

Análisis de la calidad microbiológica y potencial presencia de *Listeria monocytogenes* en pulpas de guanábana (*Annona muricata*), mango (*Mangifera indica*) y maracuyá (*Passiflora edulis*) costarricenses

Juliana von Breymann, Carolina Chaves, María Laura Arias

Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales y Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

RESUMEN. El objetivo del presente trabajo fue el determinar algunos de los indicadores de vida útil, higiene y condiciones del proceso y almacenamiento, la asociación entre la pulpa de la fruta y microorganismos patógenos de pulpas de guanábana, mango y maracuyá provenientes de las principales cadenas de supermercados de la gran área metropolitana (GAM) de San José, Costa Rica, así como examinar la potencial presencia de *Listeria monocytogenes* en ellas. Se analizó un total de 60 muestras, a las cuales se les determinó su pH así como su recuento total aerobio, recuento de mohos y levaduras, bacterias lácticas, número más probable de coliformes totales y fecales y la presencia o ausencia de *Listeria monocytogenes* en 25 g del producto. Los rangos de pH encontrados en las pulpas variaron entre 3,1 y 3,9 y los recuentos obtenidos fueron relativamente bajos a excepción de los provenientes de una industria. Ninguna de las muestras analizadas presentó coliformes totales ni fecales. Se confirmó la presencia de *Listeria monocytogenes* en tres muestras, todas provenientes de la industria C. Los bajos recuentos obtenidos pueden deberse a la adición de sustancias preservantes pero también porque son productos pasteurizados; la falta de estos dos elementos puede significar la presencia de bacterias tan peligrosas como *Listeria monocytogenes*.

Palabras clave: Pulpa de frutas, deterioro, *Listeria monocytogenes*

SUMMARY. Analysis of the microbiological quality and potential presence of *Listeria monocytogenes* in custard apple (*Annona muricata*), mango (*Mangifera indica*) and passion fruit (*Passiflora edulis*) pulps from Costa Rica. The objective of this work was to determine some of the indicators associated to shelf life, hygiene, process and storage conditions for some of custard apple, mango and passion fruit pulps distributed by the main supermarket chains of the Metropolitan Area of San José, Costa Rica, as well as to examine the potential presence of *Listeria monocytogenes* in them. Sixty fruit pulp samples were analyzed. Tests included pH determination, total aerobic plate count, yeasts and mold count, lactic bacteria count, total and fecal most probable number and the presence/absence of *Listeria monocytogenes* in 25 g of the product. Fruit pulp's pH ranged between 3,1 and 3,9, and the microbiological counts obtained were relatively low except for one industry. None of the samples analyzed presented total or fecal coliforms. The presence of *Listeria monocytogenes* was confirmed in three samples, all of them coming from industry C. Low microbiological counts obtained may be due to the addition of preserving substances and to the pasteurization of some of the products; lack of these two elements may allow the presence of dangerous bacteria such as *Listeria monocytogenes*.

Key words: Fruit pulps, spoilage, *Listeria monocytogenes*

INTRODUCCIÓN

Las pulpas de frutas se definen como productos que se obtienen por la desintegración de la parte comestible de las frutas, y que usualmente se conservan por medio de pasteurización (1) con el fin de remover 100% de los patógenos y un 90% de los microorganismos de deterioro asociados (2).

Los factores intrínsecos que definen las poblaciones de deterioro de estos productos incluyen su contenido nutricional, rico en carbohidratos, su actividad de agua (aw) y su bajo pH (2). El deterioro de estos productos es originado, principalmente, por mohos, levaduras y bacterias lácticas, incluyendo *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Acetobacter*, los cuales logran resistir el bajo aw de estos productos, su pH y alto

contenido de azúcares (3).

Por otro lado, la asociación entre pulpas de fruta y microorganismos patógenos ha sido ampliamente respaldada, no obstante, existen pocos estudios relacionados con el crecimiento y sobrevivencia de *Listeria monocytogenes* en frutas ácidas (4,5) y este tipo de producto. (6).

Esta bacteria ha representado un reto para las industrias productoras de alimentos, debido a su capacidad de sobrevivir y multiplicarse en temperaturas de refrigeración (7). Al mismo tiempo, se ha descrito que es probable que también sobreviva a algunos procesos térmicos y sanitarios utilizados en producción de alimentos si se encuentra en altas concentraciones (8).

La principal fuente de infección por esta bacteria es el consumo de alimentos contaminados durante su fabricación o producción (9). Las pulpas de fruta pueden representar un riesgo potencial para adquirir dicha bacteria, principalmente porque ésta ha demostrado una gran tolerancia hacia los ambientes de carácter ácido (10).

