



RESULTADOS
DE INVESTIGACIÓN
ISSN 2027-0291
VOLUMEN 3 No. 3

PROGRAMA DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS



**Evaluación
de la
efectividad
de algunos
antimicrobianos
frente a
Listeria monocytogenes
en lechuga**

GILMA JANETH LUNA CORTÉS
ADRIANA ROMERO GIL
HUGO LOZADA SEPÚLVEDA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA



UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ
JORGE TADEO LOZANO
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN

Evaluación de la efectividad de algunos antimicrobianos frente a *Listeria monocytogenes* en lechuga

Investigadora principal

GILMA JANETH LUNA CORTÉS*

Coinvestigadores

ADRIANA ROMERO GIL**

HUGO LOZADA SEPÚLVEDA***

* Microbióloga, Magíster en Microbiología; Decana Programa de Ingeniería de Alimentos de la Universidad Jorge Tadeo Lozano; Carrera 4 No. 22-61, 242 7030 ext 1440.

Correo electrónico: janeth.luna@utadeo.edu.co

** Ingeniera de Alimentos; Asistente de Investigación Centro de Investigaciones y Asesorías Agronidustriales de la Universidad Jorge Tadeo Lozano; Carretera Central del Norte km 3, Chía – Cundinamarca, 865 0218 ext 2414, 300 212 6831, 313 312 9631.

Correo electrónico: adriluromerogil@hotmail.com

*** Ingeniero de Alimentos; Asistente de Investigación Programa de Ingeniería de Alimentos de la Universidad Jorge Tadeo Lozano; Carrera 4 No. 22-61, 301 430 4900.

Correo electrónico: hugoloz@hotmail.com

Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano
Carrera 4 No. 22-61 Bogotá D.C. - Colombia
www.utadeo.edu.co

RESULTADOS DE INVESTIGACIÓN - ISSN 2027-0291
VOL. 3 N°. 3

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA
PROGRAMA DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS

EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE ALGUNOS ANTIMICROBIANOS FRENTE A *Listeria monocytogenes* EN LECHUGA

GILMA JANETH LUNA CORTÉS, ADRIANA ROMERO GIL Y HUGO LOZADA SEPÚLVEDA.

COMITÉ INSTITUCIONAL DE INVESTIGACIÓN:

JOSÉ FERNANDO ISAZA DELGADO - RECTOR
DIÓGENES CAMPOS ROMERO - VICERRECTOR ACADÉMICO
MANUEL GARCÍA VALDERRAMA - DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN
HENRY JARAMILLO MEJÍA - VICERRECTOR ADMINISTRATIVO Y FINANCIERO
GILMA JANETH LUNA CORTÉS - DECANA FACULTAD DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS
DIÓGENES CAMPOS ROMERO - DECANO FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA
SALOMÓN KALMANOVITZ - DECANO FACULTAD DE CIENCIAS ECONÓMICAS-ADMINISTRATIVAS

DIRECTOR DE PUBLICACIONES (E): Jaime Melo Castiblanco
REVISIÓN DE TEXTOS: Henry Colmenares Melgarejo
CONCEPTO GRÁFICO Y DISEÑO DE PORTADA: Felipe Duque Rueda
DIAGRAMACIÓN: Mary Lidia Molina Bernal

Impresión digital: Xpress Estudio Gráfico y Digital S.A.

Reservados todos los derechos
2010 © Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano

Impreso en Colombia

Contenido

Resumen	7
Abstract	7
Agradecimientos.....	8
1. Introducción.....	9
2. Materiales y Métodos.....	11
Toma de muestra.....	11
Análisis microbiológicos para aislamiento e identificación de cepas nativas.....	11
Material vegetal para prueba de desinfección.....	12
Preparación del inóculo.....	12
Tratamiento con desinfectantes.....	12
Análisis microbiológicos para efectividad del desinfectante.....	13
Análisis estadístico.....	13
3. Resultados y discusión.....	16
Prevalencia de <i>Listeria monocytogenes</i>	16
Efectividad de los tratamientos en condiciones de laboratorio.....	16
Efectividad de los tratamientos en producto fresco.....	19
4. Conclusiones.....	22
5. Bibliografía.....	23

6. Índice de tablas

Tabla 1. Prevalencia de <i>L. monocytogenes</i> en variedades de lechuga batavia y romana.....	16
------------------------------------------------------------------------------------------------	----

7. Índice de figuras

Figura 1. Tratamientos de desinfección aplicados en lechuga romana. (a) Ensayo en condiciones de laboratorio. (b) Ensayo en producto fresco.....	14
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Figura 2. Conteo de <i>L. monocytogenes</i> (log UFC/g) en lechuga fresca de los ensayos por triplicado a diferentes concentraciones de desinfectantes y tiempos de exposición. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media ($\alpha = 0.05$).....	17
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Figura 3. Unidades de reducción logarítmica (URL) de <i>L. monocytogenes</i> con los tratamientos evaluados en el tiempo de exposición más efectivo.....	18
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Figura 4. Conteo de mesófilos aerobios (log UFC/g) en lechuga fresca picada control e inoculadas frente a diferentes tratamientos de desinfectantes durante 180 s. (A) ○ Muestra control y ● muestra contaminada, tratamiento con AD; (B) △ Muestra control y ▲ contaminada, tratamiento con HS 125 ppm; (C) □ Muestra control y ■ contaminada, tratamiento con AP 80 ppm; (D) ★ Muestra control y ★ contaminada, tratamiento con mezcla de AP 80 ppm y NIS 2000 UI. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media ($\alpha = 0.05$)...	21
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Resumen

Listeria monocytogenes puede ocasionar brotes de enfermedades por el consumo de lechuga. El objetivo del trabajo fue comparar la eficacia de diferentes antimicrobianos frente a cepas nativas de *L. monocytogenes* en lechuga romana para determinar la mejor concentración y tiempo de exposición en condiciones de laboratorio y en producto fresco. Lechuga romana inoculada con un cóctel de *L. monocytogenes* serotipo 4b se evaluó en condiciones de laboratorio y en producto fresco frente a concentraciones de hipoclorito de sodio (HS), dióxido de cloro (DC), ácido peroxiacético (AP), agua destilada (AD) y mezclas de nisina con DC y con AP a diferentes tiempos de exposición. El desinfectante más efectivo en condiciones de laboratorio fue AP (80 ppm) por 120 s y en producto fresco fue HS (125 ppm).

