

**RESISTENCIA A CLORO EN CEPAS DE *Listeria monocytogenes*
AISLADAS DENTRO DE UNA PLANTA PROCESADORA DE ESPINACA**

SAAVEDRA PÉREZ, D.A. ⁽¹⁾; MEJIA RUIZ, F. ⁽²⁾;

HERNANDEZ ITURRIAGA, M. ⁽²⁾

⁽¹⁾Licenciatura en Biotecnología

Universidad Autónoma de Querétaro

**⁽²⁾ PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA
REPÚBLICA (PROPAC)**

Universidad Autónoma de Querétaro

RESUMEN

El mayor peligro como fuente de contagio por *Listeria monocytogenes* para el hombre son los alimentos listos para el consumo, especialmente los que se conservan refrigerados por periodos prolongados. En la industria alimentaria el patógeno sobrevive a los procesos de limpieza e higienización por su capacidad de formar biopelículas (*biofilms*) sobre superficies de trabajo y equipos, contaminando los alimentos que allí se procesan. Como una medida para el control del desarrollo de *L. monocytogenes* en los alimentos y en el ambiente donde se procesan los alimentos, en el presente trabajo se realizó: 1) Evaluación de la resistencia de cepas de *Listeria monocytogenes* a germicidas en suspensión de cloro a bajas concentraciones. 2) Determinación de la capacidad de cepas de *Listeria monocytogenes* para la formación de biopelículas en superficie de acero inoxidable en extractos de espinaca. 3) Evaluación de la susceptibilidad de cepas de *Listeria monocytogenes* en las diferentes etapas de formación de las biopelículas, expuestas a la acción de cloro, y finalmente 4) Detectar la expresión de genes asociados a la resistencia a cloro en cepas de *Listeria monocytogenes* inmersas en biopelículas. Los resultados de este trabajo permitirán conocer si las células de *L. monocytogenes* expuestas a cloro en suspensión e inmersas en biopelículas generan resistencia así como elucidar el posible mecanismo utilizado contra la protección al cloro.

INTRODUCCION

En la industria de alimentos una de las medidas para controlar la presencia de microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes* es la desinfección de equipo, superficies y alimentos (como frutas y hortalizas) con compuestos químicos. El cloro es uno de los germicidas más comúnmente empleados en la industria de alimentos.

La eficacia de los tratamientos de desinfección que se aplican a frutas y verduras varía considerablemente. La efectividad de un desinfectante está determinada por diversos factores como el tipo y concentración del germicida, el tipo y estado fisiológico de los microorganismos a inactivar y la naturaleza de la superficie a desinfectar. La interacción entre el germicida y el microorganismo puede verse limitada por la presencia de suciedad, por la infiltración o atrapamiento de los gérmenes en el alimento, o bien, por la presencia de biopelículas bacterianas (Ryu y Beuchat, 2005). Una biopelícula es una matriz constituida principalmente por polisacáridos, hidratada y predominantemente aniónica, en la cual los microorganismos se encuentran inmersos (Costerton *et al.*, 1995). Los microorganismos que forman parte de una biopelícula están adheridos

irreversiblemente (no se remueven con un lavado vigoroso) a la superficie. Otros materiales suelen estar presentes en las biopelículas como cristales de algunos minerales, partículas producto de la corrosión o componentes de la sangre, dependiendo del ambiente en el cual se hayan formado (Donlan, 2002).

Por otra parte, es sabido que la susceptibilidad que muestran las bacterias a los germicidas está determinada por el género y la especie. Sin embargo, el origen o la fuente de aislamiento de los microorganismos también influyen en la susceptibilidad que puedan presentar. Se ha especulado que la resistencia a germicidas puede propiciarse en aquellos microorganismos que se encuentran expuestos constantemente a concentraciones subletales. Sin embargo, hasta ahora no han sido estudiados los mecanismos a través de los cuales las bacterias pueden adquirir resistencia a compuestos químicos empleados en la desinfección.

El objetivo central del trabajo es evaluar la capacidad de resistencia a cloro en cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de una planta procesadora de espinaca y determinar la expresión de genes asociados a dicha resistencia.