Las pulpas de fruta representan una actividad de creciente importancia en la economía de Costa Rica, donde en los últimos cinco años se ha notado un elevado aumento en la exportación de este tipo de productos hacia diversos mercados incluyendo Estados Unidos y Europa. Este aumento señala que existe a nivel internacional una demanda creciente para estos alimentos (11).

De la misma manera, a nivel de mercado interno también existe una importante demanda de estos productos por parte de hoteles, restaurantes y supermercados (11) y de hogares de ancianos, centros médicos y centros educativos, entre otros (1).

Dada la creciente importancia y demanda de las pulpas de frutas, es importante determinar si las principales empresas productoras costarricenses están cumpliendo con el control de calidad necesario que garantice la excelencia, higiene e inocuidad de estos productos. El objetivo del presente trabajo fue el determinar algunos de los indicadores de vida útil, higiene y condiciones de proceso y almacenamiento de algunas de las pulpas de fruta provenientes de las principales cadenas de supermercados de la gran área metropolitana (GAM) de San José, Costa Rica, así como examinar la potencial presencia de *Listeria monocytogenes* en ellas, como indicador de riesgo para la Salud Pública.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Origen de las muestras: se analizaron un total de 60 muestras de pulpas de frutas, incluyendo 20 de mango, 20 de guanábana y 20 de maracuyá, de distintos lotes cada una y provenientes de 4 compañías productoras (A,B, C y D) Las muestras se obtuvieron de los principales supermercados de la Gran Área Metropolitana. Estos productos se comercializan, independientemente, refrigerados o a temperatura ambiente. El análisis de las mismas se realizó en el Laboratorio de Alimentos y Aguas de la Facultad de Microbiología, localizado en la Universidad de Costa Rica. Las muestras fueron transportadas en frío al laboratorio, para evitar el crecimiento de los microorganismos y la contaminación de las mismas. El análisis de éstas se realizó dentro de las 24 horas posteriores a su compra.

Determinación del pH. Los valores de pH se determinaron con el uso del medidor de pH marca Sartorius modelo Pb-11. La medición se realizó directamente del recipiente en que venía el producto.

Análisis microbiológico. Para los análisis microbiológicos, se procedió a pesar 25 gramos de cada pulpa, los cuales se mezclaron por medio del Stomacher con 225 mL de agua peptonada estéril (APE) al 0.1%,. Posteriormente, se procedió a realizar diluciones decimales hasta 10^{-5} utilizando tubos de 9 mL de APE. Para todos los análisis se usó la metodología recomendada por Pouch (12).

Recuento total aerobio mesófilo. A partir de las diluciones realizadas se tomaron 0.1mL y se inocularon en placas de agar estándar + TTC. Se incubaron a 35°C durante 48 horas y se contaron las placas que obtuvieran entre 25-250 unidades formadoras de colonias (UFC).

NMP de coliformes totales y fecales. Se tomó 1 mL de cada dilución y se inoculó en series de 3 tubos con caldo lactosado simple (CLS). Se incubaron a 35°C durante 48 horas. Posteriormente, los tubos que presentaron gas en la campana de Durham, fueron repicados a caldo bilis verde brillante (CBVB) y caldo EC. Se incubaron durante 48 horas a 35°C y 24 horas a 44.5°C para analizar los coliformes totales y fecales respectivamente. Se tomaron como positivos todos los tubos que presentaron gas en la campana de Durham.

Para interpretar los resultados se utilizaron las tablas para NMP de serie de tres tubos.

Recuento de bacterias lácticas. Se tomaron 0.1mL de cada dilución y se inocularon en placas con

agar MRS. Se incubaron en jarra con candela a temperatura ambiente durante 5 días. Posteriormente se contaron las placas que obtuvieron entre 25-250 UFC.

Recuento de mohos y levaduras. Se tomaron 0.1 mL de cada dilución y se inocularon por separado en placas con agar papa dextrosa acidificado. Se incubaron durante 5 días a temperatura ambiente. Posteriormente, se contaron las placas que obtuvieron entre 3-30 UFC.

