

EFICIENCIA DE TRATAMIENTOS DE DESCONTAMINACIÓN EN LA REMOCIÓN DE CÉLULAS DE *Listeria monocytogenes* ADHERIDAS AL EPICARPIO DE AGUACATE (*Persea americana* var. Hass)

Bañuelos-Gutiérrez, J. A.¹; Hernández-Padilla, D. B.¹; Martínez-Chávez, L.¹; Martínez-González, N. E.¹; Pérez-Montaño, J. A.¹; Rodríguez-García, Ma. O.¹; González-Aguilar, D. G.²; Cabrera-Díaz, E.²

¹ Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara. Blvd. Marcelino García Barragán #1421, Guadalajara, Jalisco, C.P. 44430. ²Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara Camino Ramón Padilla Sánchez #2100, Zapopan, Jalisco, C.P. 45110. Correo-e: elisa.cabrera@academicos.udg.mx

Resumen

México es el principal productor de aguacate a nivel mundial. Se han presentado retiros o alertas de importación de guacamole y productos procesados de aguacate refrigerados o congelados por contaminación con *Listeria monocytogenes*. Una medida de control, es la aplicación de tratamientos de descontaminación para reducir su población. El propósito de este estudio fue evaluar la eficiencia de tratamientos de descontaminación en la remoción de células de *L. monocytogenes* adheridas al epicarpio de aguacate. Un total de 204 aguacates verdes se inocularon con una mezcla de seis cepas de *L. monocytogenes* resistentes a rifampicina. Después de tres días de almacenamiento a 25 °C, los frutos se sometieron a tratamientos de descontaminación con hipoclorito de sodio a 200 ppm, ácido láctico al 2%, agua caliente a 80 °C y una combinación de los dos primeros para reducir poblaciones de *L. monocytogenes* débil (CDA) y fuertemente adheridas (CFA) al epicarpio de aguacate. El tratamiento con hipoclorito de sodio resultó el menos eficiente al reducir 1.0 log (UFC por aguacate) de CDA y 0.8 y 0.7 log (UFC por aguacate) de células totales (CT) y CFA respectivamente. El tratamiento con agua caliente fue el más eficiente al reducir 4.6, 3.7 y 4.4 log (UFC por aguacate) para CT, CDA y CFA. La eficiencia en la remoción de células de *L. monocytogenes* se ve afectada por el tipo de adhesión celular y el tratamiento utilizado.

Palabras clave adicionales: Patógeno, fruto, adhesión, contaminantes.

EFFICIENCY OF DECONTAMINATION TREATMENTS IN THE REMOVAL OF *Listeria monocytogenes* CELLS ADHERED TO AVOCADO EPICARP (*Persea americana* VAR. HASS)

Abstract

Mexico is the main producer of avocado worldwide. Products such guacamole and processed avocado pulp refrigerated or frozen, have been involved in recalls or import alerts due to the presence of *Listeria monocytogenes*. One control measures is the application of decontamination treatments to reduce its population. The purpose of this study was to evaluate the efficiency of decontamination treatments in the removal of *L. monocytogenes* cells attached to the avocado epicarp. A total of 204 green avocados were inoculated with a mixture of six strains of *L. monocytogenes* resistant to rifampicin. After three days storage at 25 °C, the fruits were decontamination with 200 ppm sodium hypochlorite, 2% lactic acid, hot water at 80 °C and a combination of the first two for reduce populations of *L. monocytogenes* Loosely attached cells (LA) and strongly attached cells (SA) to avocado epicarp. Sodium hypochlorite treatment was the least efficient by reducing 1.0 log (CFU per avocado) of LA and 0.8 and 0.7 log (CFU per avocado) of total cells (TC) and SA respectively. Hot water treatment was the most efficient by reducing 4.6, 3.7 and 4.4 log (CFU per avocado) for TC, LA and SA. The efficiency in the

removal of *L. monocytogenes* cells is affected by the type of cell adhesion and the treatment used.

Additional keywords: Pathogen, fruit, adhesion, contamination.

Introducción

México es el mayor productor y exportador de aguacate a nivel mundial. Durante el 2015 se exportó el fruto a 34 países, con una derrama económica de 1,920 millones de dólares. (SIAP 2016). Además del fruto en fresco, se comercializan subproductos como pulpa, mitades de aguacate y guacamole; se estima que la exportación de este último es de 170,000t al año (USDA 2016).

