

Efecto del pH/tiempo sobre *Listeria monocytogenes* en presencia de hoja de lima y congelación

Ramos Osnaya, B.¹ y Minor Pérez, H.¹

¹División de Ingeniería Química y Bioquímica, Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, Av. Tecnológico s/n Esq. Av. Carlos Hank González (Av. Central), Col. Valle de Anáhuac, C. P. 55210, Ecatepec de Morelos, Estado de México, México, E-mail: hminorperez@yahoo.com.mx

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*, hoja de lima, pH, actividad antimicrobiana

Introducción

Algunos estudios han reportado que la hoja de lima dulce (*Citrus limmeta*) (HLD) tiene un aporte importante de antioxidantes [1,2]. Sin embargo, generalmente se desecha y sólo se emplea para consumo humano el fruto. Los subproductos como la hoja de la lima, la cáscara, el bagazo y el hueso de la planta de lima dulce, pueden ser una buena fuente de compuestos bioactivos, e.g. sustancias con capacidad antioxidante o actividad antimicrobiana. Algunos autores [2] mencionan que la hoja de lima dulce tiene mayor concentración de polifenoles en comparación con la cáscara del mismo fruto. Además, se ha reportado [1] actividad bactericida de algunos compuestos fenólicos contra *Escherichia coli* y en general sobre microorganismos coliformes psicrótrofos. *Listeria monocytogenes* es un microorganismo patógeno de importancia en los alimentos. Tiene características biológicas que dificultan su destrucción e.g. no forma esporas, pero es capaz de sobrevivir durante largos períodos de tiempo en diferentes medios. Es un microorganismo psicrótrofo, que puede provocar la contaminación de alimentos en cualquier etapa de la cadena alimentaria. Durante el almacenaje en frío no se logra inactivar a la bacteria [3] y dependiendo de las condiciones de almacenamiento sólo sufre daño subletal. En este estudio se evaluó el efecto del pH y el tiempo de almacenamiento en presencia de la hoja de lima dulce (*Citrus limmeta*) y condiciones de congelación (-5°C), para el control de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994.

Metodología

Preparación de la hoja de lima dulce (*Citrus limmeta*)

La HLD (hoja de lima dulce, *Citrus limmeta*) se secó durante 48 h a una temperatura de 40°C en un horno de charolas (Felisa FE-294AD, México). La muestra se molió en una licuadora convencional hasta obtener una harina homogénea y se tamizó hasta obtener un tamaño de partícula de 0.42 mm.

Listeria monocytogenes NCTC 11994 y condiciones de crecimiento

Listeria monocytogenes NCTC 11994 pertenece a la colección microbiana de la Universidad de Murcia, España. Durante este estudio la cepa se conservó en crioviales a -80°C. Ésta se sembró por estría cruzada en medio TSAYE (Tryptic Soy Broth, Bioxon, México) suplementado con 0.6% de extracto de levadura (w/v Bioxon, México) y 1.5% de agar bacteriológico (w/v Bioxon, México). La muestra se incubó a 37°C por 24 h. Una colonia de la bacteria control se utilizó para inocular en caldo TSBYE (Tryptic Soy Broth, Bioxon, México) con 0.6% de extracto de levadura (w/v Bioxon, México) y se incubó a 37°C por 12 h. Se tomaron 100 µL de este pre-cultivo para ser inoculados en 5 mL de TSBYE y la muestra se incubó durante 24 h 37°C para obtener el cultivo de estudio.

Análisis microbiológico

El cultivo de *Listeria monocytogenes* se diluyó en agua peptonada y se vació un volumen de 100 µL en tubos Eppendorf con 900 µL de una solución amortiguadora de citrato-fosfato a los diferentes valores de pH. Previamente se adicionaron en cada tratamiento 0.05 g de la HLD. Todos los tratamientos se mantuvieron en agitación a 350 rpm en un vortex (Labnet, EUA) durante 1 min. Los tratamientos se mantuvieron en condiciones de congelación (-5°C). Las cuentas microbianas se realizaron a los tiempos de 0 h y 24 h. Se empleó la técnica de gota [4] para cuantificar las poblaciones microbianas.

Análisis estadístico

Los resultados se sometieron a una ANOVA y una comparación múltiple de medias con la prueba de Duncan, utilizando el paquete estadístico SAS System, Windows™ Versión 6.12, USA.

Resultados y discusión

El análisis estadístico (Tablas 1,2 y 3) muestra que los modelos lineales propuestos tuvieron un efecto significativo ($P < 0.0001$) sobre la variable respuesta (Log UFC/mL de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994). Los modelos describen la influencia de los factores investigados en forma independiente: tiempo (A) y el pH (B), y el efecto de las interacciones (A*B). Se observó un efecto significativo del tiempo (A), pH (B) y la interacción A*B en los tratamientos evaluados. El coeficiente de determinación para los modelo lineal indica que el 1.09% de la variación total en la respuesta no puede ser explicado por los modelos desarrollados. Los valores F_0 para los parámetros de cada modelo fueron útiles para explicar el grado de significancia de los efectos de las variables fijas y sus interacciones (Tabla 2). A la temperatura de en presencia de la HLD el parámetro que tuvo un mayor efecto significativo fue el pH (A). El segundo parámetro más significativo fue el tiempo (B). Esto significa que los cambios de pH a la temperatura de -5°C , tienen el mayor efecto sobre la inhibición de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 (Figura 1).