METODOLOGIA

Se evaluó la resistencia a cloro en cepas de *Listeria monocytogenes* (L15, Scott A, L75, L15, F6, F8, F14) que fueron aisladas del ambiente de una empresa productora de espinaca pre cocida y congelada. Para la Selección de cepas de *Listeria monocytogenes* con mayor resistencia a cloro. Se colocaron en un matraz estéril 13.5 mL de medio Evans modificado, 13.5 mL de cloro 5 ppm y finalmente 3 mL de inóculo (cepa a evaluar) exponiendo de esta manera a cloro durante 0, 40, 80, 120 y 150 min. e Incubando a 30 °C. a los tiempos mencionados se tomaron alícuotas de la suspensión de cloro inoculada y se hicieron recuentos en agar soya tripticaseína suplementado con rifampicina (200 mg/mL) y pimaricina (100 mg/mL) con la técnica extensión por superficie, Incubando las cajas a 35° C/48 h. Las cepas que mostraron mayor resistencia a cloro fueron seleccionadas para determinar la capacidad de cepas de *Listeria monocytogenes* para formar biopelículas en superficie de acero inoxidable en presencia de residuos de espinaca, para lo cual se emplearon rectángulos de acero inoxidable de 2 x 5 cm. los cuales fueron previamente limpiados, tallados, enjuagados y esterilizados, A partir de espinacas frescas se prepararon los extractos de espinaca, se molieron y se filtraron para retirar la materia orgánica y se prepararon diferentes concentraciones a partir de la solución madre (1:1,1:2,1:3,1:4,1:5) la cual se esterilizó empleando una membrana de filtración (Tamaño de poro 0.45, diámetro 025 Sartorius). Para la Inducción de la formación de biopelículas en la superficie de acero inoxidable se inocularon los cuadros de acero inoxidable con 100 µl, los cuales corresponden a 90µl de extracto de espinaca mas 10 µl de las suspensiones celulares de las cepas de *L. Monocytogenes* resistentes a cloro. El inóculo se distribuyó en la superficie de la placa y las placas inoculadas se almacenaron dentro de recipientes de plástico durante 7 días a 22°C y una humedad relativa de 100%. Para conservar la humedad relativa los recipientes se cerrarán herméticamente con grasa de alto vacío (Dow Corning Corp., Midland, Mich); la humedad relativa y la temperatura se monitorearon con un higrómetro/término (Termochron, i-button). Periódicamente (3, 5, 7 y 10 días) se efectuó el recuento de las células de *Listeria monocytogenes* presentes en las placas de acero inoxidable.

Después de 3 días de almacenadas las placas de acero y formadas las biopelículas en presencia del sustrato de espinaca, las placas se sometieron a inmersión en una solución de cloro valorada (10 ppm) durante 1 min. Se removieron las láminas del germicida y se transfirieron a una bolsa de polietileno conteniendo 20 ml de caldo neutralizante y se desprenderán las células en un homogenizador automático. Finalmente las células de *L. monocytogenes* sobrevivientes al tratamiento de desinfección se cuantificaron en ASTRP. El resto de las placas de acero inoxidable se mantubieron en almacenamiento hasta por 7 días bajo las condiciones de temperatura y HR señaladas previamente. La exposición de las placas de acero inoxidable conteniendo las biopelículas se sometieron nuevamente al tratamiento con cloro a los 3, 5 y 7 días de almacenamiento. De manera simultánea a los tratamientos con cloro, se monitoreó el comportamiento de *L. monocytogenes* durante el almacenamiento en placas no expuestas al germicida (control). Después de inmersas durante los diferentes tiempos, al séptimo día las células retiradas de la Biopelícula se inocularon en un matraz con medio Evans y cloro (3 ppm) y se almacenaron a 30C durante 150 min. Esta dinámica permitirá observar si la resistencia a cloro se incremento en las células de *Listeria* que fueron expuestas repetidamente a cloro en las etapas de la formación de biopelículas.

RESULTADOS

Se observo una reducción logarítmica que no fue estadísticamente significativa sin embargo en las graficas se puede apreciar una diferencia comparativa entre cepas distintas mediante el decremento de log UFC a través del tiempo en que fueron sometidas al cloro, lo cual nos indica que cepas con historial de estrés causado por germicidas presentan una relativa resistencia ante tal. Se encontró que células procedentes de las cepas L15 procedentes de la fabrica procesadora de espinacas presentaban mayor resistencia que cepas control como Scott A que nunca habían sido sometidas a tales condiciones de estrés.

Figura 1. Comparación del crecimiento de dos cepas de *L. monocytogenes* en condiciones de cloro 10 ppm.