El guacamole se ha asociado con brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). En el lapso de 1973-2008, se han reportado 35 brotes en Estados Unidos por consumo de salsas y guacamole. Los principales patógenos causantes de brotes son Norovirus (24%), serotipos de *Salmonella* diferentes a *S. Typhi* (19%) y *Shigella* (7%) (Kendall et al., 2013). Si bien no se han presentado brotes asociados a *Listeria monocytogenes*, existen retiros o alertas de importación de guacamole y productos procesados de aguacate refrigerados o congelados por estar contaminados con esta bacteria, con implicaciones económicas (FSN 2017; FDA 2017). *Listeria monocytogenes* podría llegar a la pulpa del aguacate por diversos mecanismos. Una posibilidad es que bacterias adheridas al epicarpio pudieran ser transferidas por contaminación cruzada en el momento de la obtención de la pulpa. Una vez que la bacteria llega a la pulpa, ésta puede ser un buen sustrato para la bacteria (Iturriaga et al., 2002).

Las medidas de control en productos frescos están enfocadas a prevenir, reducir o eliminar la contaminación microbiana del fruto. La descontaminación, es decir, “la reducción del número de microorganismos presentes en el medio ambiente, por medio de agentes químicos y/o métodos físicos, a un nivel que no comprometa la inocuidad o la aptitud del alimento” (Comisión del Codex Alimentarius 2009), es una de las medidas aplicadas para reducir patógenos en frutas y hortalizas. Entre los tratamientos físicos se encuentra la utilización de agua caliente (Garmendia y Vero 2006), mientras que los métodos químicos involucran el uso de sustancias oxidantes como lo es el hipoclorito de sodio y ácidos orgánicos entre otros (Ramírez et al., 2009).

La eficiencia de los tratamientos de descontaminación depende de una serie de factores inherentes al tipo de agente, al microorganismo y el fruto. En particular en este último caso, la hidrofobicidad y rugosidad del aguacate pueden conferir protección a la bacteria y permitir su adhesión a la superficie (Wang et al., 2009). Se conoce que durante el almacenamiento de aguacates a 25 °C, *L. monocytogenes* puede adherirse con fuerza e inclusive formar

biopelículas en el epicarpio, situación que puede influir en la efectividad de los tratamientos de descontaminación (Martínez, 2015). Por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar la eficiencia de tratamientos de descontaminación comúnmente empleados en productos hortofrutícolas en la remoción de células de *L. monocytogenes* adheridas al epicarpio de aguacate.

Materiales y Métodos

Selección de los frutos

Se emplearon 276 aguacates (*Persea americana* var. Hass) verdes de calidad Extra A (peso entre 211 y 265 g) cepillados, sin lavar y sin encerar. Todos los frutos fueron proporcionados por una planta de empaque de Ciudad Guzmán Jalisco y transportados en refrigeración y mantenidos a temperatura ambiente (°C) por 24 h, previo a los experimentos en el Laboratorio de Microbiología e Inocuidad de Alimentos, del Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías.

Cultivos bacterianos y preparación del inóculo

Se utilizaron seis cepas de *L. monocytogenes* resistentes a rifampicina aisladas de un brote, productos hortofrutícolas y ambiente de producción de aguacates. Las cepas fueron sembradas en tres ocasiones consecutivas en caldo soya tripticaseína adicionado con 0.6% de extracto de levadura (CSTEL) a 35 °C, por 18, 4 y 18 h respectivamente. A los cultivos se les realizaron dos lavados por centrifugación a 6000 rpm a 5 °C por 10 min y se resuspendieron en solución salina fisiológica estéril.

Inoculación de aguacates

A partir de las células lavadas de cada cepa de *L. monocytogenes*, se tomaron volúmenes iguales para realizar una mezcla en una bolsa estéril, obteniendo una concentración promedio de $9.8 \pm 0.2 \log$ (UFC mL⁻¹). Doscientos cuatro aguacates se inocularon individualmente con la mezcla de cepas por inmersión durante 1 min, posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente por 1 h.

