

“SOBREVIVENCIA *LISTERIA MONOCYTOGENES* DURANTE EL SECADO EN HOJA DE ESPINACA”

Villagómez Aranda A. L. ⁽¹⁾;

Hernández Iturriaga M. ⁽²⁾; Ezequiel Hernández J. J. ⁽²⁾; Delgadillo Delgado A. I. ⁽³⁾

⁽¹⁾Escuela de Bachilleres, “Salvador Allende” Plantel Sur, Universidad Autónoma de Querétaro.

⁽²⁾Laboratorio de Inocuidad Microbiana de los Alimentos, Departamento de Investigación y Postgrado en Alimentos, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro.

⁽³⁾Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Coahuila.

RESUMEN

En el presente trabajo, se realizó un ensayo sobre el comportamiento de *L. monocytogenes* al inocular superficialmente en hoja de espinaca y exponerse a secado.

El proceso se realizó con un pool de 5 cepas de *L. Monocytogenes* resistentes a rifampicina, que se adiciono en partes iguales a dos vehículos, agua destilada y suero de caballo. Se inocularon cuadros de espinaca con 10 gotas de 10 µl de la suspensión microbiana y se expuso a la campana de flujo laminar en tiempo 0 y 45 min de secado.

Al cabo del tiempo correspondiente, se hicieron diluciones decimales. Se tomaron muestras de la espinaca, de las diluciones adecuadas, para contar la población de *L. monocytogenes* sobreviviente, colocándolas en cajas petri con agar soya tripticasa adicionada con rifampicina al 1%; para inhibir la flora natural de la espinaca. Las placas inoculadas fueron incubadas a 35° C, por 24 hrs. Después, se procedió a contar las unidades formadoras de colonias.

El control (espinaca s/inocular) no mostró desarrollo de microorganismos, indicando que fue efectivo el antibiótico. Para los tiempos de secado, la población de *L. monocytogenes* presente disminuyó, para el agua destilada en 11.04 %, y para suero de caballo 4.86 %. Esta diferencia, es por los nutrientes del suero, que pueden proteger al microorganismo contra la desecación. En el agua, al no contener sustancias protectoras, mueren.

INTRODUCCIÓN

El consumo de diversos vegetales en ensaladas, como la espinaca por ejemplo, esta rodeada de una gran incógnita en cuanto a su carga microbiana. Los procesos de desinfección empleados en la actualidad, no pueden asegurar el consumo de un producto libre de microorganismos patógenos al ser humano, como sería el caso de *L. monocytogenes*.

L. monocytogenes es transmitida con facilidad a los alimentos por contacto con superficies contaminadas. Puede sobrevivir y desarrollarse a temperaturas de refrigeración, en alimentos listos para el consumo, así como en el medio ambiente durante periodos prolongados ⁽¹⁾.

Para poder llevar a cabo la evaluación de desinfectantes en frutas y hortalizas, es necesario hacer ensayos para conocer las condiciones de inoculación y secado de los microorganismos sobre la superficie de los productos.

OBJETIVO

- ☞ Observar el comportamiento de *Listeria monocytogenes* al inocular en hoja de espinaca durante el secado.
- ☞ Comparar la diferencia entre dos vehículos utilizados para resuspender las células del inculo.

METODOLOGIA

Preparación de cepa. De cinco cepas de colección del tipo *L. monocytogenes* resistente a Rifampicina (V-7, 101 M, 101-14, LCDC 81-860, SCOTT A) se activaron en caldo soya tripticasa con 3 ml

e incubando a 35° C durante 24 hrs. Transcurrido el tiempo, se traspasaron a caldo soya tripticasa adicionado de rifampicina al 1%; se incubaron por 18 hrs.

Pool. De cada uno de los tubos con las diferentes cepas, se tomaron 2ml que fueron depositados en un tubo de centrifugado, consiguiendo un pool (mezcla) de cepas de 10ml; esto con el fin de que los resultados sean generales y no basados en una sola cepa.

Vehículos. El pool se centrifugó a 3 500 rpm durante 10min, para obtener el paquete celular. Posteriormente se decantó y agregó solución salina al 0.85 %; se homogenizó y centrifugó. Este proceso se repitió una vez más. El pool, se dividió en dos partes iguales, a una se agregó 5ml de agua destilada, y al otro suero de caballo (preparado con 6ml agua destilada y 200 µl suero).

