

MVZ-Córdoba 2004; 9:(2), 428-437

ORIGINAL

## Efectividad del agua electrolizada oxidadora (EO) en la inactivación de *Listeria monocytogenes* en lechuga (*Lactuca sativa* L.)

Casadiego P, Cuartas R, Mercado M, J Carrascal AK\*

\*Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Departamento de Física Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Departamento de Microbiología. Bogotá D.C. \*Correspondencia: E-mail: acarrasc@javeriana.edu.co

### RESUMEN

Se evaluó la efectividad del agua electrolizada oxidadora (EO) en la inactivación de *Listeria monocytogenes* en lechuga; para ello se construyó una celda electrolítica para la producción de agua EO a partir de una solución de NaCl al 5%, con una concentración de cloro residual de 29 partes por millón (ppm) y pH 2.83. Cinco de las 10 cepas de *Listeria monocytogenes* más resistentes a la acción del hipoclorito de sodio, fueron obtenidas a partir de muestras de pollo procesado e inoculadas en 9 ml de agua EO o 9 ml de agua desionizada estéril (control) e incubadas a 15°C durante 5, 10, 15 y 20 minutos. La población se determinó por recuento en placa en agar Columbia, obteniéndose una reducción de 6.6 UL a los 5 minutos de exposición. Las cepas seleccionadas fueron utilizadas como suspensión mixta (9.56 UL, 10<sup>9</sup> UFC/ml) para inocular 35 lechugas por el método de inmersión. Se sumergieron 6.25 g de cada lechuga en 375 ml de agua EO o agua destilada (control) a 15 °C durante 5 minutos. La población promedio de *Listeria monocytogenes* después del tratamiento con agua EO y con agua destilada, se redujo en 3.92 y 2.46 UL respectivamente. Se demostró que el agua EO tiene un efecto bactericida estadísticamente significativo ( $p=0.00001$ ). Para mejorar el efecto del agua EO sobre *L. monocytogenes* en lechuga, se evaluó su efectividad en combinación con ácido acético al 6% (vinagre). Reducción de la población en 5.49 UL demuestran que hay un efecto sinérgico de ambos agentes antimicrobianos sobre la viabilidad de las células de *L. monocytogenes*.

Palabras clave: Agua electrolizada, lechuga, *L. monocytogenes*, desinfectante.

## Effectiveness of electrolyzed water on the inactivation of *Listeria monocytogenes* in lettuce (*Lactuca sativa* L.)

### ABSTRACT

The effectiveness of electrolyzed oxidizing water for inactivating *L. monocytogenes* in suspension and inoculated in lettuce was evaluated. An electrolytic cell for the production of EO water was built and a solution of 5% NaCl was used. The EO water produced had a residual chlorine concentration of 29 parts per million (ppm) and pH 2.83. Ten strains of *L. monocytogenes* isolated from processed chicken (10<sup>9</sup> CFU/ml) were inoculated on 9 ml of EO water or 9 ml of deionized water (control) and incubated at 15°C for 5, 10, 15 and 20 min. The surviving population of each strain was determined on Columbia agar. An exposure time of 5 min reduced the populations by approximately 6.6 log CFU/ml. The most resistant strains to hypochlorite (NaOCl) were selected and used in a strain mixture (9.56 log CFU/ml, 10<sup>9</sup>UFC/ml approximately) for the inoculation of 35 lettuces by the dip

inoculation method using distilled water as control. The population mean of *L. monocytogenes* after treatment with EO water and distilled water was reduced by 3.92 and 2.46 log CFU/ml respectively ( $p= 0.00001$ ). EO water and 6% acetic acid (vinegar) were combined for improve the EO water effect on *L. monocytogenes* inoculated in lettuce, the effectiveness of this combination were examined. The results showed that there was a synergistic effect of both antimicrobial agents (population reduction by 5.49 log CFU/ml approximately) on the viability of *L. monocytogenes* cells.

**Key words:** Electrolyzed water, lettuce, *L. monocytogenes*, disinfection.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad el consumo de hortalizas en Colombia se ha convertido en un factor crítico en el desarrollo de una amplia variedad de enfermedades de orden entérico, parasitario y viral, principalmente, con diferentes niveles de gravedad como la fiebre tifoidea, la amibiasis y la listeriosis. Esta última la cual, estadísticamente se le atribuye en un 12% al consumo de lechuga, en el altiplano cundiboyacense.

*L. monocytogenes* es un microorganismo patógeno de interés público a nivel mundial debido a que a diferencia de otras infecciones transmitidas por alimentos tiene una alta tasa de mortalidad (23%). Este microorganismo es agente causal de un síndrome generalizado llamado Listeriosis (ICMSF, 1996); por ser resistente a condiciones de estrés es difícil de destruir y puede ser ingerido fácilmente a través de hortalizas, alimentos crudos, para los cuales no hay un proceso de desinfección conveniente para eliminarlo.