Evaluación de la firmeza de aguacates

Se midió la firmeza de 18 aguacates verdes sin inocular (tiempo 0) y a frutos no inoculados después de tres días de almacenamiento a 25 °C. Las mediciones se realizaron con un

penetrómetro en dos zonas de la parte media del fruto, donde previamente se retiró el epicarpio con un pelador de cocina para dejar expuesta la pulpa.

Almacenamiento de los aguacates

Los aguacates inoculados se colocaron en charolas con un total de 37 aguacates y se almacenaron en una cámara de temperatura y humedad controlada a 25 °C por tres días, para promover la adhesión de la bacteria y la madurez del aguacate. La temperatura y la humedad relativa fueron registradas a lo largo del tiempo de almacenamiento.

Aplicación de tratamientos de descontaminación para remover células de *L. monocytogenes* adherida al epicarpio de aguacate

Después de tres días de almacenamiento, grupos de cinco aguacates se sometieron a los siguientes tratamientos: A) Sin tratamiento, B) Lavados con agua destilada por aspersion a 250 mL 15 s⁻¹, C) Lavados con agua destilada por aspersion a 250 mL 15 s⁻¹, posteriormente se asperjó 250 mL 15 s⁻¹ con una solución de hipoclorito de sodio a una concentración de 200 ppm (pH 6.5), D) Lavados con agua destilada por aspersion a 250 mL 15 s⁻¹, posteriormente se colocó por inmersión en un baño con una solución de ácido láctico 2% (p:v) a 55 °C 1 min⁻¹, E) Lavados con agua destilada por aspersion a 250 mL 15 s⁻¹, posteriormente se colocó por inmersión en un baño con agua destilada a 80 °C 1 min⁻¹, F) Lavados con agua destilada por aspersion a 250 mL 15 min⁻¹, posteriormente se asperjó 250 mL 15 s⁻¹ con una solución de hipoclorito de sodio a una concentración de 200 ppm (pH 6.5) seguido por una inmersión en un baño con una solución de ácido láctico 2% (p:v) a 55 °C 1 min⁻¹.

Toma de muestra y análisis microbiológico

Posterior a la aplicación del tratamiento de descontaminación, se realizó el recuento de células de *L. monocytogenes* débilmente adheridas (CDA) y células fuertemente adheridas (CFA) al epicarpio del fruto. Para desprender las CDA, cada aguacate se colocó en una bolsa de plástico estéril con 100 mL de agua peptonada “bufferada” (BPW) para frutos tratados individualmente con ácido láctico y agua caliente, o en 100 mL de caldo neutralizante Dey/Engley (D/E) para los aguacates tratados con hipoclorito de sodio, posteriormente se realizó un enjuague y agitación manual por 20 s. En el tratamiento combinado con hipoclorito de sodio y ácido láctico, después de la aplicación del primer agente, se agregaron 100 mL de caldo D/E, para neutralizar el efecto del desinfectante, con agitación manual por 20 s. Finalmente, después de aplicar el ácido láctico se agregaron 100 mL de BPW, por enjuague y

agitación manual durante 20 s para obtener CDA. Para desprender las CFA, el mismo aguacate se transfirió a otra bolsa estéril con 100 mL de BPW, posteriormente se colocó en baño de ultrasonido por 1 min a 300 W a 40 kHz.

El recuento de CDA y CFA de *L. monocytogenes* se realizó a partir de los líquidos de enjuague mediante la técnica de extensión en superficie y/o por filtración de membrana en placas con agar soya tripticaseína adicionado con 0.6% de extracto de levadura y Rifampicina (ASTEL+R). Después de incubar las placas de ASTEL+R a 35 °C por 48 h se realizó el recuento de colonias típicas de *L. monocytogenes* y se seleccionaron colonias para realizar pruebas de fermentación con carbohidratos (xilosa, ramnosa y manitol) para su confirmación.

Análisis estadístico

Se efectuaron dos réplicas con cinco repeticiones para cada tratamiento. Se obtuvieron recuentos para CDA, CFA y CT (células totales). Los recuentos se expresaron en escala logarítmica [\log (UFC/aguacate)] y se determinó la reducción logarítmica después de aplicar los tratamientos. Se analizaron los datos mediante un análisis de varianza (ANOVA) para medir el efecto de los tratamientos de descontaminación y el tipo de adhesión. Cuando se detectaron diferencias significativas, se realizó la prueba de LSD para separación de medias en el programa Statgraphics Centurion versión XVI.I.