Determinación de la presencia o ausencia de *Listeria monocytogenes* en las pulpas de frutas (13). Se utilizó la metodología recomendada por FDA de los Estados Unidos para el aislamiento de la bacteria en los alimentos. Se pesaron 25 gramos de la pulpa y se mezclaron con 225 mL de caldo listeria sin antibióticos. Se incubó a 35°C durante 4 horas. Posteriormente se agregaron los antibióticos (cicloheximida, acriflavina y ácido nalidíxico) y se incubó a 35°C durante 48 horas. Después se rayó en agar Oxford y se incubó a 35°C por 48 horas. La confirmación de las colonias típicas se realizó por medio de una tinción de Gram; la luz de Henry; prueba de oxidasa; prueba de catalasa; prueba de Camp; movilidad a 25°C y utilización de xilosa y ramnosa. Como control positivo se utilizó la cepa ATCC 19116.

RESULTADOS

Los rangos de pH encontrados en las pulpas fueron entre 3,1-3,9 para las pulpas de guanábana; entre 3,5-3,9 para las pulpas de mango y entre 3,1-3,3 para las pulpas de maracuyá.

Los recuentos obtenidos a partir de las diferentes muestras se presentan en la Tabla 1. Es importante destacar que ninguna de las muestras analizadas presentó coliformes totales ni fecales.

De las 60 muestras analizadas 3 dieron un resultado

positivo en forma confirmatoria para *Listeria monocytogenes*; todas estas muestras provenían de la misma industria productora (C).

DISCUSIÓN

La contaminación microbiana de vegetales y frutas está determinada, en gran parte, por la variedad de contaminantes con los que tienen contacto durante la cosecha, el corte y el transporte (8,14). Su procesamiento también aporta nuevas fuentes de contaminación que incluyen operaciones mecánicas como cortar, rebanar y el uso de agua para su lavado. El agua es un excelente medio para distribuir microorganismos en las plantas procesadoras y el hecho de utilizar cloro para lavar las frutas o vegetales no garantiza que queden libres de microorganismos, ya que estos se adhieren fuertemente y pueden formar biofilms (14).

En las pulpas de frutas, el pH ácido y la cantidad de azúcares presentes hacen que se seleccione el crecimiento de mohos, levaduras y bacterias ácido lácticas (3).

Los recuentos de indicadores realizados a las pulpas fueron bajos en las marcas A, B y D en gran parte debido a la adición de sustancias preservantes, tal y como lo menciona su etiquetado, pero también porque son productos pasteurizados, con lo que se retrasa el crecimiento de bacterias y mohos. Cabe destacar que el encontrar inicialmente números bajos de bacterias, no significa que éste no puede aumentar hasta cantidades críticas durante el almacenamiento del producto (15), tal y como lo describen Silveira y colaboradores en un estudio realizado en jugos de frutas pasteurizados y mantenidos en refrigeración (16).

Tradicionalmente el proceso térmico utilizado en las industrias alimentarias tiene como propósito brindar seguridad a los alimentos en el sentido de que elimina microorganismos patógenos (16).

TABLA 1. Recuento total aerobio mesófilo, recuento de bacterias lácticas y de mohos y levaduras obtenido a partir de las pulpas de fruta analizadas.

Tipo de pulpa	Recuento Total Aerobio Mesófilo			Recuento de Bacterias Lácticas			Recuento de Mohos y Levaduras		
	<10 UFC/g n (%)	10-10 ⁴ UFC/g n(%)	>10 ⁴ UFC/g n (%)	<10 UFC/g n (%)	10-10 ⁴ UFC/g n (%)	>10 ⁴ UFC/g n (%)	<10 UFC/g n (%)	10-10 ⁴ UFC/g n (%)	>10 ⁴ UFC/g n (%)
Guanábana	14(70)	3 (15)	3 (15)	14(70)	1 (5)	5 (25)	16 (80)	2 (10)	2 (10)
Mango	15 (75)	3 (15)	2 (10)	17(85)	1 (5)	2 (10)	12 (60)	7 (35)	1 (5)
Maracuyá	14(70)	5 (25)	1 (5)	18(90)	2 (10)	---	8 (40)	7 (35)	5 (25)

La inocuidad de los alimentos muchas veces se aumenta mediante la adición de antimicrobianos que previenen o retrasan el deterioro de los alimentos por causa de microorganismos (17). Tal es el caso de las marcas A, B y D que incluyen el benzoato de sodio como preservante. La marca B también hace uso del ácido cítrico y el sorbato de potasio. Por su parte, la marca C no incluye ningún tipo de preservante. El benzoato de sodio es ampliamente utilizado como preservante de bebidas frutales ya que presenta ventajas como actuar frente a un amplio rango de microorganismos y no ser volátil. Es efectivo contra distintas bacterias y levaduras (18). El ácido cítrico es considerado como un antimicrobiano seguro de usar en la industria alimentaria y está aprobado por la FDA aparte de que tiene actividad antimicrobiana contra un gran número de patógenos (19) y el sorbato de potasio funciona por su forma disociada y puede ser utilizado con eficacia en alimentos con pH ácidos (18). El aislamiento de coliformes totales y fecales en las muestras de pulpa de frutas evaluadas fue negativo. A pesar de lo anterior, se tiene que considerar que la ausencia de dichas bacterias en las muestras analizadas no garantiza la ausencia de patógenos entéricos en el alimento. Esta ausencia se puede explicar por el hecho de que al ser los coliformes bacterias Gram negativas no logran sobrevivir al pH ácido de las pulpas analizadas. (2).