Como solución a este problema se realizan procesos de lavado y desinfección a los alimentos, que incluyen el uso de sustancias químicas como el cloro, los ácidos orgánicos, el ozono, etc. En algunos casos, estas sustancias tienen un efecto limitado sobre los microorganismos patógenos lo que no permite su remoción. Debido a esto existe la necesidad de un método que sea efectivo en el tratamiento microbiano de los alimentos y que permita la eliminación de los microorganismos patógenos. El agua electrolizada oxidadora (agua EO) es producto de un nuevo concepto desarrollado en Japón, y puede ser una alternativa eficaz en el tratamiento desinfectante de

productos frescos como los vegetales (Venkitaranayanan *et al.* 1999a; Koseki *et al.* 2003). La electrólisis de una solución acuosa de cloruro de sodio (NaCl) muy diluida en una cámara de electrólisis donde el ánodo y el cátodo están separados por una membrana, imparte fuertes propiedades bactericidas al agua producida en el ánodo, la cual posee un pH cercano a 2.7 y una concentración de cloro disponible entre 10 y 80 ppm, en forma de ácido hipocloroso. De esta forma, el uso del agua electrolizada ácida en la desinfección de los vegetales, elimina sustancialmente la carga microbiana patógena, evitando la transmisión de enfermedades (Cháves *et al.* 2004).

Se han realizado estudios en los cuales se ha evaluado la eficacia del agua EO sobre diferentes patógenos como *E. coli*, *Salmonella enteritidis* y *L. monocytogenes* con una reducción considerable de unidades logarítmicas en comparación con la concentración inicial en diferentes alimentos (Bari *et al.* 2003), (Koseki *et al.* 2003), (Venkitanarayanan *et al.* 1999), (Venkitanarayanan *et al.* 1999), (Koseki y Itoh, 2001). Adicionalmente en 2003 Cháves y Medina, diseñaron un clorinador eléctrico para la producción de agua EO que fue utilizada eficientemente en la destrucción de microorganismos presentes en lechuga.

El objetivo de esta investigación fue el de evaluar la efectividad del agua electrolizada sobre *Listeria monocytogenes* inoculada en hojas de lechuga. Asimismo, se estandarizó el tiempo de acción del agua electrolizada para inactivar *L. monocytogenes* en suspensión.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### La celda electrolítica y caracterización del agua electrolizada

Siguiendo los parámetros de Cháves et al. en 2004, con la modificación de dos mangueras laterales para permitir la salida del agua anódica y catódica respectivamente, se construyó una celda en vidrio de 3.3 litros con una membrana de PVC (Darnel®) para separar el agua electrolizada en ácida y alcalina y permitir el paso de los iones. El material para los electrodos fue grafito; el voltaje aplicado fue 14 voltios DC y la corriente medida fue de 0.4 amperios. Se preparó una solución de cloruro de sodio (NaCl) al 5% con agua desionizada para alimentar la celda electrolítica (Izumi et al. 2000). Durante el tiempo de electrólisis del agua, se determinó el pH tanto del agua ácida como del agua alcalina, producidas y la cantidad de cloro libre o residual presente en el agua a los 3, 5, 7 y 10 minutos. En estas determinaciones se utilizó un pH-metro previamente calibrado, fabricado por el Centro de Equipos Interfacultades (CEIF) de la Universidad Nacional de Colombia y la técnica espectrofotométrica mediante el Kit cloro Spectroquant (Merck, Darmstat, Alemania ref. 1.00598.0001)

### Selección y curva de crecimiento de *Listeria monocytogenes*

Se utilizaron diez cepas de *Listeria monocytogenes*, suministradas por el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Pontificia Universidad Javeriana, previamente aisladas por Correa y Fonseca en 2004, a partir de pollo procesado (122, 163, 91, 127, 227, 121, 244, 96, 131 y 155). Para la elaboración de la curva de crecimiento se tomaron 3 ml cada dos horas durante el proceso de fermentación de la *L. monocytogenes* en caldo Columbia suplementado con ácido nalidixico para determinar la biomasa por densidad óptica a 540 nm, hasta establecer el tiempo en el cual la cepa alcanzó su fase estacionaria.

### Efecto bactericida del agua EO sobre el cultivo de *Listeria monocytogenes*:

A partir del cultivo de *L. monocytogenes* en fase estacionaria, se tomaron alícuotas de 1 ml y se

realizaron diluciones seriadas ( $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ ) en 9 ml de agua EO. La actividad bactericida del agua EO se evaluó en diferentes tiempos (5, 10, 15 y 20 minutos) a temperatura ambiente. Después de cada tiempo de incubación, el número de células vivas en cada muestra fue determinado tomando 1 ml de cada tratamiento para hacer el recuento en placa en agar Columbia. Las colonias de *L. monocytogenes* fueron contadas después de 48 horas de incubación a 37°C (Venkitanarayanan et al. 1999).

