

EFFECTO DEL ÁCIDO CLORHÍDRICO Y ÁCIDO LÁCTICO SOBRE EL DESARROLLO DE TREINTA CEPAS DE *LISTERIA* spp. AISLADAS DE ALIMENTOS

Effect of Chlorhidric and Lactic Acid on the Development of Thirty Strains of *Listeria* spp. from Foods Stuffs

Karina Pellicer^{*1}, Gabriela del Hoyo, María Silvina Brocardo,
Virginia Aliverti, Florencia Aliverti y Julio Copes

^{*}Laboratorio de Microbiología de Alimentos. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. 60 y 118 CC 296 CP
1900. La Plata, Argentina

Correo-E: pellicerk@fcv.unlp.edu.ar

Recibido: 20/10/08 - Aprobado: 03/07/09

RESUMEN

Listeria monocytogenes es el agente causal de Listeriosis en humanos, siendo los alimentos “listos para comer” una de las principales vías de transmisión. El pH óptimo de desarrollo de *L. monocytogenes* es entre 6 y 9, tolerando hasta pH 4,4. El objetivo fue estudiar el comportamiento *in vitro* de 30 cepas de *Listeria* spp. aisladas de alimentos, modificando el pH por adición de HCl y ácido láctico. Se utilizó caldo cerebro corazón al que se le agregó HCl ó ácido láctico hasta pH de 4,8, 5,2, 5,5, 5,8 y 6. Con HCl a pH 4,8 se desarrolló una cepa de *L. monocytogenes* tipo 1, a pH 5,5 se desarrollaron el 50% de las cepas. Con ácido láctico, a pH 4,8 no hubo desarrollo. A pH 5,8 y 6 con ambos ácidos se desarrollaron la mayoría de las *Listerias* analizadas. El ácido láctico presentó mayor efecto inhibitor que HCl.

(Palabras clave: Alimentos procesados, ácido clorhídrico, ácido láctico, *Listeria monocytogenes*, “listos para comer”, preservadores)

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is the causative agent of listeriosis in humans, being the “ready to eat” foods one of the main transmission ways. The optimum pH for *L. monocytogenes* to grow was between 6 and 9, tolerating up to pH 4.4. The objective was to study the *in vitro* behavior of thirty strains *Listeria* spp. isolated from foods, modifying the pH adding HCl and lactic acid. Brain heart broth added with HCl or lactic acid until pH 4.8, 5.2, 5.5, 5.8 and 6 was used. With HCl at pH 4.8 one strain of *L. monocytogenes* type 1 developed. At pH 5.5, 50% of the strains developed. With lactic acid, at pH 4.8 growth was not observed. At pH 5.8 and 6 with both acids grew most of the *Listeria* analyzed. The lactic acid had a greater inhibitory effect than HCl.

(Key words: Processed food, hydrochloric acid, lactic acid, *Listeria monocytogenes*, “ready to eat”, preservers)

¹ A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

INTRODUCCIÓN

La bacteria *Listeria monocytogenes* es el agente etiológico de Listeriosis en humanos, con manifestaciones clínicas que incluyen meningoencefalitis, septicemia, neumonía, endocarditis, abscesos localizados, lesiones cutáneas, conjuntivitis, etc. Una de las vías más importantes de transmisión son los alimentos, siendo los denominados “listos para comer” los que presentan el mayor riesgo, ya que a éstos no se les aplica ningún proceso tecnológico antes de ser consumido (Copes et al., 2000 a,b). Los productos “listos para comer” de mayor riesgo son aquellos que se almacenan a temperatura ambiente por períodos de tiempo prolongados (Pellicer et al., 2002 a, b). *Listeria spp.* ha sido encontrada en una gran variedad de carnes y productos cárnicos, inclusive los embutidos (Jonson et al., 1990; Pellicer et al., 2002b).