Este comportamiento puede ser explicado debido a que conforme la cepa control es expuesta durante mayor tiempo a la temperatura de -5°C , posiblemente se tenga daño de estructuras celulares en su membrana, lo cual provoca inactivación por pH ácido.

Tabla 1. ANOVA para el efecto del pH y el tiempo (h) sobre el control de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 en presencia de hoja de lima dulce (*Citrus limmeta*) y condiciones de congelación (-5°C)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr > f
Modelo	15	133.284	8.885	76.67	0.0001
Error	16	1.854	8.115		
Total	31	135.138			
R-Square= 0.9862					

*Los valores de "Prob > F" menores que 0.050 indican que los parámetros evaluados son significativos

Tabla 2. ANOVA para el efecto del factores: pH y tiempo (h) sobre el control de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 en presencia de hoja de lima dulce (*Citrus limmeta*) y condiciones de congelación (-5°C).

Fuente de variación	Valor de F	Pr > F
Temperatura: -5°C		
A-pH	54.92	0.0001
B-Tiempo (h)	45.613	0.0001
A*B – pH*Tiempo	6.159	0.0001

Conclusiones

En las condiciones experimentales evaluadas se encontró un efecto significativo sobre la inhibición de *Listeria monocytogenes* en valores de pH de 3,4 y 5 en presencia de HLD y condiciones de congelación (-5°C). La mayor inhibición microbiana se observó a valores de pH 3 y 4.

Tabla 3. Prueba de Duncan para la comparación del efecto del pH y el tiempo (h) sobre *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 en presencia de hoja de lima dulce (*Citrus limmeta*) y condiciones de congelación (-5°C)

pH	Temperatura: -5°C		Tiempo (h)	Temperatura: -5°C	
	Promedio (Log UFC/mL)	Prueba de Duncan*		Promedio (Log UFC/mL)	Prueba de Duncan*
Control-agua	7.703	A	0	7.7308	A
8.0	7.447	A B	24	5.3430	B
7	7.362	A B			
9	7.034	B C			
6	6.808	C			
5	6.248	D			
4	6.358	D			
3	4.725	E			

*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes con una α 0.05

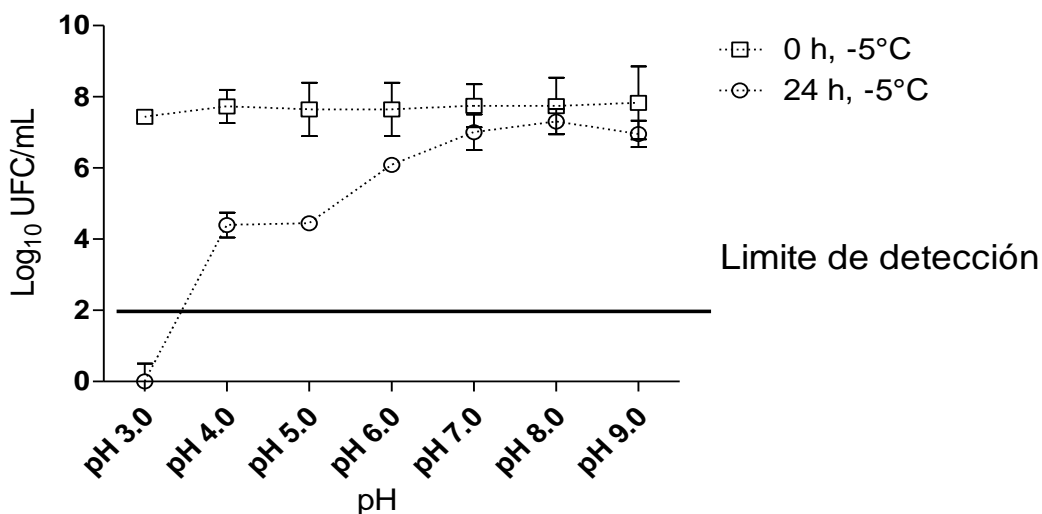


Figura 1. Efecto combinado del pH y el tiempo (h) sobre el control de *Listeria monocytogenes* en presencia de la hoja de lima dulce (*Citrus limmeta*) y condiciones de congelación (-5°C).

Referencias

- Hall, C.I. 2001. Sources of natural antioxidants: oilseeds, nuts, cereals, legume, animal products and microbial sources. En: Antioxidants in food. Practical Applications. Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (Editores). CRC Woodhead Publishing Limited. Cambridge, Inglaterra.
- Ordoñez-Gómez, E.S., Reátegui-Díaz, D., Villanueva-Tiburcio, J.E. 2018. Polifenoles totales y capacidad antioxidante en cáscara y hojas de doce cítricos. Scientia Agropecuaria, 9(1):113-121
- ICMSF. 1996. Microorganismos de los alimentos: características de los patógenos microbianos. Editorial Acribia, Zaragoza (España), pp 165-174
- Miles, AA; Misra, SS, Irwin, J.O. (1938 Nov). The estimation of the bactericidal power of the blood. *The Journal of hygiene*, 38 (6): 732–49.