### Efecto bactericida del agua EO sobre *L. monocytogenes* inoculada en hojas de lechuga

Como inóculo se utilizó un *pool* de cinco cepas de *L. monocytogenes* escogidas entre las diez iniciales, como las más resistentes a la acción bactericida del cloro. Esta selección se realizó mediante una prueba de difusión en agar en discos papel Waltman No. 3 estériles impregnados con hipoclorito de sodio en concentraciones de 5250ppm, 52.5ppm y 0.525ppm respectivamente. Como control se utilizó agua desionizada estéril. Cada cepa de *L. monocytogenes* fue cultivada en 10 ml de caldo Columbia suplementado con 50 µg/ml de ácido nalidixico a 37°C durante 5 horas a 120 rpm. Posteriormente, el cultivo se transfirió a 100 ml de caldo Columbia en un erlenmeyer de 250ml y se incubó bajo las mismas condiciones durante 12 horas; las células se recogieron por centrifugación (3.500 rpm durante 15 min a 22°C) y el precipitado se resuspendió en 14 ml de agua peptonada estéril al 0.1% (pH 7.1) distribuidos en siete tubos de 15 ml. De cada suspensión se tomaron volúmenes iguales y se mezclaron para formar un inóculo mixto de las cinco cepas con un volumen final de 125ml. El inóculo fue mantenido a 15°C y se aplicó a las lechugas al cabo de una hora de preparación. La población bacteriana de cada inóculo fue determinada a partir de la dilución  $10^{-8}$  de la suspensión inicial por recuento en profundidad en placas de agar Columbia por duplicado. (Park et al. 2001, Bari et al. 2003, Koseki et al. 2003).

Se recolectaron 35 unidades de lechuga provenientes de supermercado, que fueron almacenadas a 4°C antes de ser inoculadas, con un intervalo máximo de dos días (Österblad et al. 1999). Siguiendo el método de inoculación por inmersión descrito por Koseki et al. en 2003, el tratamiento de las hojas de lechuga

inoculadas se llevó a cabo por inmersión de 6.25 g de hojas de lechuga en 375 ml de agua EO y de agua destilada (control) respectivamente en bolsas plásticas durante 5 minutos.

Las lechugas anteriormente tratadas, fueron lavadas con 50 ml de agua peptonada estéril y maceradas por 1 minuto. A partir de la solución resultante se realizaron diluciones  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  para el tratamiento con agua EO y diluciones  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$  para el tratamiento control en agua peptonada estéril (0.1%). Luego, se tomó 1 ml de cada una para realizar el recuento en placa en agar Columbia por duplicado. Las placas se llevaron a incubar a 37°C durante 48 horas. Después de este tiempo se realizó el recuento de las colonias características de *L. monocytogenes*.

### Efecto combinado del agua EO y ácido acético al 0.6% sobre lechuga inoculada con *L. monocytogenes*

Se utilizaron tres lechugas tratadas con una solución de vinagre después del tratamiento con agua EO o con agua destilada (control). El análisis microbiológico se realizó como se describió en el apartado anterior.

### Pruebas de concentración mínima inhibitoria (CMI)

A partir de una solución de Hipoclorito de sodio al 5.6% se realizaron diez diluciones seriadas 1:2 en agua destilada estéril. Estas diluciones fueron inoculadas con una asada de suspensión de *L. monocytogenes* en fase estacionaria. Después de 5 minutos de tratamiento se sembró una asada de cada dilución por triplicado en tubos de 5 ml de caldo Columbia suplementado con 50µg/ml de ácido nalidíxico. Los tubos se incubaron durante 48 horas a 37°C. Finalmente, se determinó la CMI observando el crecimiento de *L. monocytogenes* por turbidez en cada dilución de hipoclorito de sodio (Lúnden, 2004) Este procedimiento también se realizó para la cepa más sensible con el fin de comparar los resultados con las cepas utilizadas en este estudio.

### Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante pruebas de hipótesis con t student.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### La celda electrolítica y producción del agua EO

El agua electrolizada se obtuvo en la celda electrolítica construida de acuerdo con la metodología descrita en tiempos relativamente cortos y un consumo de potencia bajo, alrededor de los 6 vatios; el voltaje fue de 14 voltios y la corriente de 0.4 amperios. El agua electrolizada oxidadora requerida debería tener características similares a la utilizada en estudios realizados previamente para la inactivación de *L. monocytogenes*, en donde se utilizó agua EO con valores de pH 2.5 y 45 ppm de cloro residual (Park *et al.* 2001), pH 2.5 y 72 ppm de cloro residual (Venkitanarayanan *et al.* 1999), pH 2.6 y 30 ppm de cloro residual (Bari *et al.* 2003), y pH 2.63 y 43 ppm y 48.5 ppm de cloro residual (Venkitanarayanan *et al.* 1999); adicionalmente, se buscaba una solución desinfectante que en lo posible no aportara sabor a la lechuga.