Palabras claves: *Listeria monocytogenes*, antimicrobianos, lechuga, desinfección.

Abstract

Listeria monocytogenes can cause foodborne diseases by the consumption of lettuce. The objective was to compare the efficacy of different antimicrobial agents against native strains of *L. monocytogenes* in romaine lettuce to determine the best concentration and exposure time under laboratory conditions and in fresh produce. Romaine lettuce inoculated with a cocktail of *L. monocytogenes* serotype 4b was evaluated under laboratory conditions and in fresh produce with different concentrations of sodium hypochlorite (SH), chlorine dioxide (CD), peroxyacetic acid (PA), distilled water (DW) and mixed with CD and with nisin PA at various exposure times. The most effective disinfectant in laboratory conditions was PA (80 ppm) for 120 s and fresh produce was SH (125 ppm).

Key words: *Listeria monocytogenes*, antimicrobials, lettuce, sanitation.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dirección de Investigación de la Universidad Jorge Tadeo Lozano por el apoyo financiero de este trabajo, al Centro de Investigaciones y Asesorías Agroindustriales y a ECOLAB Colombia por los materiales suministrados a este proyecto.

1. Introducción

Hortalizas de hoja pueden ser contaminadas con patógenos como *Listeria monocytogenes* y ocasionar enfermedades transmitidas por alimentos asociadas al consumo de lechuga fresca (Beuchat, 2002; FDA, USDA, CDC. 2003a). *L. monocytogenes* es un microorganismo psicrófilo que puede causar listeriosis; el serotipo 4b es el responsable de la mayoría de los brotes (CDC, 2008) y representa un riesgo para las poblaciones susceptibles tales como mujeres embarazadas, personas inmuno suprimidas y adultos mayores (IFT, FDA, 2001).

El crecimiento de *L. monocytogenes* varía según las condiciones de presentación y la temperatura de almacenamiento de la hortaliza (FDA, USDA, CDC. 2003b) razón por la cual es necesario utilizar mecanismos como la desinfección para reducir la población microbiana presente en la lechuga, a valores que no representen riesgo para la salud de los consumidores, debido a que los productos se consumen sin un tratamiento de conservación previo. Las tecnologías tradicionales de desinfección utilizan diferentes agentes; el más usado es el hipoclorito, además de ácidos orgánicos, ozono, dióxido de cloro, peróxido de hidrógeno, compuestos de yodo, de amonio cuaternario, fenoles, alcoholes (Akbas y Ölmez, 2007; Lang y col., 2004; Lin y col., 2002; Sy y col., 2005.) así como bacteriocinas (Davison y Harrison, 2002)

En Colombia, los pocos estudios reportados para este tipo de producto confirman la presencia de este patógeno en lechugas, repollos frescos y procesados (Luna y col., 2008) así como en aguas de riego (Cruz y Kim, 1999). Aunque el volumen de producción de lechuga es moderado, su demanda interna va en aumento (CCB, 2005); lo que hace necesario evaluar diferentes tipos de desinfectantes para contar con información sobre las concentraciones óptimas para reducir poblaciones nativas de este microorganismo en la lechuga. Por lo anterior, el objetivo del estudio fue comparar la eficacia de diferentes antimicrobianos (hipoclorito de sodio, dióxido de cloro, ácido peroxiacético, mezclas de nisina, y agua destilada) frente a *L. monocytogenes* aislada a partir de hortalizas de la Sabana de Bogotá para determinar la mejor concentración y tiempo de exposición en condiciones tanto de laboratorio como en producto fresco.

2. Materiales y Métodos

Toma de muestra

Se realizaron tres muestreos para recolectar 45 muestras de lechuga batavia (*Lactuca sativa* L.) en los municipios de Facatativa y Madrid y 45 de lechuga romana (*Lactuca sativa* variedad *longifolia*) en los municipios de Madrid y Chía, ubicados en la Sabana de Bogotá. Se recolectaron 3 – 4 unidades de cada hortaliza (aproximadamente 1 kg). Las muestras fueron seleccionadas libres de defectos físicos y almacenadas en condiciones de refrigeración. En el laboratorio se procesaron aproximadamente 400 g de material vegetal para las diferentes pruebas microbiológicas. Las muestras se analizaron el mismo día del muestreo.

Análisis microbiológicos para aislamiento e identificación de cepas nativas

Para el aislamiento e identificación de *L. monocytogenes* se suspendieron 25 g aproximadamente de material vegetal en caldo Universidad de Vermont Modificado UVM con suplemento selectivo UVM I (OXOID) que se incubó a 35°C por 48 horas. 1 ml de caldo UVM I fue inoculado en 10 ml de caldo UVM con suplemento selectivo UVM II (OXOID), que se incubó a 35°C por 24 horas. Paralelamente, se usó caldo One Broth con suplementos (OXOID) que se incubó a 30°C por 24 horas. A partir de los caldos de enriquecimiento, UVM II y One Broth, se aisló por agotamiento en Agar Cromógeno con suplemento selectivo y diferencial (OXOID) y Agar Palcam con suplemento selectivo (OXOID) (APS) que se incubaron a 35°C por 48 horas. Las colonias presuntivas fueron aisladas en Agar Caseína Soya Tryptosa CASOY (OXOID). Los microorganismos obtenidos fueron sometidos a pruebas bioquímicas para la diferenciación de especies de *Listeria* (De Curtis y col., 2002). Para la serotipificación molecular se utilizó el protocolo reportado por Yildirim y colaboradores (2004). Las cepas control utilizadas fueron *L. monocytogenes* ATCC 19114, *L. innocua* ATCC 33090, *E. coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Material vegetal para prueba de desinfección

