

# Evaluación del método petrifilm para la determinación del recuento de microorganismos aerobios mesofilos totales, en drogas vegetales

*Evaluation of petrifilm method for total aerobic mesophyllic microorganisms count determination in vegetable drugs*

AMER, L.<sup>1</sup>; DE BATTISTA, G.<sup>2</sup>; MEDVEDEFF, M.<sup>1</sup> Y BARGARDI, S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cátedra de Microbiología Gral. (Bqca). <sup>2</sup> Cátedra Análisis Farmacéutico (Fcia.). Universidad Nacional de Misiones. Av. Mariano Moreno 1375. 3300 Posadas - Misiones, Argentina. E-mail: sebarces@escenf.unam.edu.ar

## RESUMEN

Se compararon dos metodologías de cuantificación de mesófilos aerobios totales: el método estándar propuesto por la Food and Drug Administration (FDA) y el método de recuento en placas Petrifilm®.

Fueron estudiadas 25 muestras de drogas vegetales en envases individuales. Se encontraron diferencias significativas con un  $p < 0,001$  entre el método estándar y el método de placas Petrifilm® para el recuento de mesófilos aerobios, con un 95% de probabilidad.

El análisis de regresión del  $\log_{10}$  de la media geométrica del recuento de mesófilos aerobios totales versus el  $\log_{10}$  del recuento por placas Petrifilm, para recuentos entre  $10^4$  y  $10^6$ , indica una correlación de 0,964 entre ambos métodos. Las placas Petrifilm® podrían considerarse como método alternativo para el recuento de mesófilos aerobios totales en los controles microbiológicos en los procesos de industrialización de las drogas vegetales para su posterior comercialización.

PALABRAS CLAVES: drogas vegetales \* mesófilos aerobios totales \* Petrifilm®.

## ABSTRACT

*Two total aerobic mesophyllic quantifying methods were compared: the standard method proposed by Food and Drug Administration (FDA) and the Petrifilm® plates count method.*

*25 vegetable drug samples individually packed were analyzed. Significant differences with a  $p < 0,001$  and 95% of likelihood were found between the two methods.*

*The regression analysis of the geometric mean  $\log_{10}$  of the total aerobic mesophyllic microorganisms count, versus the  $\log_{10}$  of the Petrifilm® plates count, for counts between  $10^4$  and  $10^6$ , showed a 0,964 correlation between both methods. Petrifilm® plates count might be considered an alternative method for total aerobic mesophyllic microorganisms count in microbiological controls of vegetable drugs industrialization processes for further marketing.*

KEY WORDS: vegetable drugs \* total aerobic mesophyllic \* Petrifilm®.

## INTRODUCCIÓN

Motivó este trabajo la necesidad de encontrar métodos alternativos para el control microbiológico de drogas vegetales que puedan ser utilizados en los procesos de industrialización y en los productos comercializados, que ofrezcan venta-

jas con respecto a los métodos oficiales convencionales. Se evaluó el uso de placas Petrifilm para el recuento de mesófilos aerobios totales.

Las placas Petrifilm® recuento de aerobios constituyen un sistema listo para usar que con-

tiene los elementos nutritivos del agar para recuento (PCA), un agente gelificante soluble en agua, y un indicador de tetrazolio que facilita la enumeración de las colonias. Este método es reconocido por la Association of Official Analytical Chemists (AOAC) para el recuento bacteriano y coliformes en leche (Wallace 1995a) y el recuento de aerobios en alimentos (Wallace 1995b). De la búsqueda bibliográfica realizada

no surgió que el método Petrifilm haya sido validado y propuesto en drogas vegetales (FNA 1978, USP 1995, AOAC 1995).

El método de la FDA (Peller y Maturin 1992) requiere en cambio de la preparación del medio de cultivo (PCA) que se debe distribuir en tubos conteniendo volúmenes establecidos y mantenidos en baños termostáticamente controlados como así también del mezclado del medio y del inóculo.

## MATERIALES Y METODOS

Se examinaron 25 muestras, de mezclas de drogas vegetales utilizadas en la medicina natural como digestivas, contenidas en envases individuales entre 70 y 100 g cada una, disponibles en comercios para su venta. Luego de adquiridas se analizaron inmediatamente en el laboratorio.

Las drogas vegetales presentes en todas las muestras según lo indicado en el rótulo fueron boldo, cedrón, poleo y carqueja. Integraban las mezclas pero no en todas las muestras, las hierbas de nombre popular incayuyo, tomillo, paico, fumaria, peperina y burrito.

Cada envase individual se homogeneizó previamente por agitación durante 3 minutos. Se tomó 10 g de la muestra, se agregaron 200 mL de solución fisiológica peptonada (SFP) y se llevó a pH 7 (IRAM 1996). Posteriormente se prepararon diluciones decimales.