En primer lugar se evaluó el agua electrolizada con concentraciones de NaCl de 2.5%, 3.0%, 3.5%, 4.0%, 4.5%, 5.0% y 5.5%. Después de 5 minutos de electrólisis, el pH de las soluciones de sal eran menores de 3.0 (Figura 1), al cabo de este tiempo se tomó la primera muestra de agua para determinar la concentración de cloro residual presente y la segunda se tomó a los 10 minutos de electrólisis. La mayor concentración de cloro residual (47.68 ppm) se obtuvo en la solución de NaCl al 5% después de 10 minutos de electrólisis y la menor (0.38 ppm) correspondió a la concentración de 2.5% de NaCl después de 5 minutos de electrólisis (Figura 2). Entre 2.5% y 3.5% de NaCl, el valor máximo fue de 5.83 ppm (concentración de cloro residual muy baja), obtenido en la solución de 3.5% de NaCl; razón por la cual estas soluciones fueron descartadas. En el estudio se utilizó la solución de NaCl al 5% por presentar la mayor concentración de cloro.

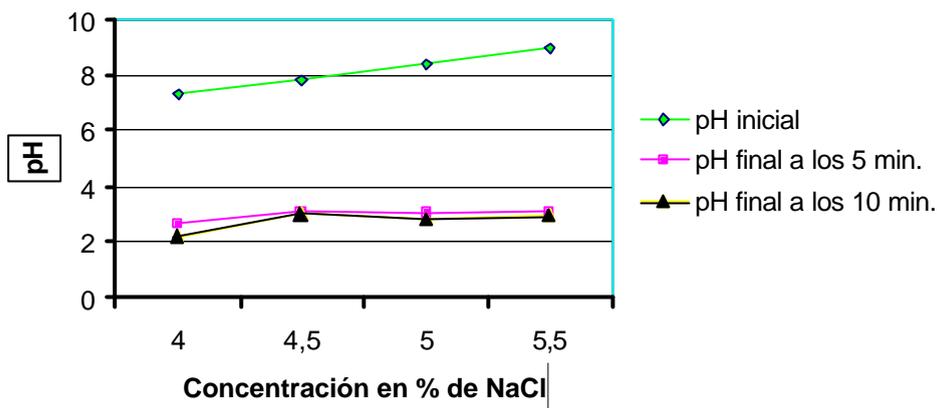


Figura 1. Cambio de pH del agua anódica durante el proceso de electrólisis a diferentes concentraciones de pH

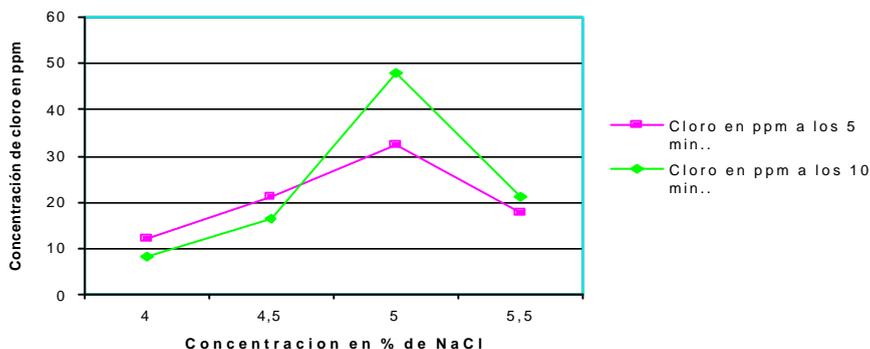


Figura 2. Concentración del cloro residual después de electrólisis a diferentes concentraciones de NaCl

Una vez determinado el tiempo de electrólisis y la concentración de NaCl se evaluó la estabilidad del pH y del cloro residual del agua EO cada 24 horas hasta 96 horas. Para esto se realizó una nueva electrólisis partiendo de la solución de NaCl al 5% en la cual se obtuvo una concentración de cloro residual de 47.33 ppm a un pH de 2.31. El pH descendió en cada medición pero la diferencia entre cada una no fue significativa, permaneciendo en la misma escala con un valor promedio de 2.3. A diferencia del pH, las mediciones de cloro fueron inestables pues los niveles de cloro descendieron drásticamente a partir de las 24 horas de almacenamiento y adicionalmente los valores fueron muy variables, por esta razón, las mediciones se detuvieron a las 48 horas de almacenamiento, tiempo en el que la concentración de cloro residual fue de 5.48 ppm.

Estos resultados fueron los esperados debido a que en soluciones neutras o ácidas el ácido hipocloroso se descompone y forma ácidos clórico y clorhídrico, en soluciones fuertemente ácidas se desprende Cl<sub>2</sub> o Cl<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> lo que depende de la disponibilidad de iones cloro (Kirk *et al.* en 1962). Adicionalmente, Rojas y Guevara en 2003 determinaron que la ionización del ácido hipocloroso tiene una constante de equilibrio que depende del valor de pH de la solución, esta afirmación confirma los resultados obtenidos por Len *et al.* en 2002 concluyeron que ajustando el pH del agua EO de 2.5 a 4.0 usando ácido acético, la estabilidad del cloro es nueve veces mayor. Según lo anterior, se infiere que hubo desprendimiento de la molécula de ácido hipocloroso liberándose Cl<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> debido a que el pH se encontraba alrededor de 2.3. El agua EO utilizada en

los estudios posteriores tuvo un valor promedio de cloro residual de 29 ppm y un valor de pH de 2.83.