Se utilizó lechuga romana (*Lactuca sativa* variedad *longifolia*) cultivada en el Centro de Investigaciones y Asesorías Agroindustriales adscrito a la Universidad Jorge Tadeo Lozano. Las lechugas con un peso aproximado de 200 g se seleccionaron libres de defectos y se examinaron para conteo de mesófilos aerobios y de *L. monocytogenes*. En el laboratorio, el material vegetal se lavó con agua destilada con el objetivo de eliminar la materia orgánica presente y se cortó bajo condiciones asépticas en tiras de aproximadamente 5 mm.

Preparación del inóculo

Se usaron cepas puras de tres serotipos 4b de *L. monocytogenes* aislados de lechuga fresca romana (013 y 042) y de espinaca (048) durante el estudio. Las cepas se cultivaron en Agar Caseína Soya Tryptosa (OXOID) con 0.6% de extracto de levadura (OXOID) (ACEL). Se realizaron cultivos consecutivos en fase estacionaria en Caldo Infusión Cerebro Corazón (OXOID) (BHI) a 35°C. Las cepas se conservaron a -27°C en BHI con glicerol 10%. Cada una de las cepas se inoculó por separado en BHI con 0.5% de glucosa y se incubó a 35°C en agitación a 110 rpm/12 h. A continuación, las células se centrifugaron a 1800 rpm/20 min, el precipitado se lavó tres veces con solución salina 0.85%, se resuspendió en agua peptonada 0.1% para obtener una concentración de 10^9 - 10^{10} células/ml y para el cóctel se mezclaron en volúmenes iguales. Se realizó conteo en superficie en ACEL y en APS a 35°C/48 h para determinar la concentración microbiana de *L. monocytogenes* en el cóctel.

Tratamiento con desinfectantes

Se colocó asépticamente en bolsas plásticas lechuga cortada y se inoculó con una concentración conocida del cóctel de cepas nativas (10^6 - 10^7 UFC/g). Para favorecer la adsorción de la bacteria al material vegetal se mantuvo en agitación a 110 rpm/15 min a 20°C. Para las pruebas en laboratorio y en producto fresco se siguió el esquema de la Figura 1. A las muestras tratadas se les realizó conteo en superficie de *L. monocytogenes* y mesófilos aerobios en ACEL y APS para determinar su concentración.

Se utilizó hipoclorito de sodio HS (Clorox comercial), dióxido de cloro DC (Selectocide ® Dióxido de Cloro, Cabarria & Compañía S.A.), ácido peroxiacético AP (Tsunami 100™ Ecolab, St. Paul, MN), y nisina NIS (Nisin from *Streptococcus lactis*, 25%, SIGMA). Las soluciones de desinfectante a diferentes concentraciones se prepararon a diario de acuerdo con las recomendaciones del productor. La concentración de cloro libre y residual en las soluciones de HS y DC se determinaron por método colorimétrico (APHA, 1995) y la de AP por el método indicado por los fabricantes (Ecolab, 2008). La solución de NIS (SIGMA, 2008) se preparó según Ukuku y colaboradores (1998). En todas las soluciones se determinó el pH final.

Análisis microbiológicos para efectividad del desinfectante

Para cada ensayo en condiciones de laboratorio y producto fresco se suspendieron 5 g de lechuga tratada en 45 ml de caldo Dey Engley - DEB (REMEL) durante 1 min, con el fin de neutralizar la acción del desinfectante. Posteriormente, se realizaron diluciones en agua peptonada 0.1% (OXOID) y siembra en superficie por duplicado en ACEL y APS para cuantificar bacterias aerobias mesófilas y *L. monocytogenes*, respectivamente. Se tomó como control en la prueba de laboratorio, el recuento inicial del microorganismo en la lechuga fresca sin tratamiento de desinfección y se determinaron las unidades de reducción logarítmica (URL) de *L. monocytogenes* para cada desinfectante, definidas como el logaritmo de la población reducida en el tiempo examinado. En la prueba de producto fresco el control corresponde al ensayo no inoculado sometido a los diferentes tratamientos.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos a partir de las muestras analizadas fueron tabulados en una hoja electrónica de Excel para determinar la prevalencia de *L. monocytogenes* en los productos. Se utilizó un diseño factorial aleatorio por bloques para el estudio de desinfección, el primer bloque constituido por un tratamiento control (agua destilada) y cinco tiempos de contacto y el segundo bloque por cuatro desinfectantes a dos concentraciones y cinco tiempos de contacto para un total de 45 tratamientos por triplicado. Para cada desinfectante, las

variables fueron tiempo de contacto y concentración del desinfectante en condiciones de laboratorio; la variable de respuesta se midió en concentración del organismo expresada en logaritmo. Para la prueba en producto fresco la variable de respuesta fue el conteo de mesófilos aerobios y *L. monocytogenes* en el tiempo de almacenamiento. Se realizó estadística descriptiva a los datos obtenidos para conocer su comportamiento, prueba de hipótesis con análisis de varianza y múltiples pruebas de rango para la comparación de las variables. Los programas estadísticos utilizados fueron Statgraphics y SPSS.

Figura 1. Tratamientos de desinfección aplicados en lechuga romana.
(a) Ensayo en condiciones de laboratorio.

