

EFECTO BIOCIDA DEL TRATAMIENTO CON ÁCIDO Y SALES ORGÁNICAS SOBRE SUPERFICIES INERTES Y PRODUCTOS A BASE DE POLLO CONTAMINADOS CON *SALMONELLA ENTERICA* SUBESPECIE *ENTERICA* Y *ESCHERICHIA COLI* O157:H7



RESUMEN

Salmonella spp. y *Escherichia coli* O157:H7 son patógenos transmitidos por alimentos causantes de enfermedades diarreicas en el humano. Los animales son reservorios naturales de estos microorganismos y pueden contaminar los productos cárnicos en el proceso de faenado. La contaminación de los alimentos también puede darse por prácticas higiénicas inadecuadas, contaminación cruzada, contaminación de superficies, mesadas y equipamientos, entre otros. La industria alimentaria busca nuevas alternativas para la eliminación de estos patógenos, siendo la decontaminación de las superficies uno de sus grandes retos. El objetivo de este trabajo fue valorar la eficacia de ácidos y sales orgánicas como agentes biocidas frente a *Salmonella enterica* subespecie *enterica* y *Escherichia coli* O157:H7 sobre superficies inertes y en productos a base de pollo. Las piezas de la picadora de carne fueron utilizadas sin inocular e inoculadas por inmersión con 8 log UFC/ml y 3 log UFC/ml de *Salmonella enterica* subespecie *enterica*

Aquili, Virginia; González, Agustina; Subils, Tomás; Casabonne, Cecilia
 Grupo Microbiología de los Alimentos - Área Bacteriología - Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas - Universidad Nacional de Rosario. Argentina.
 ccasabonne@fbioy.unr.edu.ar

y *Escherichia coli* O157:H7 y tratadas con ácido láctico (A.L) al 3%, 4% y 5%. Asimismo, se contaminó la masa destinada a la producción de “Formas de pollo” con 8 log UFC/ml y 3 log UFC/ml de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* y *Escherichia coli* O157:H7 y se evaluó el tratamiento con lactato de sodio (L.S) y lactato-diacetato de sodio al 2,5% y 3% (L.D.S). El tratamiento de las superficies y maquinarias con A.L. redujo significativamente ($p < 0.05$) los niveles de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* y *Escherichia coli* O157:H7 en las condiciones de ensayo empleadas, mientras que no se evidenció reducción significativa ($p > 0.05$) en los recuentos posterior al tratamiento con las sales orgánicas (L.S y L.D.S). El efecto biocida del A.L. observado sobre *Salmonella enterica* subespecie *enterica* y *Escherichia coli* O157:H7 proponen a este compuesto como una posible intervención en la industria cárnica avícola.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos son un importante problema de salud pública en todo el mundo. La contaminación de los alimentos se puede dar por prácticas higiénicas inadecuadas, contaminaciones cruzadas, contaminación de las superficies de contacto y equipos, materias primas y otras causas ambientales. Los animales destinados a la producción de alimentos son los principales reservorios de muchos

patógenos, como *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia coli* productora de toxinas Shiga (STEC) y *Listeria monocytogenes* (Harris y col., 2006; Echeverry y col., 2010). El potencial zoonótico de los patógenos y su capacidad para producir toxinas que causan enfermedades o incluso la muerte son suficientes para reconocer la gravedad de la situación. Los patógenos transmitidos por los alimentos causan millones de casos de enfermedades esporádicas y complicaciones crónicas, así como brotes a nivel mundial (Heredia y Santos, 2018).

La industria de la carne se ha centrado en encontrar técnicas de descontaminación para reducir o eliminar bacterias patógenas y aquellas que pueden causar el deterioro de sus productos (Chevise y col., 2019). La descontaminación de superficies y equipos también representa un gran desafío, debido a la resistencia de las bacterias a los desinfectantes tradicionales y a la característica tóxica o corrosiva de muchos de ellos. La utilización de ácidos y sales orgánicas ha despertado gran interés como alternativa de biocontrol. Los ácidos acético, cítrico y láctico son algunos de los compuestos más estudiados. Diversos estudios han mostrado la efectividad del ácido láctico para reducir o inhibir el crecimiento de patógenos bacterianos en productos cárnicos (Chevise y col., 2019; Stasiewicz y col., 2011; Echeverry y col., 2009; Harris y col., 2006).