En los alimentos que han sufrido algún proceso térmico como el de cocción o el de pasteurización, la contaminación se produce por fallas en la higiene del establecimiento y malas prácticas de manufactura posterior al tratamiento térmico (Pitt et al., 1999).

Listeria monocytogenes se desarrolla con valores óptimos de pH entre 6 y 9, tolerando medio ácido hasta pH 4,4 (Giannuzzi y Zaritzky, 1996; Conner et al., 1986), y en un rango de temperaturas de 1 a 45°C (Buchanan y Phillips, 1990).

En muchos alimentos un preservador importante es la acidez o el pH bajo, sólo o en combinación con otros factores (Sorrells et al., 1989).

Se ha reportado que los ácidos acético, cítrico y láctico sin disociar inhiben el crecimiento de *L. monocytogenes* y se utilizan a menudo para extender la vida útil de los alimentos (Barbuddhe et al., 1999). La acción inhibitoria depende no sólo del pH sino también del tipo de ácido, la constante de disociación del mismo y su concentración (Buchanan et al., 1993; Ita y Hutkins, 1991).

Los ácidos orgánicos son más inhibitorios que los inorgánicos debido a su naturaleza lipolítica (Ahamad y Marth, 1990a; Galdeiro et al., 1997). Dicha acción inhibitoria es más efectiva a temperatura cercana a los 35°C (Ahamad y Marth, 1990b; Sorrells et al., 1989). La toxicidad de los ácidos orgánicos es causada por la porción de la molécula sin disociar y está relacionada con la permeabilidad de la membrana celular bacteriana, el anión de los ácidos

orgánicos es metabolizado en el interior celular con liberación de protones que producen la acidificación del contenido celular causando inhibición y muerte (Giannuzzi y Zaritzky, 1996; Ahamad y Marth 1990a).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el comportamiento *in vitro* de 30 cepas de *Listeria spp.* aisladas de alimentos, modificando el pH por adición de HCl y ácido láctico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 30 cepas de *Listeria spp.* aisladas de alimentos, entre ellas, dos cepas de *L. welshimeri*, cuatro de *L. seeligeri*, tres de *L. monocytogenes* tipo 4, ocho de *L. monocytogenes* tipo 1, y trece de *L. innocua* (Copes et al., 2000 b; Pellicer et al., 2002 a, b).

Se prepararon 150 tubos de 1 mL de caldo Cerebro Corazón (BHI Oxoid) cada uno, con agregado de 1% de glucosa al que se le ajustó el pH con HCl (Anedra), a los efectos de obtener cinco series de treinta tubos cada una con los siguientes valores de pH: 4,8, 5,2, 5,5, 5,8 y 6. Por otra parte, se prepararon 150 tubos de 1 mL de caldo cerebro corazón (BHI Oxoid) cada uno, con agregado de 1% de glucosa al que se le ajustó el pH con ácido láctico (Anedra), a los efectos de obtener cinco series de 30 tubos, cada una con los siguientes valores de pH: 4,8, 5,2, 5,5, 5,8 y 6.

Se sembró una colonia de cada una de las treinta cepas crecidas previamente en medio de agar Palcam (Oxoid), en cada uno de los tubos con los diferentes valores de pH (4,8, 5,2, 5,5, 5,8 y 6), ajustado con HCl y ácido láctico respectivamente, incubándose a 37°C por 24 h.

De cada tubo con desarrollo de *Listeria* se sembró una asada en medio de agar Palcam y se incubó a 28°C por 48 hs para confirmar el desarrollo de *Listeria spp.* teniendo en cuenta las características de la colonia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se presentan los resultados obtenidos en BHI al que se le modificó el pH con el agregado de ácidos. Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con Sorrells et al. (1989) quienes obtuvieron desarrollo de *L. monocytogenes* en medio

