

Reducción 5-log De *Listeria monocytogenes* en alimentos ácidos.

Espinoza Mata A.^a, Sánchez Velázquez F. J.^a, Núñez González, M. A.^b, Delgado Garduño J.A.^a

a Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología e Inmunología

b Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Alimentos

* jorgea.delgadog96@gmail.com

RESUMEN

Listeria monocytogenes es un patógeno que produce listeriosis cuando se consume en alimentos por personas vulnerables como estado de gravidez, adultos inmunocomprometidos, con trasplantes, enfermos con HIV y adultos mayores. Es una bacteria cosmopolita y oportunista que puede ser tolerante a la acidez, característica que algunos productos presentan y que les confiere estabilidad. La bacteria requiere un pH óptimo de 7 para su crecimiento; sin embargo, se ha reportado que puede sobrevivir a pH hasta de 3.3 en alimentos ácidos como salsas de escabeche, vegetales acidificados, etc., por lo que para verificar su inocuidad se realizó un reto microbiológico utilizando salsas de tipo guacamole, roja y verde de tres marcas inoculadas con *L. monocytogenes* (con pH 3.45 a 4.08) a temperatura ambiente (25 °C) con el fin de medir la sobrevivencia del patógeno hasta su reducción 5-log durante 7 días consecutivos (T1-T7). Se obtuvo que *L. monocytogenes* se redujo desde el tiempo 1 (T1) en los 3 tipos de salsas de la marca 1 y la marca 3 y en la salsa guacamole de la marca 2; sin embargo, se redujo a partir del T4 en la salsa roja y a partir del T2 de la salsa verde de la marca 2. Estos resultados pueden ser utilizados en relación a marcos regulatorios internacionales en las industrias que deseen exportar estos productos..

5-log Reduction of *Listeria monocytogenes* in acid foods.

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is a pathogen that produces listeriosis when is ingested in food by vulnerable people like pregnant women, immunocompromised adults, people with transplants, patients with HIV and elderly people. *L. monocytogenes* is a cosmopolitan and opportunistic bacterium that can be tolerant to acidity, characteristic that some acid products present because it is its formulation and indirectly confers it stability. The bacterium requires an optimum pH 7 to grow; however, it's been reported that it can survive at low pH values such as 3.3 in acid food like pickle sauce, acidified vegetables, etc. so to verify its safety a microbiological challenge was made using guacamole, red and green sauce from three different brands, which were inoculated with *L. monocytogenes* (pH values in a range from 3.45 to 4.08) at room temperature (25 °C) in order to measure the survival of the pathogen 'till its 5-log reduction during 7 consecutive days (T1-T7). It was obtained that *L. monocytogenes* decreased at time 1 (T1) in the three types of sauce from brand 1 and brand 3, and guacamole sauce from brand 2; however, it decreased at T4 in red sauce and T2 at green sauce from brand 2. This results can be used related to international regulatory frameworks in industries for exporting these products..

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*, salsa, acidez, reducción 5-log, pH, sobrevivencia.

Key words: *Listeria monocytogenes*, sauce, acidity, 5-log reduction, pH, survival.

Área: Microbiología y Biotecnología

INTRODUCCIÓN

Listeria monocytogenes es una bacteria pequeña bacilar, Gram-positiva con terminaciones redondeadas. Las células se agrupan en cadenas pequeñas, en forma de V o Y. Las colonias desarrolladas en agar nutritivo son de 0.2 – 0.8 mm de diámetro, puntiformes, grises y translucidas después de 24 h de incubación a 37 °C; examinadas con un microscopio y con luz oblicua se observan con una iridiscencia de color azul verdoso. Los límites de temperatura de crecimiento van de 1 - 45 °C aunque se han reportado temperaturas de -0.1 a 0.4 °C y tiempos de generación de 30 – 40 h a temperaturas de refrigeración. El pH de crecimiento va de 4.4. – 9.6 y óptimamente a pH 7. *L. monocytogenes* es comúnmente encontrada en material vegetal particularmente en decadencia siendo su hábitat natural. Puede sobrevivir a condiciones ambientales adversas a pesar de no ser una bacteria formadora de esporas. Esta resistencia en conjunto con su capacidad para colonizar, multiplicar y persistir en equipos de procesamiento hace que *Listeria monocytogenes* se convierta en una amenaza para la industria de alimentos (Campbell-Platt, 2017).