Resultados y Discusión

Posterior a la inoculación del epicarpio y con una hora de secado a temperatura ambiente (tiempo 0), los aguacates presentaron una concentración de 7.7 ± 0.9 , 7.6 ± 0.9 y 6.3 ± 0.6 log (UFC por aguacate) para CT, CDA y CFA respectivamente. Después de tres días de almacenamiento a 24.93 ± 0.15 °C con una Humedad Relativa de 70.7 hasta 100% y previo a que se efectuaran los tratamientos de descontaminación, la concentración promedio de la bacteria en el epicarpio del fruto fue de 4.9 ± 0.9 , 3.8 ± 1.2 y 4.7 ± 0.9 log (UFC por aguacate) para CT, CDA y CFA respectivamente. La población total de *L. monocytogenes* disminuyó en el aguacate durante los tres días de almacenamiento, sin embargo, a diferencia del tiempo 0 la concentración de CFA en el epicarpio fue mayor que el de CDA. Lo anterior puede deberse a que durante el almacenamiento, el fruto madura y se tienen condiciones que propician la adhesión y probable formación de biopelículas.

Los frutos verdes previo a su almacenamiento presentaron una firmeza promedio de >20 y hasta 10.9 kg cm^{-1} . En el tercer día de almacenamiento los aguacates presentaron epicarpio oscuro y firmeza promedio 3.2 kg cm^{-1} , indicativo del proceso de maduración, cabe señalar

que hubo tres aguacates que presentaron hasta $>20 \text{ kg cm}^{-1}$. Las diferencias observadas en el cambio de coloración y firmeza de algunos frutos pudieron deberse a la variabilidad en la madurez inicial de los frutos, los cuales fueron seleccionados en el empaque de origen.

Cuando se aplicaron los tratamientos de descontaminación para la remoción de células de *L. monocytogenes* del epicarpio del aguacate, se presentaron reducciones variables dependiendo del agente utilizado (Cuadro 1).

Cuadro 1. Efecto de la aplicación de tratamientos de descontaminación en la remoción de células de *Listeria monocytogenes* adheridas al epicarpio de aguacate 'Hass'.

Tratamiento ^Z	Logaritmo de reducción en (UFC por aguacate) ^Y (n=10)					
	CT ^W		CDA		CFA	
	Media	Intervalo	Media	Intervalo	Media	Intervalo
Lavado	0.5 a ^W	0.2-0.8	0.3 a	0.0-0.6	0.5 a	0.2-0.8
Hipoclorito de sodio	0.8 ab	0.5-1.1	1.0 b	0.7-1.3	0.7 ab	0.3-1.0
Ácido Láctico	1.3 a	1.0-1.7	1.9 c	1.5-2.2	1.2 b	0.9-1.5
Agua Caliente	4.6 c	4.3-5.0	3.7 d	3.3-4.0	4.4 c	4.1-4.8
Hipoclorito de sodio+	0.9 ab	0.6-1.3	1.4 bc	1.1-1.8	0.9 ab	0.6-1.2
Ácido Láctico						

^ZLavado, Lavados con agua destilada por aspersión a $250 \text{ mL } 15 \text{ s}^{-1}$; Hipoclorito de sodio, Lavados con agua destilada por aspersión a $250 \text{ mL } 15 \text{ s}^{-1}$, posteriormente se asperjó $250 \text{ mL } 15 \text{ s}^{-1}$ con una solución de hipoclorito de sodio a una concentración de 200 ppm (pH 6.5); Ácido Láctico, Lavados con agua destilada por aspersión a $250 \text{ mL } 15 \text{ s}^{-1}$, posteriormente se colocó por inmersión en un baño con una solución ácido láctico 2% (p:v) a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ por un min; Agua Caliente, Lavados con agua destilada por aspersión a $250 \text{ mL } 15 \text{ s}^{-1}$, posteriormente se colocó por inmersión en un baño con agua destilada a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ por un min; Hipoclorito de sodio + Ácido Láctico, Lavados con agua destilada por aspersión a $250 \text{ mL } 15 \text{ s}^{-1}$, posteriormente se asperjó $250 \text{ mL } 15 \text{ s}^{-1}$ con una solución de hipoclorito de sodio a una concentración de 200 ppm (pH 6.5) seguido por inmersión en un baño con una solución ácido láctico 2% (p:v) a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ por un min.