**Recuentos de aerobios:** Sobre un total de 25 muestras, se sembraron por duplicado para cada dilución las placas con PCA(2) y las placas Petrifilm para recuentos de aerobios. Se incubaron a 35°C durante 48 horas.

El recuento de las placas con PCA y placas Petrifilm se realizó con un contador de colonias electrónico tipo IONOMEX mod. ACC-91, siguiendo la metodología propuesta por FDA y la guía de interpretación Petrifilm para recuentos de aerobios. Se contaron las placas que tenían entre 25 y 250 colonias para el método estándar y para Petrifilm.

Las placas que se licuaron en el caso de Petrifilm se las contó, de acuerdo a la guía de interpretación Petrifilm 3M, realizando un recuento estimado contando las áreas no afectadas. En aquellas placas en el método estándar, que aparecieron con "spreader" se procedió como propone la FDA.

El diseño propuesto para la comparación de los métodos fue el de protocolo acoplado, dado que el ensayo se realizó sobre la misma muestra y las medias geométricas se calcularon con  $n=25$ .

Los datos fueron también examinados haciendo gráficos del  $\log_{10}$  del recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales versus el  $\log_{10}$  del recuento por placas Petrifilm (Nelson y cols. 1984, Speranza y cols. 1997).

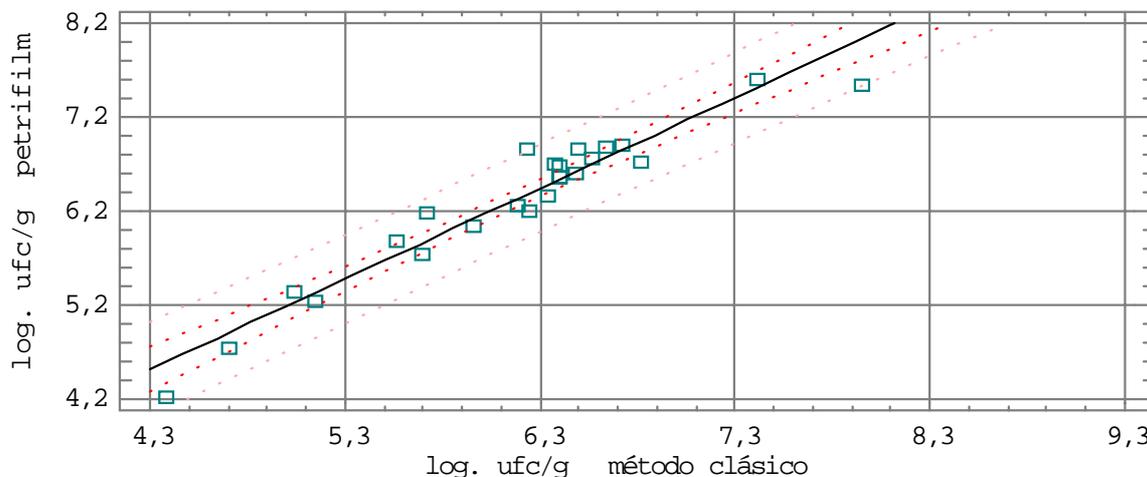
## RESULTADOS

Se presentó en el gráfico 1 la línea de regresión con una pendiente de 0,9652 y una intersección de 0,3624 con los límites de confianza del 95% y un coeficiente de correlación 0,964,

para valores de recuentos entre  $10^4$  y  $10^6$ .

En la tabla 1 se presentó los valores de recuentos obtenidos por el método de la FDA y el método de las placas Petrifilm.

GRÁFICO 1.- Comparación recuento de mesófilos aerobios totales en drogas vegetales. Método estándar (FDA) versus método Petrifilm.



Referencias:

- línea de regresión
- banda de confianza para valores individuales
- banda de confianza para valores medios

TABLA I. Resultados obtenidos del recuento por el método FDA y el método Petrifilm.