Espinaca. De hojas de espinaca fresca, se cortaron 15 cuadros de 5 x 5 cm, utilizando guantes de látex, y tijeras previamente estériles en alcohol al 70 %. Se colocaron en charolas de aluminio, donde se dispusieron en c/u 3 cuadros, con el fin de hacer el trabajo por triplicado.

Inoculación y secado. En cada una de las hojas, fueron colocadas 10 gotas de 10 µl de la suspensión microbiana correspondiente. El blanco permaneció sin inocular. Los cuadros de espinaca inoculados se secaron en la campana de flujo laminar, a los 0 y 45 min, para agua y suero.

Cada uno de los cuadros fueron colocados en una bolsa de plástico con 50 ml de diluyente de peptona al 0.1%; se homogenizo en el Stomacher por 60 seg a velocidad media. Posteriormente de c/ u se hicieron diluciones decimales, hasta la séptima dilución.

Siembra. A partir de la primera dilución, se tomó 1 ml de inóculo, se colocó en una caja petri agregando agar soya tripticasa adicionada con rifampicina al 1%. Para los 0 min se sembró 5, 6 y 7 dilución; de 45 min, 3 – 7 dilución. Directamente del pool se sembró 6, 7 y 8 dilución. Las placas inoculadas se almacenaron en una incubadora a 35° C, donde permanecieron por 24 horas, para que el microorganismo se desarrolle.

Recuento. Después de las 24 horas se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) utilizando un cuenta colonias Québec.

RESULTADOS

Para conocer si la concentración de rifampicina empleada para inhibir la flora natural de la espinaca era la adecuada, se analizaron hojas de espinaca sin inocular con el patógeno. No hubo desarrollo de microorganismos en las placas de agar soya tripticasa adicionada con rifampicina al 1%. Esto indicó que el antibiótico fue capaz de inhibir a toda la flora y persistir en desarrollo de *L. monocytogenes*.

De las placas inoculadas directamente del pool utilizado, se obtuvieron los siguientes resultados, mostrados en la Tabla 1. Como se puede observar, a pesar de estar cercanas la cantidad de unidades formadoras de colonias, hay una diferencia de 0.09 Log entre ambos vehículos, siendo mayor la cantidad de microorganismos en el suero de caballo.

Tabla 1. Recuento de *L. monocytogenes* en el pool de cepas utilizada como inóculo.

POOL	Vehículo	Dilución	UFC	Logaritmo
	Agua destilada		6	547
		7	68	9.83
		8	12	10
Suero de caballo		6	715	9.85
		7	85	9.92
		8	9	9.95

Los resultados del conteo de colonias en las cajas sembradas, se muestran en la Tabla 2 para el agua destilada; y en la Tabla 3 para suero de caballo. Se indica a la derecha, la media de UFC con su logaritmo; después los logaritmos de cada una de las cajas, su media y la desviación estándar.

Como se puede observar en los datos marcados en negritas, en agua, de los 0 a 45 min de secado, bajo 0.81 Log; mientras que en suero bajo 0.36 Log del tiempo 0 al 45 de secado.

Tabla 2. Recuento de *L. monocytogenes* suspendida en agua destilada.

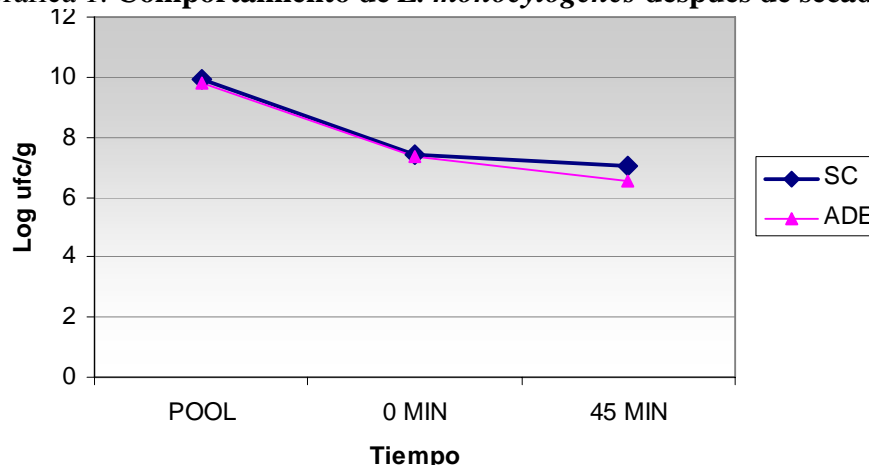
Tiempo secado (min)	Dilución	UFC			Media		Logaritmos (ufc)			Media Log	Desviación Estándar
		a	b	c	UFC	Log	a	b	c		
0	5	17	23	25	22	7.34	7.23	7.36	7.39	7.32	0.17
	6	2	5	4	4	7.60	7.30	7.69	7.60	7.53	0.35
	7	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-
45	3	621	76	104	267	6.42	6.79	5.88	6.01	6.22	0.01
	4	70	16	14	34	6.53	6.84	6.20	6.14	6.39	0.02
	5	6	1	0	2	6.30	6.77	6	-	4.25	0.09
	6	1	0	0	0	-	7	-	-	2.53	4.02
	7	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-