Las bacterias ácido lácticas, junto con los mohos y levaduras, son predominantes en la descomposición de frutas y sus subproductos (3,20) y el hecho de encontrar recuentos altos de estos en productos pasteurizados, implica contaminación post-proceso así como el desarrollo de características organolépticas no deseables durante su almacenaje (16). De las 60 muestras analizadas, solamente una tuvo recuentos de bacterias lácticas superiores a 10^7 y dos muestras presentaron recuentos de mohos y levaduras superiores a este valor. De nuevo, este bajo porcentaje de positividad puede aducirse al uso de antimicrobianos y a la pasteurización de la mayoría de productos.

Listeria monocytogenes fue aislada a partir de tres muestras de pulpa, todas de la marca C.

El control de esta bacteria a nivel de industria alimentaria es bastante complejo debido a que está ampliamente distribuida en la naturaleza, por lo que es muy difícil evitar la contaminación cruzada en los múltiples pasos que se dan desde la cosecha hasta el consumo del producto (8). Además, es sumamente di-

fícil mantener las plantas procesadoras libres de este patógeno debido a su capacidad de formar biofilms y adherirse fuertemente a lugares de difícil acceso a la limpieza (21,22).

Distintas investigaciones demuestran la habilidad de este patógeno para sobrevivir y desarrollarse en pulpas de frutas (23). *Listeria monocytogenes* logra tolerar bien una baja actividad de agua (24), el contenido de carbohidratos de las pulpas de frutas es un adecuado sustrato para su crecimiento (4), aparte de que esta bacteria es considerada como una bacteria ácido tolerante. Esta bacteria logra resistir a pH bajos debido a que la presencia de descarboxilasas de glutamato, que le permiten mantener un pH intracelular adecuado a pesar de que externamente haya un pH bajo (10). Por otro lado, esta respuesta de tolerancia al pH ácido llevada a cabo por *Listeria monocytogenes* le confiere una mayor resistencia a las altas temperaturas, tal y como ha sido demostrado en diversas investigaciones (25).

La temperatura de refrigeración es una estrategia ampliamente utilizada por la industria alimentaria para controlar el crecimiento bacteriano en alimentos listos para el consumo. No obstante, diversos estudios han demostrado la sobrevivencia de *Listeria monocytogenes* en temperaturas de refrigeración (4,5). Por este motivo, las temperaturas de refrigeración son consideradas como una fuente selectiva y efectiva de enriquecimiento para la bacteria porque se elimina en gran parte la competencia bacteriana (26).

El hecho de que *Listeria monocytogenes* tenga la capacidad de desarrollarse en condiciones que son inapropiadas para otros patógenos, y que logre crecer bien en temperaturas de refrigeración, la hacen una bacteria importante para la salud pública (22).

Lo anterior ha llevado a que la FDA, así como la Unión Europea, hayan establecido una cero tolerancia a *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo (5), aspecto a considerar en la exportación de pulpas costarricenses a los mercados descritos.

En los últimos años se ha visto, a nivel mundial, un gran aumento en la tendencia a preferir productos naturales, libres de preservantes químicos y procesamiento térmico. (19). Sin embargo, tal y como se demuestra en esta investigación, la falta de estos dos elementos puede significar la presencia de bacterias tan peligrosas como *Listeria monocytogenes* y la disminución en la vida útil del producto. Esta situación plantea la necesidad de que productos que no reciben

ningún tipo de tratamiento para eliminar patógenos y microorganismos de deterioro sean más estrictamente vigilados y controlados, con el fin de ofrecer un producto de buena calidad e inocuo al consumidor.