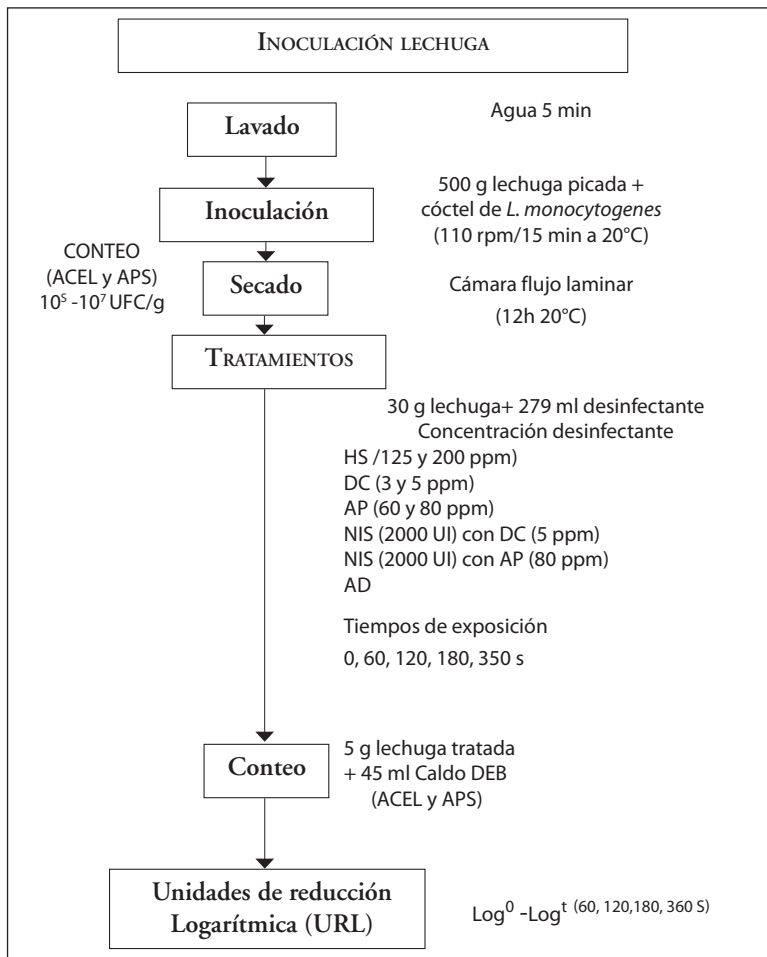
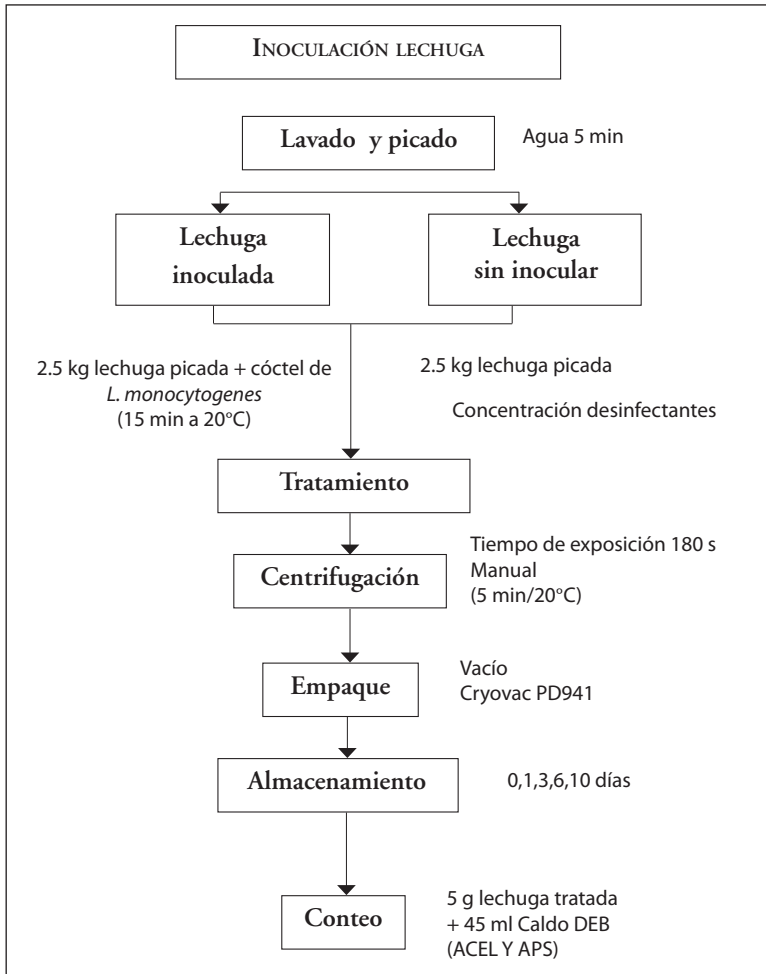


Figura 1. Tratamientos de desinfección aplicados en lechuga romana.

b) Ensayo en producto fresco.



3. Resultados y discusión

Prevalencia de *Listeria monocytogenes*

En la Tabla 1 se presenta la prevalencia de *L. monocytogenes* (6.7% para lechuga romana y 0% para lechuga batavia). Se aisló *L. monocytogenes* en 3 muestras del total de muestras analizadas (90) para una prevalencia de 3.3%. La mayoría de las cepas aisladas fueron serotipo 4b, la identificación de este serotipo, que está estrechamente ligado con brotes causados por alimentos contaminados con este patógeno, señala la importancia de caracterizar su potencial virulento. Los resultados obtenidos coinciden con los encontrados en un estudio donde las serovariedades de *L. monocytogenes* más frecuentes fueron 1/2 y 4b lo que demuestra el riesgo de consumir estos productos (De Simón y col., 1992). La prevalencia de *L. monocytogenes* varía según la hortaliza; el porcentaje en el estudio (3.3%) fue menor a la estimación de prevalencia para vegetales frescos (5%) de Crepet y col. (2007). Los resultados contrastan con los obtenidos a partir de un total de 120 muestras de vegetales mínimamente procesados en Venezuela (De Curtis y col., 2002) donde encontraron una prevalencia de 9% para *L. monocytogenes*, lo que nos indica la importancia de realizar estudios para establecer las fuentes y rutas de contaminación en este tipo de productos.

