179-196

15. Schillinger, U. & Lücke, F.K. (1987). Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiol.* 4:199-208
16. Shaw, B.G. & Harding, C.D. (1989). *Leuconostoc gelidum* sp. Nov. And *Leuconostoc carnosum* sp.nov. from chill stored meats. *Int. J. System. Bacteriol.* 39:217-223
17. Sokal, R.R. & Michener, C.D. (1958). A statistical method for evaluating systematic relationship. *Univ. Kans. Sci. Bull.* 38: 1409-1438
18. Sneath, P.H.A. & Johnson, R. (1972). The influence on numerical taxonomic similarities of error in Microbiological test. *J. Gen. Microbiol.* 72:377-392
19. Sneath, P.H.A. & Sokal, R.R. (1973). Numerical Taxonomy. The principles and practice of Numerical Classification. San Francisco. W.H. Freeman. 1973
20. Stiles, M.E. & Holzappel, W.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36:1-29
21. Schleifer, K.H. & Ludwig, W. (1995). Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *System. Appl. Microbiol.* 18:461-46
22. VonHoly, A.; Cloete, T.E. & Holzopf, W.H. (1991). Quantification and characterization of microbial population associated with spoiled vacuum-packed Vienna sausages. *Food Microbiol.* 8: 95-104