Tabla 3. Recuento de *L. monocytogenes* suspendida en suero de caballo.

Tiempo secado (min)	Dilución	UFC			Media		Logaritmos (ufc)			Media Log	Desviación Estándar
		a	b	c	UFC	Log	a	b	c		
0	5	16	28	34	26	7.41	7.20	7.44	7.53	7.39	0.09
	6	1	2	5	3	7.47	7	7.30	7.69	7.33	0.21
	7	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-
45	3	848	901	855	868	6.92	6.92	6.95	6.93	6.93	0.49
	4	108	117	114	113	7.05	7.03	7.06	7.05	7.04	0.39
	5	10	15	12	12	7.07	7	7.17	7.07	7.08	3.71
	6	0	3	0	1	7	-	7.47	-	2.49	4.04
	7	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-

Los datos en negritas de las tablas anteriores, fueron seleccionados para la realización de la gráfica. Como se observa en la Gráfica 1, la población de microorganismo disminuyó en cada uno de los tiempos. Se observa la diferencia del desarrollo de inóculo en ambos vehículos.

Gráfica 1. Comportamiento de *L. monocytogenes* después de secado.



CONCLUSIONES

Los logaritmos de *L. monocytogenes* presentes en la espinaca, tendieron a disminuir; de los 0 a 45 minutos, transcurridos en el tiempo de secado, se perdió inoculo, al estar expuesto a la campana.

Para el agua destilada, del pool al tiempo 0 bajo en un 26 %, mientras que del tiempo 0 a los 45 min es de 11.04 %. Por lo tanto, la perdida total de *L. monocytogenes* suspendida en agua fue de 3.30 logaritmos, igual a 33.58%. En el caso del Suero de Caballo, bajo del pool al tiempo 0 un 25.31 %; del tiempo 0 a 45 min de secado, fue de un 4.86 %. La perdida total de *L. monocytogenes* suspendida en suero de caballo fue de 2.82 logaritmos, es decir, 28.94%.

Ambas suspensiones microbianas, se mantuvieron similares en el pool y el tiempo 0, pero después de los 45 min de secado, la población de *L. monocytogenes* suspendida en agua cae por debajo del suero, encontrándose una diferencia de 0.48 Log (4.64%).

Esta discrepancia, se debe a la cantidad de nutrientes que contiene el suero de caballo, que protegen al microorganismo contra la desecación. El agua, más cercano a la realidad, no presenta sustancias que protejan al microorganismo, por lo que tiende a morir.

Un factor a considerar, es el uso de agua destilada, y aire estéril en el ensayo, ya que no están presentes en condiciones naturales. Por lo que marca un gran margen de error, en el cual en condiciones reales, el microorganismo no hubiera perecido, sino por el contrario crecido.

Este trabajo, es parte fundamental, que será utilizado como base, entre muchos otros, para el desarrollo de un proyecto más extenso, cuyos objetivos serán: evaluar la eficiencia de agentes desinfectantes para reducir o eliminar *L. monocytogenes*, el tratamiento usado en espinaca cruda y la caracterización molecular de cepas de *L. monocytogenes* recuperados de espinaca.

Durante las cinco semanas del verano, tuve la oportunidad de observar el trabajo realizado en los laboratorios, de los cuales me llevo muchos conocimientos y experiencias, por lo que agradezco a todas las personas que nos apoyaron.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- (1) Fernández Escartín E. “*Microbiología e inocuidad de los alimentos*”
Editado por la Universidad Autónoma de Querétaro, octubre de 2000
Pag 7 – 54; 233 – 260.

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga
Asesor
Laboratorio de Inocuidad Microbiana de los Alimentos
Departamento de Investigación y Postgrado en Alimentos
Facultad de Química. UAQ.