Tabla 1. Prevalencia de *L. monocytogenes* en variedades de lechuga batavia y romana.

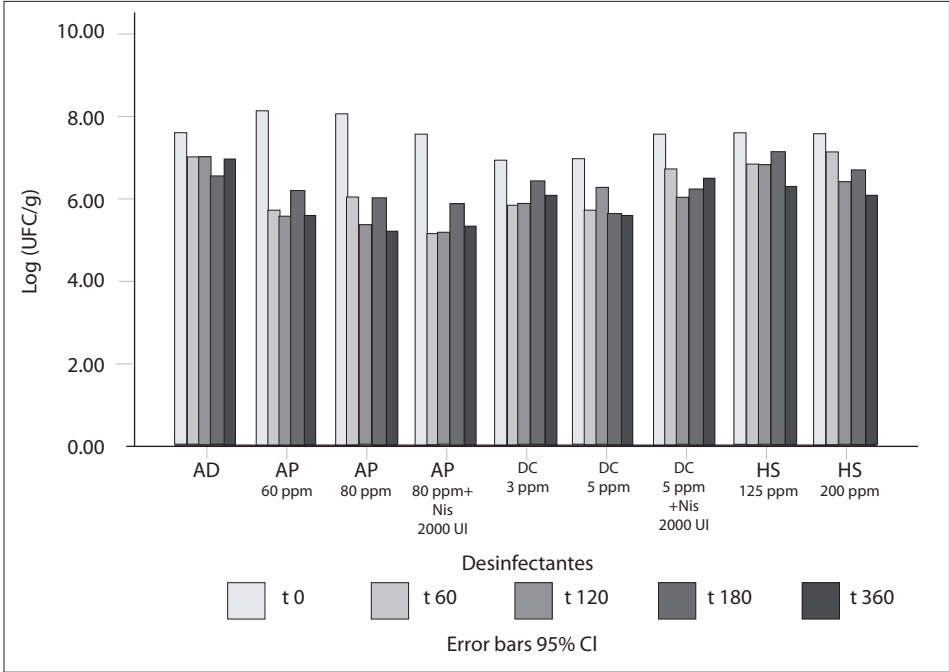
Muestreo	Lechuga batavia			Lechuga romana		
	1	2	3	1	2	3
n*(+)/n total	0/15	0/15	0/15	1/15	2/15	0/15
	0/45			3/45		
% total	0			6.7		
*n= número de muestras						

Efectividad de los tratamientos en condiciones de laboratorio

En la Figura 2 se presentan los recuentos de los tratamientos utilizados en las concentraciones de los diferentes desinfectantes examinados los cuales no mostraron diferencias significativas ($\alpha=0.05$). El mejor tratamiento fue AP 80 ppm

seguido de AP 80 ppm con Nis 2000 UI, HS 125 ppm y DC 3 ppm. Los tiempos de contacto evaluados (60, 120, 180 y 360 s) presentaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) para las mejores concentraciones de los desinfectantes examinados (120 s para AP 80 ppm, 120 s para AP 80 ppm con Nis 2000 UI, 360 s para HS 125 ppm y 180 s para DC 3ppm).

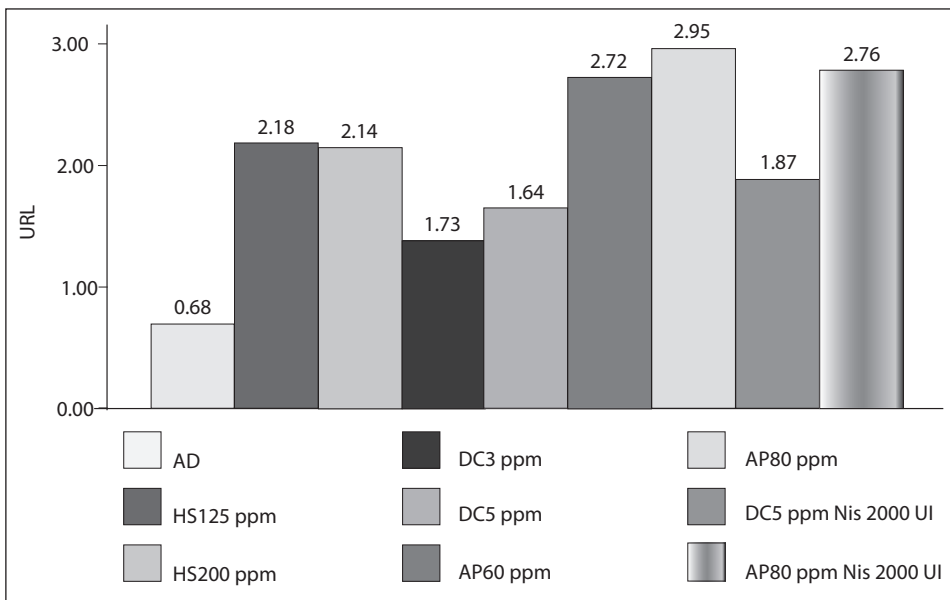
Figura 2. Conteo de *L. monocytogenes* (log UFC/g) en lechuga fresca de los ensayos por triplicado a diferentes concentraciones de desinfectantes y tiempos de exposición. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media ($\alpha =0.05$).