REFERENCIAS

- Ivett, D & Mesh T. Estudio de factibilidad para el establecimiento de una planta procesadora de pulpa de frutas tropicales en Costa Rica. Tesis de grado. Universidad EARTH, Guácimo: Costa Rica, 2004.
- Ray B & Bhunia A. Fundamental food microbiology. Florida: CRC Press. 2008.
- García Y, Osío I & Escalante M. Calidad microbiológica de pulpa de lechosa de las variedades Cartagena, Colombia y Maradol. Rev Fac Agron. 2004. 21 (1): 336-342.
- Penteado A & Leitao M. Growth of *Listeria monocytogenes* in melon, watermelon and papaya pulps. Int J Food Microb, 2004. 92: 89-94.
- Leverentz B, Conway W, Janisiewicz W, Abadias M, Kurtzman C & Camp M. Biocontrol of the Food Borne Pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* Serovar *Poona* on fresh-cut apples with naturally occurring bacterial and yeast antagonists. App Environm Microb. 2006. 72: 1135-1140.
- Flessa S, Lusk D & Harris L. Survival of *Listeria monocytogenes* on fresh and frozen strawberries. Int J Food Microb. 2005. 101: 255-262.
- Abarzúa F & Solari V. *Listeria monocytogenes*: a propósito de un brote en particular. Rev Chil Obstet Ginecol. 2009. 74 (1): 1-3
- Vitas A Aguado V & García I. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). Int J Food Microb. 2004. 90: 349-356.
- Rossi M, Paiva A, Tornese M, Chianelli S & Tronosco A. Brotes de infección por *Listeria monocytogenes*: una revisión de las vías que llevan a su aparición. Rev Chil Infect. 2008. 25: 328-335.
- Cotter P. & Hill C. Surviving the acid test: responses of Gram positive bacteria to low pH. Microb Molec Biol Rev. 2003. 67: 429-453.
- Escobedo A. Sondeo rápido de mercados: pulpas de frutas. CATIE. Turrialba 2010.
- Pouch F & Ito K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington: American Public Health Association. 2001.
- Hitchins A. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. FDA Bacteriological Analytical Manual. 2011.
- Doyle M & Erickson M. Closing the door on the fecal coliform assay. Microbe. 2006. 1: 162-163
- Crépet A, Albert I, Dervin C & Carlin F. Estimation of microbial contamination of food from prevalence and concentration data: application to *Listeria monocytogenes* in fresh vegetables. Appl Environm Microb. 2007. 73: 250-258.
- Silveira, A. Aguayo, E & Artés, F. (2012). Shelf-life and quality attributes infresh-cut Galia melón combined with fruit juices. Food Sci Technol.
- López A, Barreto J, Palou E & San Martín F. *Aspergillus flavus* growth response to cinnamon extract and sodium benzoate mixtures. Food Control. 2007. 18: 1358-1362.
- Walker M & Phillips C. The effect of preservatives on *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Propionibacterium cyclohexanicum* in fruit juice. Food Control. 2008. 19, 974-981.
- Mosqueda J, Raybaudi R & Martín O. Microbiological shelf life and sensory evaluation of fruit juices treated by high-intensity pulsed electric fields and antimicrobials. Food and Bioproducts Processing. 2012. 90: 205-214.
- Nyanga L, Nout M, Gadaga T, Theelen B, Boekhout T & Zwietering M. Yeasts and lactic acid bacteria microbiota from masau (*Ziziphus mauritiana*) fruits and their fermented fruit pulp in Zimbabwe. Int J Food Microbiol. 2007. 120: 159-166.
- Aureli P, Carlo G, Caroli D, Marchiaro G, Novara O, Leone L & Salmaso S. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. New Engl J Med. 2000. 342: 1236-1241.
- Comisión Codex Alimentarius: CAG/GL 61 2007. Directrices sobre la aplicación de principios generales de higiene de los alimentos para el control de *Listeria monocytogenes* en los alimentos Anexo I. 2009.
- Uchima C, De Castro M, Gallo C, Rezende A, Benato E & Penteado A. Incidence and growth of *Listeria monocytogenes* in persimmon (*Diospyros kaki*) fruit. Int J Food Microbiol. 2008. 126: 235-239.
- Rossi M, Paiva A, Tornese M, Chianelli S, & Tronosco A. Brotes de infección por *Listeria monocytogenes*: una revisión de las vías que llevan a su aparición. Rev Chil Infect. 2008. 25: 328-335.
- Caggia C, Ombretta G, Restuccia C & Randazzo C. Growth of acid adapted *Listeria monocytogenes* in orange juice and in minimally processed orange slices. Food Control. 2009. 20: 59-66.
- Bayles D & Wilkinson B. Osmoprotectants and cryoprotectants for *Listeria monocytogenes*. The Society of Applied Microbiology. 2000. 30: 23-27.

Recibido: 02-01-2012

Aceptado: 28-02-2013