### Efecto bactericida del agua EO sobre el cultivo de *L. monocytogenes*

Como se muestra en la figura 3, la población bacteriana se reduce en su mayoría, hasta niveles indetectables por siembra en dilución  $10^{-2}$  después de 5 minutos de tratamiento con agua EO; mientras que en los tratamientos control las unidades logarítmicas (UL) permanecen constantes. La mayor reducción de UL se presentó en la cepa 227, la cual descendió hasta niveles indetectables en dilución  $10^{-1}$ , en tanto que la menor reducción se observó con la

cepa 244, en la cual a los 5 minutos de exposición la población bacteriana disminuye en 5.0 UL y solamente hasta los 10 minutos de exposición no se observa crecimiento en la dilución  $10^{-2}$ . La reducción de la población en promedio fue de 6.66 UL. Tomando como base lo anterior se infiere que la cepa más sensible al efecto del agua EO es la 227 y la más resistente es la 244. Resultados que posteriormente se confirmaron con la prueba de CMI en discos.

En la figura 3 se observa que entre los 5 y los 20 minutos de exposición al agua EO no hay cambios en la población de *L. monocytogenes*. El recuento del microorganismo en la dilución  $10^{-1}$  fue incongruente, por lo que se tuvieron en cuenta los valores obtenidos a partir de la dilución  $10^{-2}$ .

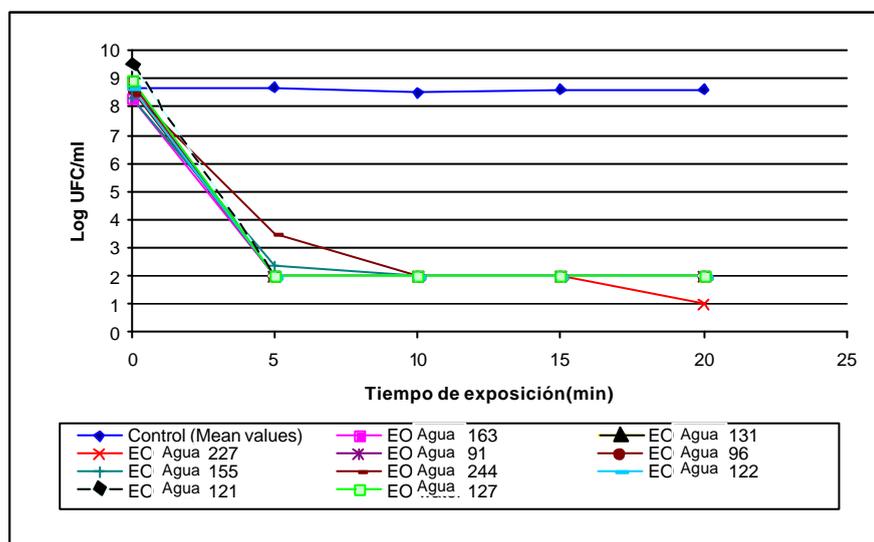


Figura 3. Efecto del agua EO en la inactivación de *L. monocytogenes* en suspensión

El agua EO tuvo un alto poder bactericida pues en promedio a los 5 minutos de tratamiento, se redujeron las poblaciones bacterianas en 6.6 UL y según Delgado *et al.* en 2003, una solución desinfectante debe reducir como mínimo en 3.0 UL la población de microorganismos a tratar. En 1999 Venkitanarayanan *et al.* evaluaron el efecto del agua EO para inactivar *L. monocytogenes* y determinaron que a los 5 minutos de exposición al agua EO (48.5 ppm de cloro residual, pH 2.63), la población se reducía en 6.64 UL. Resultados que soportan los obtenidos en este estudio al utilizar agua EO con 28.72 ppm de cloro residual y pH 2.83.

A partir de los resultados obtenidos en esta fase se determinó que el tiempo de tratamiento para evaluar el efecto del agua EO en *L. monocytogenes* inoculada en lechuga debía ser 5 minutos. Asimismo, se seleccionaron las cinco cepas más resistentes al cloro mediante una prueba de CMI en discos, con las cuales se realizó el inóculo mixto de *L. monocytogenes* para inocular las lechugas. Las cepas más resistentes según la prueba de CMI en discos fueron: 155, 244, 91, 131 y 163.

### Efecto bactericida del agua EO sobre *L. monocytogenes* inoculada en hojas de lechuga

El inóculo mixto de *L. monocytogenes* tenía una concentración promedio de 9.56 UL. En la figura 4 se observa que la reducción promedio de *L. monocytogenes* inoculada en lechuga fue de 3.92 UL. En la muestra 31 se produjo la mayor reducción con 5.82 UL y en la muestra 2 se presentó la menor reducción con un valor de 2.48 UL (Figura 5). Estos

resultados señalan que el efecto del agua EO sobre la suspensión de *L. monocytogenes* es mucho mayor que el efecto bactericida sobre el microorganismo inoculado en lechuga ya que al hacer contacto con la materia orgánica presente en la lechuga, el ácido hipocloroso reacciona con este tipo de sustancias perdiendo su poder desinfectante (Snoeyink y Jenkins, 2002), sin embargo, se presentó una reducción en la población de *L. monocytogenes* estadísticamente significativo luego de 5 minutos de inmersión de las hojas de lechuga en agua EO ( $p = 0.00001$ ).