Tabla 1. Comportamiento de *Listeria spp.* en medio de cultivo con agregado de HCl y ácido láctico

| CEPA | RANGO PH | | 4,8 | | 5,2 | | 5,5 | | 5,8 | | 6 | |
|--|----------|---|-----|---------------|-----|---------------|-----|---------------|-----|---------------|-----|---------------|
| | ÁCIDO | | HCl | Ácido láctico | HCl | Ácido láctico | HCl | Ácido láctico | HCl | Ácido láctico | HCl | Ácido láctico |
| <i>L. welshimeri</i> | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| <i>L. welshimeri</i> | - | - | - | - | + | + | - | + | + | + | + | + |
| <i>L. seeligeri</i> | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| <i>L. seeligeri</i> | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| <i>L. seeligeri</i> | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| <i>L. seeligeri</i> | - | - | - | - | - | + | - | - | + | + | + | - |
| <i>L. monocytogenes</i> 4b ATCC 19115 | - | - | + | - | - | + | - | + | - | + | - | + |
| <i>L. monocytogenes</i> tipo 1 355/98 (H 85) | - | - | + | - | - | + | + | + | - | + | + | - |
| <i>L. monocytogenes</i> tipo 4 | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| <i>L. monocytogenes</i> tipo 4 | - | - | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + |
| <i>L. monocytogenes</i> tipo 1 | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | ++ |
| <i>L. monocytogenes</i> tipo 1 | - | - | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + |
| <i>L. monocytogenes</i> tipo 1 | - | - | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| <i>L. monocytogenes</i> tipo 1 | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| <i>L. monocytogenes</i> tipo 1 | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| <i>L. monocytogenes</i> tipo 1 | - | - | - | - | + | + | + | + | + | - | - | - |
| <i>L. monocytogenes</i> tipo 1 | + | - | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + |
| <i>L. innocua</i> ATCC 33091 | + | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + |
| <i>L. innocua</i> | - | - | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + |
| <i>L. innocua</i> | - | - | - | - | - | + | + | + | - | + | + | + |
| <i>L. innocua</i> | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| <i>L. innocua</i> | - | - | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| <i>L. innocua</i> | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| <i>L. innocua</i> | - | - | - | - | + | - | + | - | + | + | + | + |
| <i>L. innocua</i> | - | - | - | - | + | + | + | + | - | + | - | - |
| <i>L. innocua</i> | - | - | + | - | + | + | + | + | - | + | + | + |
| <i>L. innocua</i> | - | - | - | - | + | + | + | + | - | + | + | + |
| <i>L. innocua</i> | - | - | - | - | + | + | + | + | - | + | + | + |
| <i>L. innocua</i> | + | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| <i>L. innocua</i> | - | - | - | - | - | + | - | + | + | - | + | + |

'+' indica desarrollo bacteriano; '-' no desarrollo

de cultivo con HCl hasta pH 4,4. Según lo indicado por otros autores, por debajo de pH 5,5 la velocidad de inactivación se relaciona linealmente con el pH en BHI con agregado de HCl (Buchanan *et al.*, 1993).

A pH 4,8 con ácido láctico no se desarrolló ninguno de los microorganismos estudiados, en coincidencia con Ariyapitipun *et al.* (2000) y Sorrells *et al.* (1989), quienes indican que el ácido láctico es efectivo para inhibir el desarrollo de *L. monocytogenes* cuando alcanza valores de pH de 4,5 a 4,6; a diferencia de Sorrells *et al.* (1989) quienes obtuvieron desarrollo en medio de cultivo con ácido láctico hasta pH 4,4. A pH 5,5 y superior, se observó desarrollo de *L. monocytogenes*, coincidiendo con Giannuzzi y

Zaritzky (1996) quienes observaron efecto bactericida a pH menor o igual a 4 con ácido láctico en caldo tripticosa soya.

Por lo expuesto, resultó más efectivo el uso de ácido láctico para prevenir el desarrollo de *L. monocytogenes* en alimentos cuando el pH alcanza valores por debajo de 5; mientras que con HCl con el mismo valor de pH, se observó desarrollo de algunas cepas de *Listeria* aisladas de alimentos.