^YPara cada tratamiento, el logaritmo de reducción fue estimado restando al promedio del recuento del grupo sin tratamiento [\log (UFC por aguacate)] el recuento obtenido en el aguacate después de aplicar el tratamiento [\log (UFC por aguacate)]. Los promedios del grupo sin tratamiento fueron 4.9, 3.8, 4.7 \log (UFC por aguacate) para CT, CDA y CFA respectivamente. La concentración promedio de la mezcla de cepas de *Listeria monocytogenes* fue de 9.8 \log (UFC mL^{-1})

^XCT, Células Totales se define como el logaritmo de la suma de UFC por aguacate de CDA más UFC por aguacate de CFA; CDA, Células Débilmente Adheridas; CFA, Células Fuertemente Adheridas

^WPara comparar entre la misma columna, se emplean las letras A hasta D. Los promedios con la misma letra no son estadísticamente significativos ($P>0.05$).

El agua caliente fue el tratamiento más eficiente en la remoción de prácticamente toda la población de CT, CDA y CFA de *L. monocytogenes* con reducciones de 4.6, 3.7 y 4.4 \log (UFC por aguacate) respectivamente. Mientras tanto, el hipoclorito de sodio fue el tratamiento que eliminó en menor medida la población de la bacteria, reduciendo 1.0 \log (UFC por aguacate)

para CDA y 0.8 y 0.7 log (UFC por aguacate) de CT y CFA respectivamente, dichas reducciones fueron similares ($P>0.05$) a las observadas en los frutos lavados solo con agua. Con el propósito de aumentar la eficacia de los tratamientos a base de agentes químicos se combinó el tratamiento con hipoclorito de sodio seguido de la aplicación de ácido láctico. Sin embargo, las reducciones fueron de 0.9, 1.4, 0.9 log (UFC por aguacate) para células CT, CDA y CFA respectivamente, lo cual no resultó significativo ($P>0.05$) en la reducción de CDA en comparación con la aplicación individual del agente.

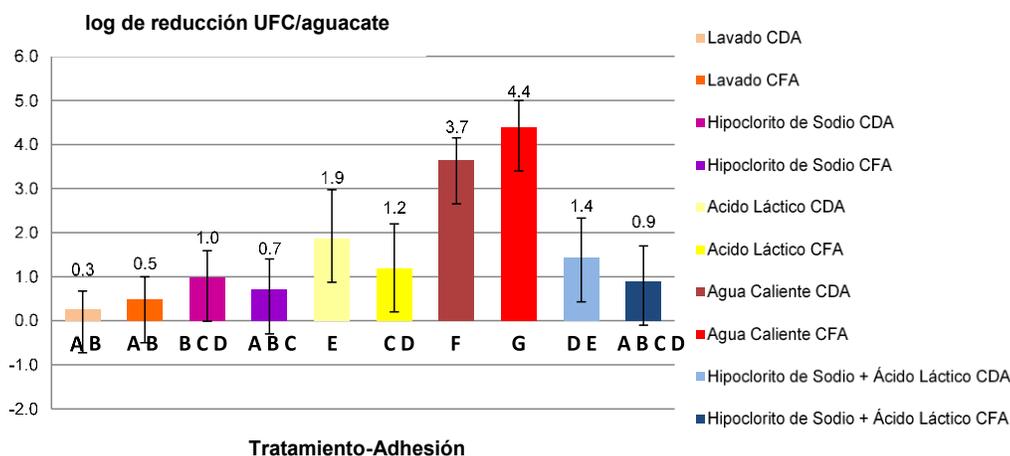
El tipo de adhesión de *L. monocytogenes* al epicarpio del aguacate influye en la eficiencia de los tratamientos de descontaminación (Figura 1). Mayores reducciones de CDA se observaron en los tratamientos con hipoclorito de sodio, ácido láctico y la combinación de ambos. Sin embargo, solo se presentaron diferencias significativas ($P<0.05$) entre CDA y CFA para el tratamiento con ácido láctico. Si se considera que las CFA están adheridas directamente a la superficie del fruto, protegidas en las irregularidades del fruto y que las CDA pueden estar en la parte más superficial con limitada interacción con el epicarpio, entonces los agentes desinfectantes entrarían en contacto primero con las CDA lo que propicia su mayor reducción ($P<0.05$).