A partir del brote ocurrido en California, en el año de 1985 en donde se involucró un tipo de queso en un brote de listeriosis, mucha información ha sido generada sobre la incidencia y comportamiento de *L. monocytogenes* en alimentos. Así, productos lácteos, carnes, pescados, mariscos y vegetales han sido involucrados en brotes debidos a la presencia de este patógeno. Por otra parte, su presencia en alimentos procesados ha sido detectada a pesar de los esfuerzos realizados por los industriales para contrarrestar su presencia con diversos métodos en donde la acidez, la a_w , aplicación de calor, etc. se pueden mencionar. Experimentalmente se conoce de la capacidad de esta bacteria para desarrollar en medios de cultivo con pH bajo, pero también se sabe de su presencia en alimentos a base de vegetales con pH menor de 5.6 por lo que se habla de una gran capacidad de este microorganismo para ser tolerante a la acidez. Esta adaptación ácida puede asegurar su sobrevivencia cuando se expone a condiciones ácidas letales. Y brindar protección cruzada contra una variedad de factores que la puedan dañar como las dosis letales de peróxido de hidrógeno, calor, sales, etc. (Ryser y Marth, 1999).

Brotos de patógenos con resistencia a la acidez y transmitidos por alimentos ácidos con valores de pH menores a 4 incluyen sidra de manzana y jugo de naranja han ocasionado preocupación acerca de la seguridad de productos vegetales acidificados, por lo que en este tipo de productos con valores de pH entre 3.3 y 4.6, los tratamientos térmicos son requeridos para lograr la reducción 5-log de este patógeno incluyendo otros (Breidt, *et al.* 2007).

Han y Linton en 2004 estudiaron la sobrevivencia y crecimiento *L. monocytogenes*, en jugo de fresa estéril (pH 3.6) y caldo soya tripticasa acidificado (CST) (pH 3.4 a 6.8) a diferentes temperaturas para lo cual inocularon 7.3 log UFC/mL de *L. monocytogenes*, incubaron durante 3 días a temperaturas de 4 y 37 °C y determinaron los niveles bacterianos después de 2 h, 1 día y 3 días en medio Oxford modificado para *L. monocytogenes* y un espectrofotómetro a 660 nm para observar la inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* en CST y medio jugo de fresa (pH 3.4 a 7.3). El patógeno fue dañado a un pH igual o menor que 4.7 durante las primeras 2 h del almacenamiento a 4 °C y su inactivación se presentó gradualmente conforme el tiempo de almacenamiento aumentaba, pero sobrevivió a un pH de 6.8 a esa temperatura. El crecimiento a 37 °C se inhibió cuando se utilizó el CST por 1 % de ácido cítrico y 0.5 % de ácido málico a un pH 3.4 o por 50 % de jugo de fresa a un pH 4.7. Concluyeron que la inactivación ocurrió debido a los ácidos en el jugo de fresa, siendo un factor importante junto con el pH, la temperatura y tiempo para la inhibición del crecimiento de este microorganismo.

Sin embargo, cuando los procesos no son llevados a cabo adecuadamente y considerando la resistencia de *Listeria monocytogenes* a la acidez, es posible que se suscite la enfermedad cuando son consumidos por personas vulnerables dentro de las cuales se incluyen mujeres embarazadas, neonatos, adultos inmunocomprometidos, individuos con trasplantes, enfermos con HIV y adultos mayores. Por ello, la seguridad e inocuidad de los productos ácidos es de gran importancia para garantizar, en caso de presencia de algún patógeno, que la misma naturaleza ácida del producto pueda destruir al microorganismo antes de que éste sea consumido y de esta forma cumplir un marco regulatorio internacional en las industrias que desean exportar y que deben de comprobar el destino que tendrá *Listeria monocytogenes* en los alimentos ácidos al determinar su sobrevivencia durante la vida media del producto.

MATERIAL Y MÉTODO

Material biológico

Las cepas de *Listeria monocytogenes* utilizadas fueron obtenidas de American Type Culture Collection (ATCC) y correspondieron a *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Listeria monocytogenes* ATCC BAA-751 y *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

Activación y preparación de las cepas de *Listeria monocytogenes*

Se activaron las cepas conservadas en congelación a -20 °C, mediante su inoculación en tubos de 13X100 que contienen 5 mL de caldo nutritivo suplementado con glucosa al 1%, éstos se incubaron a 37 °C/ 24 h para posteriormente realizar una siembra en placa, de cada cepa, en medio de cultivo Oxford. Las placas se incubaron a 37 °C/ 24 – 48 h para obtener un crecimiento abundante de las bacterias utilizadas.