Muestra	ufc/g método estándar	log. ufc/g	ufc/g método petrifilm	log ufc/g
1	1.8 10 <sup>6</sup>	6.25	1.6 10 <sup>6</sup>	6.20
2	5.0 10 <sup>4</sup>	4.70	5.4 10 <sup>4</sup>	4.73
3	5.3 10 <sup>6</sup>	6.72	8.1 10 <sup>6</sup>	6.90
4	9.1 10 <sup>5</sup>	5.96	1.1 10 <sup>6</sup>	6.04
5	2.4 10 <sup>4</sup>	4.38	1.7 10 <sup>4</sup>	4.23
6	1.1 10 <sup>5</sup>	5.04	2.2 10 <sup>5</sup>	5.34
7	5.1 10 <sup>5</sup>	5.70	5.5 10 <sup>5</sup> *	5.74
8	3.7 10 <sup>5</sup>	5.57	7.8 10 <sup>5</sup>	5.89
9	5.3 10 <sup>5</sup>	5.72	1.5 10 <sup>6</sup>	6.18
10	1.7 10 <sup>6</sup>	6.23	7.4 10 <sup>6</sup>	6.87
11	3.2 10 <sup>6</sup>	6.50	7.2 10 <sup>6</sup>	6.86
12	6.6 10 <sup>6</sup>	6.82	5.2 10 <sup>6</sup>	6.72
13	3.7 10 <sup>6</sup>	6.57	5.6 10 <sup>6</sup>	6.75
14	4.4 10 <sup>6</sup>	6.64	7.6 10 <sup>6</sup>	6.88
15	1.5 10 <sup>6</sup>	6.18	1.8 10 <sup>6</sup>	6.26
16	2.2 10 <sup>6</sup>	6.34	2.3 10 <sup>6</sup>	6.36
17	2.4 10 <sup>6</sup>	6.38	5.0 10 <sup>6</sup>	6.70
18	2.5 10 <sup>6</sup>	6.40	4.8 10 <sup>6</sup>	6.68
19	2.5 10 <sup>6</sup>	6.40	3.7 10 <sup>6</sup>	6.57
20	1.4 10 <sup>5</sup>	5.15	1.8 10 <sup>5</sup>	5.25
21	2.6 10 <sup>7</sup>	7.41	4.0 10 <sup>7</sup>	7.60
22	8.9 10 <sup>7</sup>	7.95	3.4 10 <sup>7</sup>	7.53
23	3.0 10 <sup>6</sup>	6.48	4.0 10 <sup>6</sup>	6.60
24	2.5 10 <sup>6</sup>	6.40	3.6 10 <sup>6</sup>	6.56
25	4.4 10 <sup>6</sup>	6.64	5.6 10 <sup>6</sup>	6.75

## DISCUSIÓN

El valor calculado de  $t$  para mesófilos, mayor que el tabulado, indica con un  $p < 0,001$  que hay diferencia entre el método estandarizado y el de las placas Petrifilm, en las experiencias realizadas (Daniel 1987).

Es importante considerar que ningún medio de cultivo por sí solo, recupera siempre las mismas cepas exactas ni enumera una cepa particular exactamente como otros medios. Por otro lado, hay otros factores externos a considerar: los tiempos de inoculación y manipulación, que pudieron haber incidido en la recuperación y enume-

ración, habiendo producido esta diferencia entre ambos métodos.

Teniendo en cuenta los resultados del análisis de regresión puede considerarse una muy buena alternativa el uso de placas Petrifilm para el recuento de mesófilos aerobios totales. La sencillez de la técnica Petrifilm, la eliminación de la preparación de los medios de cultivo, la mejor visualización de las colonias y el insumo de menor tiempo y economía, ofrecen ventajas que justificarían su utilización para el control microbiológico en los procesos de industrialización de drogas vegetales.

## AGRADECIMIENTOS

— Al Centro de Investigación y desarrollo de la Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales (CIDET).

— A 3M Argentina por donar parte de las placas Petrifilm utilizadas para la realización del trabajo.

— A la Prof. de inglés Cristina Mayol de la FCEQyN y a la Prof. Cristina Artusi.

## REFERENCIAS

- Daniel W. (1987). Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 3ª ed. Limusa Noriega, México, pp.184-194.
- FNA (Farmacopea Nacional Argentina). (1978). 6ª ed.
- Ginn R., Packard V., Fox T. (1986). Enumeration of Total Bacteria and Coliforms in Milk by Dry Rehydratable Film Methods: Collaborative Study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69-3**:527-531.
- Nelson C., Fox T., Busta F. (1984). Evaluation of Medium Film Petrifilm (VRB) for Coliform Enumeration. *J. Food Prot.*, **47-7**:520-525.
- Norma IRAM N°37510-1. Instituto Argentino de Normalización (1996). Drogas vegetales. Determinación de la carga microbiana en materia prima y en productos terminados a base de drogas crudas.
- Peeler J. y Maturin L. (1992). Aerobic Plate Count. FDA Bacteriological Analytical Manual, 7ª edn. AOAC, Arlington VA pp.17-26.
- Programa de estadística Statgraphics plus 3.0 (1997). Manugistics, Inc. Rockville, Maryland, USA.
- Speranza J., Demaría M., Páez R., Gallino R. (1997). Evaluación del método Petrifilm-3M para la determinación del recuento total de bacterias aerobias mesófilas, de coliformes totales y enumeración de *E. coli*. *Industria Lechera*, **710**:18-22.
- USP (Farmacopea de los Estados Unidos). (1995). 23ª edn.
- Wallace A. (1995a). Microbiological Methods. AOAC Official Method of Analysis. Supplement March 1996. Bacterial and Coliform Counts in Milk (986-33), 16ª edn. Patricia Cunniff, 1-17, pp.12B-12C.
- Wallace A. (1995b). Microbiological Methods. AOAC Official Method of Analysis. Supplement March 1995. Aerobic plate count in foods (990.12), 16ª edn. Patricia Cunniff, 1-17, pp.10-11.