Por otro lado, al emplear agua caliente, las reducciones fueron mayores para los dos tipos de células ($P<0.05$), además fue el único tratamiento capaz de remover la mayor concentración de CFA ($P<0.05$). Lo anterior pudo deberse a que el fruto se sumergió por completo en el agua y pudo tener un mejor contacto la superficie del fruto con el agente, con el consecuente aumento de la temperatura. Sin embargo, para su empleo a nivel industrial es necesario determinar si el calor afecta las características organolépticas del fruto.

La eficiencia de los tratamientos de descontaminación en la remoción de células de *L. monocytogenes* se ve afectada por el tipo de adhesión celular y el tratamiento utilizado. El tratamiento con agua caliente a 80°C por 1 min fue el más eficiente en la remoción de células débil y fuertemente adheridas al epicarpio de aguacate.

Agradecimientos

A la Empresa Agro González, S.P.R. de R.L. (Aguacate Zapotlán) por la donación de los frutos de aguacate utilizados en esta investigación.



Para comparar entre cada barra, se emplean las letras A hasta G. Los promedios de cada barra con la misma letra no son estadísticamente significativos ($P > 0.05$).

Figura 1. Comparación de la eficiencia de tratamientos de descontaminación para la remoción de células de *Listeria monocytogenes* débil y fuertemente adheridas al epicarpio de aguacate 'Hass'.

Literatura Citada

- Comisión del Codex Alimentarius. 2009. Higiene de los alimentos. [En línea]. Roma. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/012/a1552s/A1552S00.pdf> [Consultado el 9 de enero 2017].
- FDA. United States Food and Drug Administration. 2017. Import Alert #21-12. Detention without physical examination of frozen and refrigerated guacamole and processed avocado products. [En línea]. Silver Spring, Disponible en: http://www.accessdata.fda.gov/cms_ia/importalert_65.html [Consultado el 8 de enero de 2017].
- FSN. Food Safety News. 2017. Multiple brands of fresh guacamole recalled for *Listeria*. [En línea]. Seattle, Disponible en: http://www.foodsafetynews.com/2017/03/multiple-brands-of-fresh-guacamole-recalled-for-listeria/#.WVKosPk1_IV [Consultado el 27 de junio de 2017].
- Garmendia, G. y S. Vero. 2006. Métodos para la desinfección de frutas y hortalizas. *Horticultura* 197:18-27.
- Iturriaga M., S. Arvizu, and E. Escartin. 2002. Behavior of *Listeria monocytogenes* in avocado pulp and processed guacamole. *Journal of Food Protection* 65:1745–1749.
- Kendall, M., R. Mody, B. Mahon, M. Doyle, K. Herman, and R. Tauxe. 2013. Emergence of salsa and guacamole as frequent vehicles of foodborne disease outbreaks in the United States, 1973–2008. *Foodborne Pathogens and Disease* 10:316-322.
- Martínez, L. 2015. Efecto del almacenamiento en la adhesión, colonización y transcripción de genes de respuesta al estrés, virulencia y formación de biopelículas de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* sp. en el epicarpio de aguacate (*Persea americana* var. Hass). Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias con orientación en Microbiología Alimentaria. Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de la Ciénega. Guadalajara, México.
- Ramírez, M.O., A. López, y E. Palou. 2009. Eficacia de diversos agentes desinfectantes en la sanitización de hortalizas frescas. *Temas Selectos de Ingeniería en Alimentos* 3:5-14.
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2016. Atlas Agroalimentario 2016. México. 1° Edición. pp. 22-23.
- USDA. Foreign Agricultural Service United States Department of Agriculture. 2016. Greater Volume of Mexican Avocados to the U.S. Market USDA. [En línea]. Washington, Disponible en: https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Avocado%20Annual_Mexico%20City_Mexico_11-30-2016.pdf [Accesado el 20 de abril de 2017].
- Wang, H., H. Feng, W. Liang, Y. Luo, and V. Malyarchuk. 2009. Effect of surface roughness on retention and removal of *Escherichia coli* O157:H7 on surfaces of selected fruits. *Journal of Food Science* 74:8-15.