Ajuste del inóculo

A partir del crecimiento de *Listeria monocytogenes* en las placas de medio de cultivo Oxford, se inocularon tubos de caldo nutritivo para ajustar cada cepa a una concentración de 10^6 células/mL, esto se realizó por medición de la absorbancia de la suspensión bacteriana, a una longitud de onda de 600 nm en un espectrofotómetro Unico 1100®. Después del ajuste se realizó una cuenta en placa en el mismo medio de cultivo selectivo para asegurar que se obtuvo la cantidad deseada por mL de caldo nutritivo.

Preparación de las muestras

Se estudiaron 3 tipos de salsas de 3 determinada marca, seleccionadas de tiendas de autoservicio, de preferencia del mismo lote de producción y con la misma fecha de caducidad. Los frascos de cada muestra se desinfectaron externamente con etanol al 70% para abrirlos en la campana de flujo laminar Telstar BioII Advance® y colocar porciones de 20 g en tubos Falcon de 50 mL de capacidad.

De cada muestra se prepararon 36 tubos mismos que sirvieron para realizar las cuantificaciones de *Listeria monocytogenes* por triplicado durante 7 días consecutivos hasta que no hubo presencia de colonias típicas del microorganismo en el medio de cultivo.

Inoculación en el producto

Se agregaron alícuotas de 20 gramos del producto asepticamente a tubos Falcón de 50 mL y se separaron en 4 grupos de muestra, incluido la muestra control. Cada uno de los tubos fue inoculado con 10^6 células de cada cepa. Después de esto se homogenizaron utilizando un Vortex Baxter S8225®, para asegurar que las células estén distribuidas en toda la muestra.

Incubación del producto

Las muestras inoculadas en los tubos Falcon se incubaron a temperatura ambiente (25 °C) junto con la muestra control.

Cuantificación de *Listeria monocytogenes* en muestras inoculadas

Las muestras inoculadas se analizaron por duplicado mediante una cuenta en placa cada 24 h; se pesaron 11 g de muestra para hacer una primera dilución con 99 mL de solución diluyente de buffer de fosfatos pH 7.2 estéril. De esta primera dilución se realizaron 5 diluciones más y de cada una se inoculó 1 mL en cajas de Petri y se agregó medio de cultivo Oxford suplementado con antimicrobiano Oxford para sembrar por el método por difusión. Se incubaron a 37° C / 24-48 h y posteriormente se realizó el conteo de las colonias típicas del patógeno en dicho medio, mismas que fueron comprobadas por la morfología colonial, β -hemólisis y actividad bioquímica en medios de cultivo como caldo ramnosa, caldo xilosa y prueba de CAMP. Las cuentas se realizaron cada 24 h durante el tiempo establecido en el proyecto o que no haya desarrollo de dichas colonias en el medio de cultivo Oxford.

Cuantificación de microorganismos indicadores y *Listeria monocytogenes* en las muestras control

Las muestras no inoculadas o control, se analizaron por duplicado mediante una cuenta en placa cada 24 h para determinar bacterias mesofílicas aerobias, hongos y levaduras, bacterias ácido lácticas y *Listeria monocytogenes*; se pesaron 11 g de muestra para hacer una primera dilución con 99 mL de solución diluyente de buffer de fosfatos pH 7.2 estéril y se realizaron 4 diluciones seriadas más y de cada una se inoculó 1 mL en cajas de Petri previamente etiquetadas con la dilución correspondiente y se agregó medio apropiado para dicha grupo microbiano: agar para cuenta en placa, agar papa y dextrosa suplementado con ácido tartárico al 10%, agar MRS lactobacilli y medio de cultivo Oxford suplementado con antimicrobiano Oxford respectivamente para sembrar por el método por difusión. Se homogeneizaron mediante movimientos circulares de forma suave en una superficie plana, y ya solidificado el medio de cultivo, se incubaron a 37° C / 24-48 h para la cuantificación de bacterias mesofílicas aerobias y *Listeria monocytogenes*; en condiciones de microaerofilia a 37° C / 48-72 para la cuantificación de bacterias ácido lácticas y durante 3-5 días a temperatura ambiente para hongos y levaduras, posteriormente se realizó el conteo de las colonias desarrolladas en los medios de cultivo utilizados para los diferentes grupos y en el caso del patógeno se realizó el conteo de las colonias típicas, mismas que fueron comprobadas mediante observación microscópica mediante la tinción de Gram para comprobar su morfología, β -hemólisis y actividad bioquímica en medios de