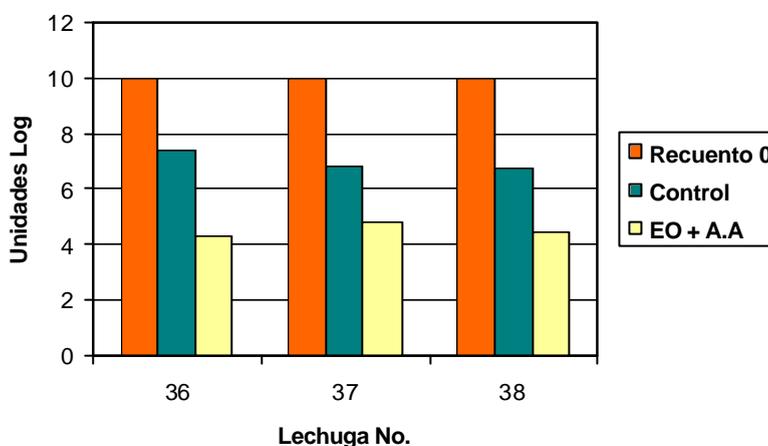


Figura 4. Efecto combinado del Agua EO y el ácido acético al 6% sobre *L. monocytogenes* inoculada en lechuga

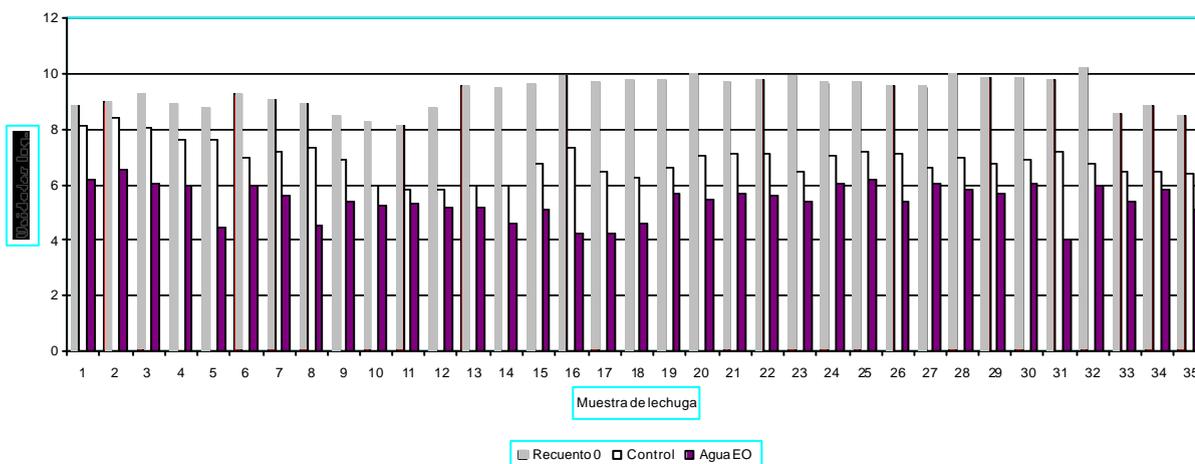


Figura 5. Efecto del agua EO sobre la población de *L. monocytogenes* inoculada en lechuga

Nuestros resultados son similares con los obtenidos por Oomori *et al.* en 2000, donde se demostró que la presencia de aminoácidos o proteínas llevaba a la transformación del cloro disponible del agua EO en compuestos N-clorados. Se observó también una remoción del cloro disponible por las reacciones de óxido reducción con algunas vitaminas, lípidos y minerales. Igualmente, ellos determinaron que el efecto bactericida del cloro combinado sobre *E. coli* es mucho menor que el efecto del cloro libre. Estos autores sugieren que para el uso práctico del agua EO en la industria de alimentos, se incremente la concentración del cloro disponible total presente en el agua para contrarrestar el efecto de la materia orgánica. Por otro lado, los resultados obtenidos, en el tratamiento de las lechugas, sugieren que se debe aumentar el tiempo de acción del agua EO para obtener una mayor reducción en la población bacteriana.