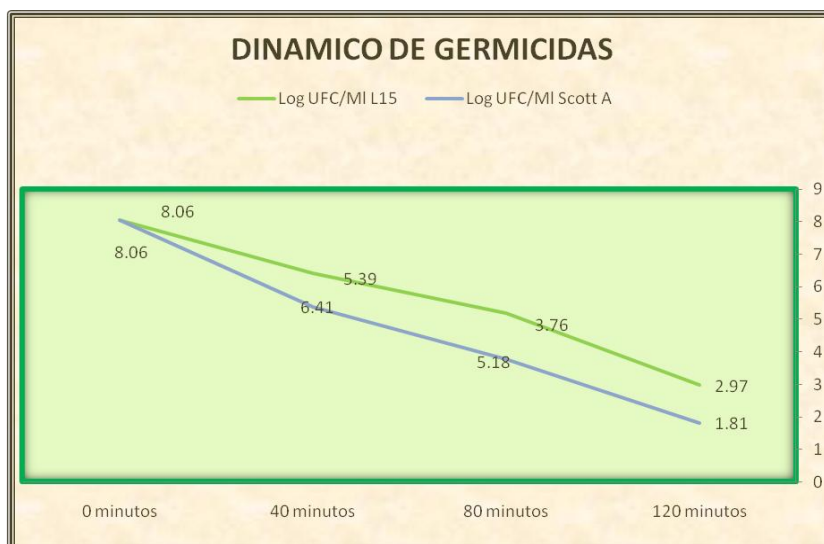
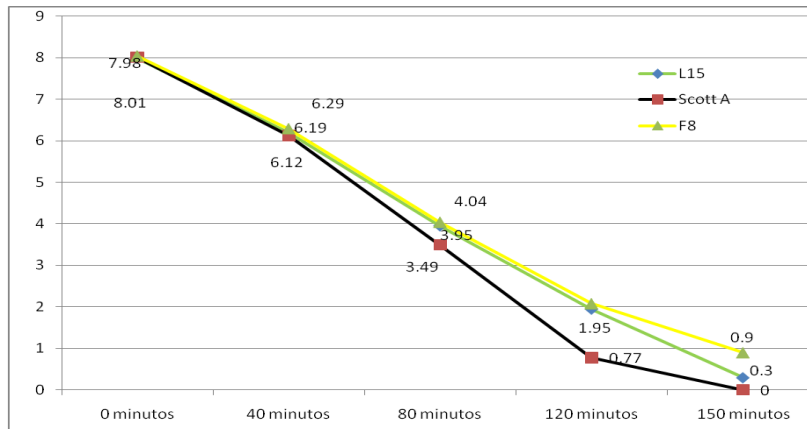


Figura 2. Dinámica de crecimiento de tres diferentes cepas (L15, Scott A, F8) de *L. monocytogenes* en condiciones de cloro 10 ppm. Las unidades están expresadas en log. UFC.



CONCLUSIONES

Las células de *L. monocytogenes* expuestas a concentraciones subletales de cloro expresan o activan una serie de genes y mecanismos que le confieren resistencia contra el mismo, los cuales están silenciados en células que no se encuentran expuestas bajo estas mismas condiciones de estrés. Determinar estos mecanismos y genes expresados en la tolerancia de agentes germicidas tales como el cloro, es de suma importancia en el sector alimentario ya que es necesario conocer que tratamiento es el más eficaz contra mecanismos fisiológicos y genéticos como los presentados por *L. monocytogenes* para así poder aplicar estrategias de saneamiento más efectivas que nos permitan tener un control en el manejo, procesamiento y consumo de alimentos. En cuanto a la detección de la expresión de genes asociados a la resistencia a cloro en cepas de *Listeria monocytogenes* inmersas en biopelículas así como la identificación de estos genes, aun se lleva a cabo por lo cual es difícil hacer una conclusión definitiva de este experimento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beuchat LR. "Pathogenic microorganisms associated fresh produce". *J. Food Prot.* 59: 204- 216, **1996**
- Brackett R.E. "Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens in produce". *Postharvest Biol Technol* 15:305-311, **1999**
- Goller CC, Romeo T. "Environmental influences on biofilm development. In: *Bacterial biofilms*". Romeo T, Ed. *Curr Top Microbiol Immun* 37-66, **2008**

Dr. MONTSERRAT HERNANDEZ ITURRIAGA