cultivo como caldo ramnosa, caldo xilosa y prueba de CAMP. Las cuentas se realizaron cada 24 h durante el tiempo establecido en el proyecto con el fin de establecer la estabilidad del producto sometido a temperatura ambiente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tres marcas de salsa con tres diferentes productos fueron analizadas para detectar la reducción de 5-log de *Listeria monocytogenes* obteniendo que el patógeno se redujo en 5-log en el T1 en todos los tres tipos de salsas de la marca 1 obteniendo <10 UFC/g (Fig. 1).

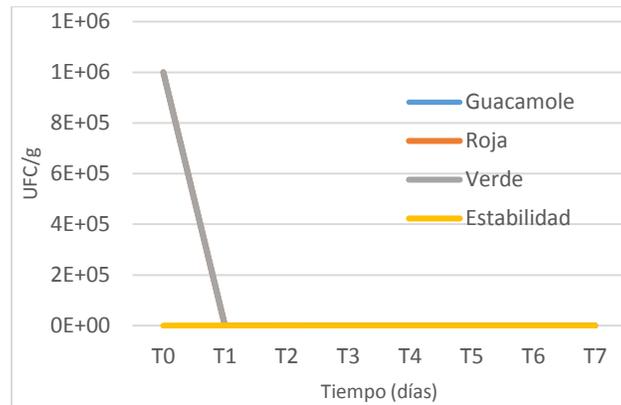


Figura1. Sobrevivencia y estabilidad de *L. monocytogenes* en salsa guacamole, roja y verde de la marca 1.

En cuanto a la marca 2, *L. monocytogenes* sobrevivió en la salsa roja en el T1 obteniendo 100 UFC/g de salsa, en el T2 obteniendo 510 UFC/g de salsa y en el T3 obteniendo 40 UFC/g de salsa reduciéndose en 5-log hasta el T4 donde se obtuvo <10 UFC/g de salsa. El patógeno también sobrevivió en la salsa verde de la misma marca en el T1 obteniendo 60 UFC/g de salsa reduciéndose en 5-log hasta el T2 donde se obtuvo <10 UFC/g de salsa (Fig. 2).

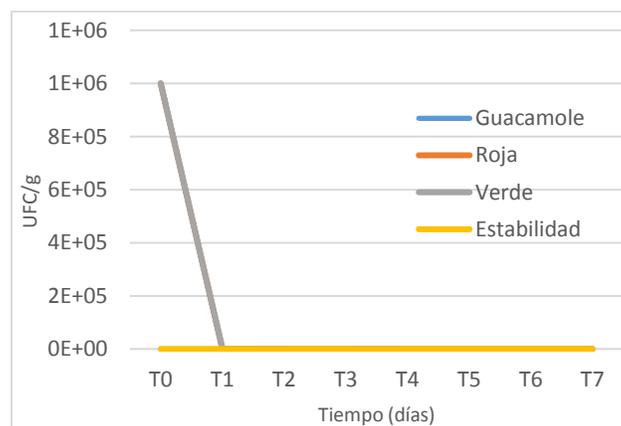


Figura 2. Sobrevivencia y estabilidad de *L. monocytogenes* en salsa guacamole, roja y verde de la marca 2.

Referente a la marca 3, *L. monocytogenes* se redujo en 5-log en el T1 en todos los tres tipos de salsas obteniendo <10 UFC/g (Fig. 3).