Los resultados del presente estudio muestran la necesidad de incrementar la concentración de cloro disponible total del agua EO producida en la celda electrolítica para la inactivación de *L. monocytogenes*, porque se obtuvieron niveles de reducción menores a los obtenidos por Park *et al.* en 2001 quien después de 3 minutos de tratamiento con agua EO (45 ppm de cloro residual, pH 2.5) la población de *Listeria monocytogenes* en lechuga, se redujo en 5.5 UL, en este estudio se utilizó una concentración de cloro residual 16 ppm mayor. En los estudios de Bari *et al.* en 2003 se evaluó el tratamiento de agua clorinada con 200 ppm y de agua EO (30.3 ppm de cloro residual pH 2.6) en tomates inoculados con *L. monocytogenes*, en los cuales hubo una reducción en la población de 4.76 y 7.54 UL por tomate respectivamente. Sin embargo, Beuchat y Brackett en 1990 comprobaron la baja actividad de una solución de cloro preparada con 200-250 ppm de cloro libre, para inactivar *L. monocytogenes* presente en lechuga, con lo cual sólo se logró reducir la población en 1.36 UL; estos resultados son menores a los obtenidos con agua EO, lo cual indica que esta tiene mayor actividad bactericida que una solución de cloro convencional, gracias a sus propiedades, debido a que no sólo posee una alta concentración de cloro libre, sino también, valores de pH ácidos y un alto potencial de oxido- reducción (Kim *et al.* 2000; Koseki *et al.* 2002).

En el tratamiento control con agua destilada se observó una reducción de la población de 2.46 UL; esta disminución pudo deberse al proceso de lavado

del alimento, en el cual muchos de los microorganismos fueron removidos de la lechuga por el agua; otra causa pudo ser el estrés osmótico debido a que el agua destilada es hipotónica, es decir, tiene una baja concentración de solutos produciendo lisis celular cuando los microorganismos son expuestos al agua (Madigan *et al.* 2001), y adicionalmente, el bajo pH del agua destilada el cual oscilaba entre 5 y 6, favoreció este descenso en la población.

### Efecto combinado del agua EO y ácido acético al 0.6% (vinagre) sobre *L. monocytogenes* inoculada en lechuga

Tomando como base los resultados del agua EO sobre *L. monocytogenes* inoculada en lechuga se evaluó el efecto combinado del agua EO con ácido acético al 0.6% (vinagre), y se pudo establecer que hay una mayor reducción en el número de unidades logarítmicas cuando la lechuga es tratada con ácido acético posterior al tratamiento con agua EO. En la figura 4 se muestra que la población de *L. monocytogenes* disminuyó hasta 5.74, 5.14 y 5.6 UL para las lechugas 36, 37 y 38 respectivamente; el promedio de reducción de 5.49 UL. Estos resultados indican que el agua EO puede ser empleada como desinfectante pero se sugiere un tratamiento combinado con otro desinfectante como el ácido acético al 6%, que potencialice la acción bactericida, debido a que otros antimicrobianos como la nisina y aceites esenciales (carvacrol o timol) han mostrado un efecto sinergista en la inactivación de *Listeria monocytogenes* (Delgado *et al.* 2003).

### Prueba de CMI

Se evidenció crecimiento por turbidez a partir de 875 ppm de NaClO con la cepa 163, de 439.5 ppm con la cepa 121, de 218.75 ppm con las cepas 91 y 244, y finalmente en 109.37 ppm con la cepa 155. La cepa 227 no creció en ninguna concentración de NaClO, lo cual confirma su sensibilidad al mismo.

Las cepas seleccionadas para la inoculación de lechuga, pueden presentar una resistencia adquirida a este desinfectante, ya que al ser aisladas a partir de pollo procesado fueron sometidas a concentraciones elevadas de cloro durante los procesos de prechiller y chiller, lo que indica que probablemente han estado expuestas a

concentraciones subletales del desinfectante. La resistencia puede deberse a la acción de una bomba de flujo o a modificaciones en la pared celular (Mc Donnell y Russell, 1999). Según los resultados de la prueba de CMI, es probable que las cepas utilizadas en este estudio presentaran una resistencia adquirida al cloro, debido a su procedencia.

Es posible concluir que en la solución de NaCl al 5% obtuvo la mayor cantidad de cloro residual (29 ppm aprox.) a un pH de 2.83 en promedio durante 10 minutos de electrólisis. La población de *L. monocytogenes* en suspensión se reduce en 6.6 UL después de 5 minutos de exposición al agua

electrolizada (EO), sin embargo, es probable que en menos tiempo se puede obtener reducción. También hubo una mayor reducción en el número de unidades logarítmicas (5.49 UL) cuando la lechuga fue tratada con ácido acético al 0.6%, posterior al tratamiento con agua EO, lo cual indica que el tratamiento combinado con otro agente microbicida potencializa la acción del agua EO.