Los resultados obtenidos resultan de gran utilidad y aplicación para extender la vida útil y asegurar la inocuidad de los alimentos, principalmente de productos fermentados ya que presentan, en su mayoría, ácido láctico.

REFERENCIAS

- Ahamad, N.; Marth, E. 1990a. Behavior of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21, and 35°C in tryptose broth acidified with acetic, citric, or lactic acid. *J. Food Prot.*, 52:688-695.
- Ahamad, N.; Marth, E. 1990b. Acid-Injury of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 53:26-29.
- Ariyapitipun, T.; Mustapha, A.; Clarke, A.D. 2000. Inhibition of *Listeria monocytogenes* Scott A on vacuum-packaged raw beef treated with polylactic acid, lactic acid and nisin. *J. Food Prot.*, 63:131-136.
- Barbuddhe, S.B.; Malik, S.V.S.; Bhilegaonkar, K.N. 1999. Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by commercial nisin and lactic acid in raw buffalo meat mince. *J. Food Sci. Tech.*, 36:4:320-324.
- Buchanan, R.L.; Philips, J.G. 1990. Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration, and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 53:370-376.
- Buchanan, R.L.; Golden, M.H.; Whiting, R.C. 1993. Differentiation of the effects of pH and lactic or acetic acid concentration on the kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation. *J. Food Prot.*, 56:474-478, 484.
- Conner, D.E.; Brackett, R.E.; Beuchat, L.R. 1986. Effect of temperature, sodium chloride and pH on growth of *Listeria monocytogenes* in cabbage juice. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52:59-63.
- Copes, J.; Pellicer, K.; Malvestiti, L.; Stanchi, N. 2000a. Sobrevivencia en tablas de cocina de madera y plástico inoculadas experimentalmente con *Listeria monocytogenes*. *Analecta Vet.*, 20:47-50.
- Copes, J.; Pellicer, K.; Echeverria, G.; Stanchi, N.; Martínez, C.; Leardini, N. 2000b. Investigación de *Listeria monocytogenes* en quesos de pasta blanda. *Rev. Argent. Microbiol.*, 32: 49-52.
- Galdeiro, E.; D'Isanto, M.; Aliberti, F. 1997. Effect of saline concentration, pH and growth temperature on the invasive capacity of *Listeria monocytogenes*. *Res. Microbiol.*, 148, 305-313.
- Gianuzzi, L.; Zaritzky, N. 1996. Effect of ascorbic acid in comparison to citric and lactic acid on *Listeria monocytogenes* inhibition at refrigeration temperatures. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, 29:1-8.
- Ita, P.S.; Hutkins, R.W. 1991. Intracellular pH and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A in tryptic soy broth containing acetic, lactic, citric and hydrochloric acids. *J. Food Prot.*, 54:15-19.
- Jonson, J.L.; Doyle, M.P.; Cassens, R.G. 1990. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria spp.* in meat and meat products. A review. *J. Food Protect.*, 53:81-91.
- Pellicer, K.; Copes, J.; Malvestiti, L.; Echeverria, G.; Nosetto, E.; Stanchi, N. 2002a. Ready to eat salads an analysis of health and safety conditions. *Analecta Vet.*, 22:4-6
- Pellicer, K.; Copes, J.; Malvestiti, L.; Lanfranchi, M.; Stanchi, N.; Echeverria, G.; Nosetto, E. 2002b. Aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes* y *Listeria spp.* en embutidos secos obtenidos en mercados de la ciudad de La Plata, Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.*, 34:219-221.
- Pitt, W.M.; Harden, T.J.; Hull, R.R. 1999. *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products. *Aust. J. Dairy Tech.*, 54:49-65.
- Sorrells, K.M.; Engil, D.; Hatfield, J.R. 1989. Effect of pH, Acidulant, Time and Temperature on the Growth and Survival of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 52:571-573.