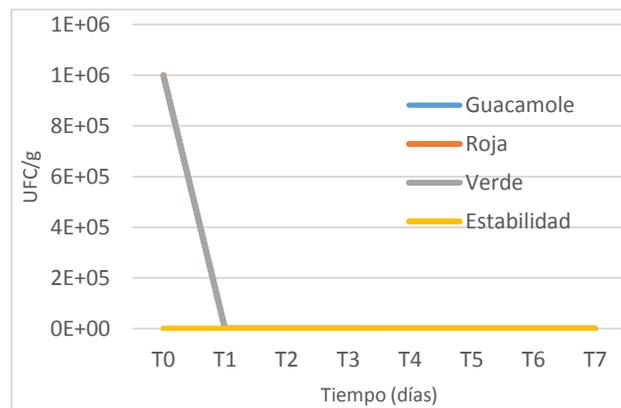


Figura 3. Sobrevivencia y estabilidad de *L. monocytogenes* en salsa guacamole, roja y verde de la marca 3.

En cuanto a la estabilidad, se realizó una cuenta en placa de mesófilos aerobios, hongos y levaduras, bacterias ácido-lácticas y *Listeria monocytogenes* en APCP, PDA, MRS Lactobacillus y MOX respectivamente. Desde el T1 de la cuenta de estabilidad se obtuvo un crecimiento de <10 UFC/g de salsa en las 4 pruebas (Fig.s 1, 2 y 3).

Listeria monocytogenes es uno de los microorganismos con mayor incidencia en alimentos con pH bajo, por lo mismo se han realizado estudios para evaluar su sobrevivencia utilizando otros factores además del pH como el A_w y la salinidad. En estos estudios, *L. monocytogenes* ha sobrevivido a la presencia de conservadores como benzoato de sodio y sorbato de potasio hasta dos semanas después de haber sido inoculada (Kimber y Ferstl, 2012). Las muestras de la marca 1 presentaban estos conservadores lo cual probablemente influyó en la reducción del patógeno ya que el patógeno no se recuperó a partir del T1.

La reducción de *L. monocytogenes* considerando el pH de las muestras también se llevó a cabo a partir del T1 para las marcas 1 y 3 en los tres tipos de salsas y en la salsa guacamole de la marca 2; todas presentaron un rango de pH de 3.45 a 3.67 ligera diferencia comparando los resultados emitidos por Breidt *et al.* 2007 quien reporta reducciones del patógeno a valores de pH alrededor de 3. Además, se ha demostrado que, con una adaptación subletal al ácido, *L. monocytogenes* puede ser tolerante a pH bajo de hasta 3 (Davis *et al.* en 1996; Koutsoumanis *et al.*, 2003). En nuestro estudio, el patógeno, logró tolerar la acidez de la salsa roja y verde de la marca 2, después de haber sido inoculada. A pesar de esto, no logró sobrevivir por mucho tiempo ya que se redujo después de 4 días en la salsa roja y 1 día en la salsa verde, de dicha marca.

CONCLUSIÓN

El efecto del pH ácido en los alimentos estudiados logró reducir a *L. monocytogenes* en 5-log en un tiempo de 24 h. Si se realizara una contaminación postproceso por este patógeno en alimentos de este tipo, el pH garantizará su inocuidad. El estudio de estabilidad de los productos analizados indica que pueden llegar a tener una extensa vida útil.

BIBLIOGRAFÍA

- Breidt, F., Hayes, J. y McFeeters, R. F. (2007). Determination of 5-Log reduction times for food pathogens in acidified cucumbers during storage at 10 and 25°C. *Journal of Food Protection*, Vol. 70, No. 11, 2007, pp 2638–2641
- Campbell-Platt, G. (2017). *Food science and technology*. Wiley Blackwell. 2a Ed.
- Davis, M. J., Coote, P. J. y O'Byrne C. P. (1996). Acid tolerance in *Listeria monocytogenes*: the adaptive acid tolerance response (ATR) and growth-phase-dependent acid resistance. *Physiology and growth, Microbiology* 142: 2975-2982.

Han, Y. y Linton, H. (2004). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in strawberry juice and acidified media at different pH values and temperatures. *Journal of Food Protection*, Vol. 67, No. 11, pp. 2443–2449.

Kimber, M. y Ferstl, C. (2012). Fate of *Salmonella* Spp., *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* in escabeche and ahogada sauces.

Koutsoumanis K. P., Kendall P. A. y Sofos J. N. (2003). Effect of food processing-related stresses on acid tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 69 no. 12. pp. 7514-7516

Ryser, E. T. y Marth, E. H. (1999). *Listeria*, listeriosis and food safety. 2a ed. New York NY.