Finalmente, el trabajo logró concluir que el EO es un método eficaz y fácil de aplicar para erradicar *L. monocytogenes* de lechuga y podría ser útil en otros tipos de alimentos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Bari ML, Sabina Y, Isobe S, Uemura T, Isshiki K. Effectiveness of electrolyzed acidic water in killing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* on the surface of tomatoes. *J Food Protection*. 2003; 66 (4): 542-548.
2. Beuchat L, Bracket R. Survival and Growth of *Listeria monocytogenes* on Lettuce as influenced by shredding, chlorine treatment, modified atmosphere, packaging and temperature. *J Food Science* 1990; 55(3): 755-758.
3. Cháves GA, Medina I. Diseño de un clorinador eléctrico para la producción de agua electrolizada oxidadora para la eliminación de microorganismos en lechuga (*Lactuca sativa*). *Universitas Scientiarum* 2003; 9: 91-100.
4. Correa C, Fonseca Y. Prevalencia de *Listeria monocytogenes* en expendios de pollo del sur-occidente de Bogotá. Trabajo de grado, Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Bogotá - Colombia; 2004.
5. Cruz SP, Kim JH. Incidencia de *Listeria monocytogenes* en aguas de riego para hortalizas (lechugas y repollos) en el municipio de Mosquera. Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá- Colombia. 1999; 50-60
6. Delgado B, Fernández P, Palop A, Periago P. Effect of tyamol and cymene on *Bacillus cereus* vegetative cells evaluated through the use of frequency distributions. *Food Microbiology*. 2004. En Prensa.
7. Electroquímica, S.L. ©. 1996-2002. I.D Microorganismos de los Alimentos: Características de los patógenos microbianos. ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Union of Biological Societies). Editorial Acribia S.A., Zaragoza España 1996: 165-175. (fecha de acceso 1 de marzo de 2004). URL disponible en: [http://www.idegis.org/info\\_profesionales\\_2.html](http://www.idegis.org/info_profesionales_2.html).
8. Izumi H, Kiba T, Hashimoto. Efficacy of electrolyzed water as a disinfectant for fresh-cut spinach. *Quality assurance in agricultural produce*, ACIAR Proceedings 2000; 100: 216-221
9. Kirk R, Othmer DF, Scott JD, Standen A. Enciclopedia de Tecnología Química. Tomo IV. Unión Tipográfica Editorial Hispanoamericana, México 1962:744-56.
10. Koseki S, Itoh K. Prediction of microbial growth in fresh-cut vegetables treated with acidic electrolyzed water during storage under various temperature conditions. *J Food Protection*. 2001; 64(12): 1935-1942.

11. Koseki S, Fujiwara K, Itoh K. Decontaminative effect of frozen acidic electrolyzed water on lettuce. *J Food Protection* 2002; 65(2): 411-414.
12. Koseki S, Yoshida K, Kamitani Y, Itoh K. Influence of inoculation method, spot inoculation Site, and inoculation size on the efficacy of acidic electrolyzed water against pathogens on lettuce. *J Food Protection*. 2003; 66(11): 2010-2016.
13. Len, SV, Hung YC, Chung D, Anderson JL, Erickson MC, Morita K. Effects of storage conditions and pH on chlorine loss in electrolyzed oxidizing (EO) water. *J Agri Food Chem* 2002; 50:209-212
14. Lúnden J. Persistent *Listeria monocytogenes* contamination in food processing plants. Universidad de Helsinki. Facultad de Medicina Veterinaria. Departamento de Higiene Ambiental y de Alimentos, Finlandia 2004: 6-23.
15. Madigan MT, Martinko J, Parker J. *Biología de los Microorganismos*. Octava Edición. Ed. Prentice may, Madrid (España) 2001: 556.
16. Massis J T. Sistemas de cloración alternativos. Aguamarket (en línea) 2003 (fecha de acceso 1 Marzo. 2004). URL disponible en: [http://www.idegis.org/Info\\_profesionales\\_2.htm](http://www.idegis.org/Info_profesionales_2.htm).
17. Mc Donell G, Russell D. Antiseptics and disinfectants: Activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rew* 1999; 12(1): 147-179
18. Oomori T, Oka T, Inuta T, Arata Y. 2000. The efficiency of disinfection of acidic electrolyzed water in the presence of organic materials. *Analytical Sciences* 2000; 16: 365-369.
19. Österblad M, Pensala O, Peterzens M, Helenius H, Huovinen P. Antimicrobial susceptibility of *Enterobacteriaceae* isolated from vegetables. *J Antimicrobial Chem* 1999; 43: 503-509.
20. Park CM, Hung Y-C, Doyle MP, Ezeike GOI, Kim C. Pathogen reduction and quality of lettuce treated with electrolyzed oxidizing water and acidified chlorinated water. *J Food Science*. 2001; 66(9): 1368-1372.
21. Rojas R, Guevara S. Estabilidad del hipoclorito de sodio generado por electrólisis. Hoja de divulgación técnica. Unión de Apoyo Técnico al Saneamiento Básico Rural. Perú 1998: 1-6
22. Sarquis M, Vergara L. Identificación de *Listeria monocytogenes* en hortalizas crudas y procesadas. Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá- Colombia. 1997: 43-45
23. Snoeyink V, Jenkins D. *Química del Agua*. Editorial Limusa S.A de C.V, México 2002: 425-443
24. Venkitanarayanan KS, Ezeike GO, Hung YC, Doyle M. Efficacy of electrolyzed oxidizing water for inactivating *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, and *Listeria monocytogenes*. *Appl Env Microbiology* 1999; 65(9): 4276-4279.
25. Venkitanarayanan KS, Ezeike GO, Hung YC, Doyle M. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on plastic kitchen cutting boards by electrolyzed oxidizing water. *J Food Protection* 1999a; 62(8): 857-860.

Recibido: Agosto 20 de 2004; Aceptado: Noviembre 30 de 2004