En la Figura 3 se observa que el valor mayor de unidades de reducción logarítmica (URL) de *L. monocytogenes* en el estudio fue de 2.95, 2.76 y 2.72, que corresponde a AP (80 ppm), a la combinación de AP (80 ppm) con nisina (2000 UI) y AP (60 ppm), respectivamente; las URL con HS (200 y 125 ppm) fueron de 2.14 y 2.18, respectivamente; el DC, 5 y 3 ppm, redujo 1.64 y 1.37 y la menor reducción (0.68 URL) fue con AD.

Según Rodgers y colaboradores (2004) el AP redujo 4.3 a 4.5 log UFC/g para *L. monocytogenes* después de 5 minutos de tratamiento en hortalizas, que se atribuye al efecto residual del ácido acético liberado por la degradación del AP cuyos productos penetran la membrana plasmática y acidifican su interior. Algunos estudios muestran que dependiendo de la concentración de DC (3 a 10 ppm) varía la reducción entre 0.8 y 4 log UFC/g de *L. monocytogenes* (Oh y col., 2005; Zhang y Farber, 1996). Lo anterior puede deberse a la forma de aplicación (acuosa o gaseosa) del producto (Han y col., 2001; Han y col., 2002) así como al aumento en la superficie de la lechuga picada ya que los desinfectantes como agentes oxidativos pueden reaccionar con el tejido vegetal y sus componentes extracelulares exudados y no son capaces de inactivar las células bacterianas presentes. Zhang y Farber (1996) reportaron una reducción logarítmica máxima de 1.7 para *L. monocytogenes* en lechuga picada usando 200 ppm de cloro/10 min y de 1.2 con 100 ppm/10 min. Akbas y Olmez (2007) no encontraron diferencias significativas entre los tiempos examinados (2 y 5 min) cuando se expuso a 100 ppm de cloro porque el efecto se produce durante los 2 primeros minutos de contacto con reducciones menores a 2 log.

Figura 3. Unidades de reducción logarítmica (URL) de *L. monocytogenes* con los tratamientos evaluados en el tiempo de exposición más efectivo.



La baja efectividad del cloro puede deberse a la presencia de materia orgánica en la superficie de la lechuga que contribuye a disminuir su efectividad (Lin y col., 2002). La reducción con AD en este trabajo coincide con diferentes estudios donde solamente se reduce la población en menos de una unidad logarítmica atribuible al efecto del lavado mecánico o físico del agua (Nascimento y col., 2003). En presencia de nisina la población de *L. monocytogenes* en lechuga se redujo en 0.95 log UFC/g, la eficacia de la bacteriocina depende de las propiedades químicas y físicas del alimento y si ésta se combina con ácidos orgánicos aumenta su efecto inhibitorio (Allende y col., 2007). En el presente estudio no se observó ningún aumento en la inhibición al combinar la nisina con el AP.

Efectividad de los tratamientos en producto fresco

En la prueba de lechuga empacada al vacío, la población microbiana tanto de las muestras control como de las inoculadas aumentó gradualmente durante el período de 10 días (Figura 4). En las muestras control se observó una disminución de la población a las 24 horas principalmente en los tratamientos con AD y HS. En el control no se presentaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre los recuentos de los cuatro tratamientos evaluados, con excepción del AD, mientras que en los recuentos de las muestras inoculadas sometidas a tratamiento se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos utilizados ($\alpha=0.05$) siendo el más efectivo el HP (125 ppm), seguido de la mezcla de AP 80 ppm con NIS 2000 UI, AP (80 ppm) y AD. Los tratamientos con AP 80 ppm con NIS 2000 UI, AP (80 ppm) no presentaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$). Durante el estudio, los patrones de crecimiento en el tiempo son similares entre las muestras sometidas a diferentes tratamientos de desinfección, lo cual puede explicarse por el balance competitivo entre la población de *Listeria* y la microbiota presente en el producto, que favorece el desarrollo del patógeno (Francis y O' Beirne, 1997). Según Rodgers y colaboradores (2004) después de nueve días de ensayo, los recuentos de *L. monocytogenes* en las muestras sometidas a 5 minutos de tratamiento con AP 80 ppm y 100 ppm de cloro fueron 1 a 2 log y 1.5 a 2.5 log más bajos que el inicial, respectivamente. Los resultados del estudio coinciden en que el HS fue más efectivo que el AP durante el almacenamiento. Allende y colaboradores (2007) encontraron que una solución con bacteriocina redujo la población de la lechuga cortada en 2.4 log, lo cual se puede explicar porque ésta puede adsorberse a la superficie de la lechuga y ocasionar su inactivación.

De otra parte, diferentes estudios señalan que el comportamiento de *L. monocytogenes* varía de acuerdo con la atmósfera de almacenamiento y aunque dicha condición puede contribuir a mejorar las condiciones fisiológicas del producto, no así las sanitarias que pueden ser favorecidas por un mal manejo durante las operaciones de procesamiento de productos listos para el consumo (Jacxsens y col., 1999). Según Kakiomenou y colaboradores (1998), aunque los tratamientos con diferentes atmósferas reducen la población de mesófilos aerobios, los cambios que se suceden pueden desfavorecer el desarrollo de la biota presente permitiendo el crecimiento de *L. monocytogenes* que puede crecer a 4°C. Lo anterior enfatiza la importancia de unas estrictas medidas higiénicas durante la producción, procesamiento y empaque para evitar la contaminación o proliferación del microorganismo (Li y col., 2002).

Los resultados nos demuestran que es posible utilizar desinfectantes como HS y AP en concentraciones menores al límite permitido para reducir cepas nativas de *L. monocytogenes*. Por lo anterior, los programas de higienización de lechuga deben ser diseñados tomando en consideración la microbiota natural presente en la lechuga porque ésta juega un papel protagónico en el mantenimiento de su calidad.

Figura 4. Conteo de mesófilos aerobios (log UFC/g) en lechuga fresca picada control e inoculadas frente a diferentes tratamientos de desinfectantes durante 180 s.

(A) ○ Muestra control y ● muestra contaminada, tratamiento con AD;

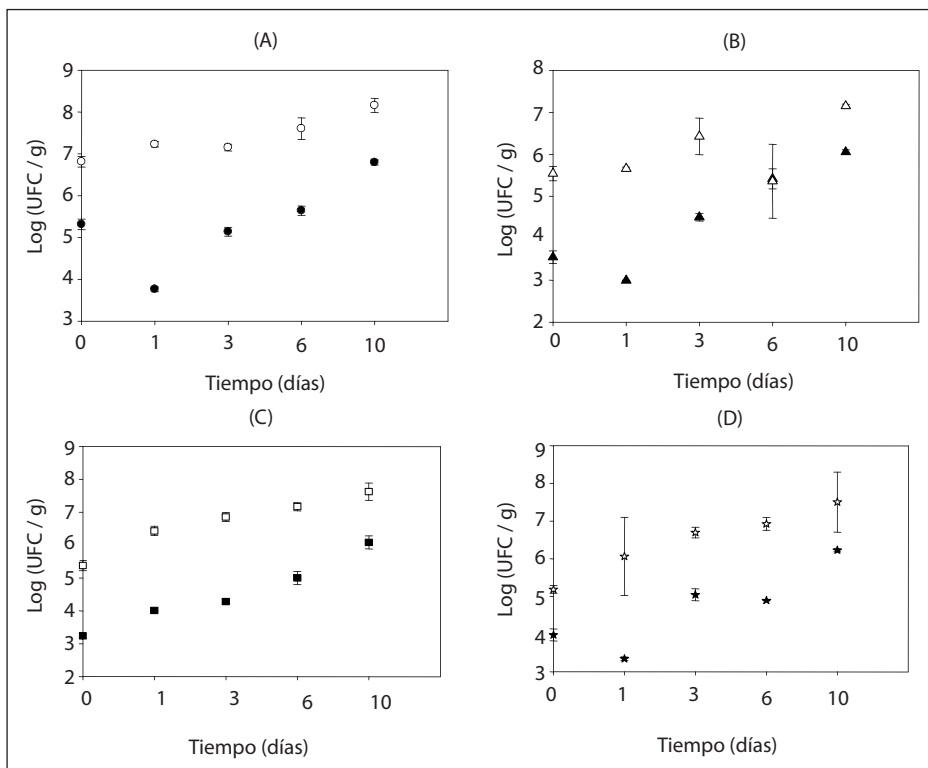
(B) △ Muestra control y ▲ contaminada, tratamiento con HS 125 ppm;

(C) □ Muestra control y ■ contaminada, tratamiento con AP 80 ppm;

(D) ☆ Muestra control y ★ contaminada, tratamiento con mezcla de AP 80 ppm y NIS 2000 UI.

Las barras verticales representan la desviación estándar de la media ($\alpha = 0.05$).

Concentración inicial de muestras control 5.93 log UFC/g (□) y muestras inoculadas 7.96 log UFC/g (■).



4. Conclusiones

Se aisló *Listeria monocytogenes* en un 3.3% del total de hortalizas analizadas, que corresponde a una prevalencia de 6.7% para lechuga romana y 0% para lechuga batavia. El serotipo molecular más frecuente fue el 4b. Se encontró que el desinfectante más efectivo de los nueve evaluados fue AP (80 ppm) que en un tiempo de exposición de 120 s, redujo en 2.95 unidades logarítmicas la población nativa de *L. monocytogenes* en lechuga romana en condiciones de laboratorio; el más efectivo en condiciones de estantería fue el HS (125 ppm). Estos resultados muestran la necesidad de mantener las condiciones higiénicas a lo largo de la poscosecha para mantener los niveles bajos o, lo que sería deseable, libre de *L. monocytogenes* la lechuga fresca. También permiten reafirmar la importancia del control microbiológico de las hortalizas, porque aun cuando *L. monocytogenes* esté inicialmente en bajos niveles en un producto contaminado, el microorganismo puede multiplicarse durante el almacenamiento, inclusive a temperaturas de refrigeración, ya que es psicotrófico.

5. Bibliografía

- AKBAS, M. Y. and H. ÖLMEZ. 2007. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce by dip wash treatments with organic acids. *Letters in Applied Microbiology*. 44: 619-624.
- ALLENDE, A. , B. MARTÍNEZ, V. SELMA, M. I. GIL, J. E. SUÁREZ and A. RODRÍGUEZ. 2007. Growth and bacteriocin production by lactic acid bacteria in vegetable broth and their effectiveness at reducing *Listeria monocytogenes* in vitro and in fresh-cut lettuce. *Food Microbiol.* 24:759-766.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 1995. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. 19th ed. American Public Health Association. Washington D.C. 438-439, 453-454.
- BEUCHAT L. R. 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes Infect.* 4:413-423.
- CÁMARA DE COMERCIO DE BOGOTÁ. 2005. Balance Tecnológico Cadena Productiva Hortofrutícola, Bogotá, 132 p.
- CENTER OF DISEASES CONTROL. Annual Listing of Foodborne Disease Outbreaks, United States, 1990-2005. http://www.cdc.gov/outbreaknet/surveillance_data.html. Consultado en línea en noviembre 13 de 2009.
- CREPET A., I. ALBERT, C. DERVIN and F. CARLIN. 2007. Estimation of microbial contamination of food from prevalence and concentration data: application to *Listeria monocytogenes* in fresh vegetables. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:250-258.
- CRUZ S. y H. J. KIM 1999. Incidencia de *Listeria monocytogenes* en aguas de riego para hortalizas (lechugas y repollo) en el Municipio de Mosquera. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Departamento de microbiología. Tesis de pregrado. Bogotá, Colombia. 72p.
- DAVISON, M. and M. HARRISON. 2002. Resistance and adaptation of food antimicrobials, sanitizers, and process control. *Food Technology*. 56:69-78.
- DE CURTIS M. L., O. de Franceschi and N. de Castro. 2002. *Listeria monocytogenes* in vegetables minimally processed ready-to-use. *Arch. Latinoam. Nutr.* 52: 282-288.
- DE SIMÓN M., C. TARRAGO and M. D. FERRER. 1992. Incidence of *Listeria monocytogenes* in fresh foods in Barcelona (Spain). *Int. J. Food Microbiol.* 16:153-156.
- ECOLAB. 2008. Kit Titulación Ácido Peroxiacético. Comunicación personal.

- FOOD DRUG ADMINISTRATION, UNITED STATES OF DEPARTMENT AGRICULTURE, CENTER OF DISEASES CONTROL. 2003a. Quantitative Assessment of Relative Risk to Public Health. Among Selected Categories of Ready-to-Eat Foods. <http://www.foodsafety.gov/~dms/lmr2-2.html>. Consultado en línea en septiembre 13 de 2009.
- _____. UNITED STATES OF DEPARTMENT AGRICULTURE, CENTER OF DISEASES CONTROL. 2003b. Quantitative Assessment of Relative Risk to Public Health. Among Selected Categories of Ready-to-Eat Foods. Appendix 8: Growth of *Listeria monocytogenes* in Foods. <http://www.foodsafety.gov/~dms/lmr2-a8.html>. Consultado en línea en septiembre 13 de 2009.
- FRANCIS, G. A. and D. O' BEIRNE. 1997. Effects of gas atmosphere, antimicrobial dip and temperature on the fate of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* on minimally processed lettuce. *Int. J. Food Sci & Tech.* 32:141-151.
- HAN Y., R. H. LINTON, S. S. NIELSEN and P. E. Nelson. 2001. Reduction of *Listeria monocytogenes* on green peppers (*Capsicum annuum* L.) by gaseous and aqueous chlorine dioxide and water washing and its growth at 7°C. *J. Food Prot.* 64:1730-1738.
- _____. S. S. NIELSEN, P. E. NELSON. 2002. A comparison of methods for recovery of chlorine dioxide-injured *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.* 19:201-210.
- INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGIST AND FOOD DRUG ADMINISTRATION. 2001. Analysis and evaluation of preventive control measures for the control and reduction/elimination of microbial hazards on fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 2:1-2004.
- JACXSSENS, L., F. DEVLIEGHIERE, P. FALCATO and J. DEBEVERE. 1999. Behavior of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas* spp. on fresh-cut produce packaged under equilibrium modified atmosphere. *J. Food Prot.* 62: 1128-1135.
- KAKIOMENOU, K., C. TASSOU and G.-J. NYCHAS. 1998. Survival of *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* on salad vegetables. *World J. of Microb and Biotech.* 14:383-387.
- LANG, M., L. J. HARRIS and L. R. BEUCHAT. 2004. Survival and recovery of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* on lettuce and parsley as affected by method of inoculation, time between inoculation and analysis, and treatment with chlorinated water. *J. Food Prot.* 67:1092-1103.

- LI, Y., R. E. BRACKETT, J. CHEN and L. R. BEUCHAT. 2002. Mild heat treatment of lettuce enhances growth of *Listeria monocytogenes* during subsequent storage at 5°C or 15°C. *J. of Appl. Microb.* 92:269-275.
- LIN, C. M., S. S. MOON, M. P. DOYLE and K. H. MCWATTERS. 2002. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis, and *Listeria monocytogenes* on lettuce by hydrogen peroxide and lactic acid and by hydrogen peroxide with mild heat. *J. Food Prot.* 65:1215-1220.
- LUNA J., J. DAGA y P. MARTÍNEZ. 2008. Determinación Microbiológica de *Listeria* sp. en Lechuga y Espinaca. En: *Memorias Red Alfa Lagrotech 2005 - 2008. Encuentro Final.* Pág 265-271. Bogotá. Dupligráficas. ISBN 978-958-716-144-1. 393 pág.
- NASCIMENTO, M. S., N. SILVA, M. P. L. M. CATANOZI and K. C. SILVA. 2003. Research note effects of different disinfection treatments on the natural microbiota of lettuce. *J. Food Prot.* 66:1697-1700.
- OH, S. W., G. I. DANCER and D. H. KANG. 2005. Research Note: Efficacy of aerosolized peroxyacetic acid as a sanitizer of lettuce leaves. *J. Food Prot.* 68:1743-1747.
- RODGERS, S. L., J. N. CASH, S. MOHAMMAD, E. T. RYSER. 2004. A comparison of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in solution and apples, lettuce, strawberries, and cantaloupe. *J. Food Prot.* 67:721-731.
- SIGMA. 2008. Nisin from *Streptococcus lactis*, 2,5 %. Comunicación Personal.
- SY, K. V., M. B. MURRAY, M. D. HARRISON and L. R. BEUCHAT. 2005. Evaluation of gaseous chlorine dioxide as a sanitizer for killing *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and yeasts and molds on fresh and fresh-cut produce. *J. Food Prot.* 68:1176-1187.
- UKUKU, D. O., and L. A. SHELEF. 1998. Sensitivity of six strains of *Listeria monocytogenes* to nisin. *J. Food Prot.* 60:867-869.
- YILDIRIM S., W. LIN, A. D. HITCHINS, L. JAYKUS, E. ALTERMANN, T. KLAENHAMMER and S. KATHARIOU. 2004. Epidemic clone I-specific genetic markers in strains of *Listeria monocytogenes* serotype 4b from foods. *App. Environ. Microbiol.* 70: 4158-4164.
- ZHANG, S. and J. M. FARBER. 1996. The effect of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. *Food Microbi.* 13:311-321.