El objetivo de este trabajo fue valorar la eficacia de ácidos y sales orgánicas como agentes biocidas frente a la *Salmonella enterica* subespecie *enterica* y *Escherichia coli* O157:H7 sobre superficies inertes y en productos a base de pollo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivos microbianos

Se utilizaron cepas de *Salmonella entérica* subespecie *entérica* ATCC 13076 (*S. enterica*) y *Escherichia coli* (*E. coli*) O157:H7 ATCC 43875.

Diseño experimental del efecto biocida del ácido láctico sobre superficies inertes

Las muestras de alimentos empleadas en este trabajo fueron tiras de pollo de 8x2x1 cm suministradas por una empresa dedicada a la producción de “Formas de pollo” congeladas. Las superficies de ensayo elegidas fueron las piezas de una máquina picadora de carne, simulando la utilizada para la producción de los productos congelados mencionados.

Las piezas de la picadora fueron utilizadas sin inocular e inoculadas por inmersión con 8 log UFC/ml (alto inóculo) y 3 log de UFC/ml (bajo inóculo) de *S.*

enterica y *E. coli* O157:H7 y, posteriormente, fueron tratadas con L (+)-ácido láctico 85% marca Corbion Purac (A.L) a las concentraciones de 3%, 4% y 5% por pulverización a 25°C. Todo el equipo de procesamiento se limpió y desinfectó entre repeticiones.

Las muestras de pollo fueron picadas y posteriormente se realizó el recuento de colonias de *S. enterica* en agar *Salmonella-Shigella* (Difco) y agar Xilosa-Lactosa-Desoxicolato (Difco) y de *E. coli* O157:H7 en agar MacConkey sorbitol (Difco) y agar cromogénico O157 (CHROMagar™). En paralelo, se procesaron muestras de pollo empleando la picadora sin inoculación bacteriana y con contaminación bacteriana sin tratamiento ácido. Al contaminar la picadora con inóculo bacteriano bajo se implementó un enriquecimiento selectivo previo en caldo EC (Merck) y caldo Rappaport-Vassiliadis (Merck).

Diseño experimental del efecto biocida de las sales orgánicas (lactato de sodio, lactato-diacetato de sodio) en la masa destinada a la producción de productos congelados a base de pollo

La masa madre de las denominadas “Formas de pollo” resultó compuesta por pechuga de pollo procesada junto a los restantes ingredientes siguiendo formulación provista por la empresa. Dicha masa fue contaminada con 8 log UFC/ml (alto inóculo) y 3 log UFC/ml (bajo inóculo) de *S. enterica* y de *E. coli* O157:H7 y se evaluó el efecto del tratamiento de los dos aditivos alimentarios, lactato de sodio (60%) (L.S) y de lactato sódico (56%)-diacetato de sodio (4%) (L.D.S) (Corbion Purac) en concentraciones de 2,5% y 3%, a los tiempos de incubación a 25°C. En paralelo, se procesaron la masa madre sin contaminar y contaminada sin tratamiento con las sales orgánicas mencionadas. Las masas madres evaluadas fueron sometidas a análisis microbiológicos mediante siembra en los mismos medios descritos anteriormente.

Análisis microbiológico del efecto biocida del ácido láctico y sales orgánicas lactato de sodio y de lactato-diacetato de sodio

El efecto bactericida de los ácidos y sales orgánicas se determinó cuantitativamente por el número de UFC/ml que se recuperaron posterior al tratamiento con los agentes biocidas en comparación con los obtenidos de los recuentos controles. Las colonias típicas obtenidas se confirmaron mediante pruebas bioquímicas metabólicas, serología y métodos moleculares. Los microorganismos se ensayaron en forma independiente.

Análisis estadístico

Se utilizó el programa GraphPad 3.1. Para la comparación de las medias se realizó un ANOVA bifactorial seguido por un test de comparaciones múltiples con un nivel de significación de 0,05.

RESULTADOS

Al analizar los resultados del efecto biocida de A.L. frente a *S. enterica* y a *E. coli* O157:H7 se observó una reducción significativa entre las muestras tratadas y no tratadas ($p < 0,05$) con ambos inóculos a 25°C con respecto a las muestras controles. Para ambos microorganismos se observó una reducción de 3.0 log en el recuento de patógenos a bajo inóculo post tratamiento y entre 4 a 6 log para alto inóculo (Figuras 1 y 2). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre las concentraciones de A.L. 3%, 4% y 5% ensayadas. Al comparar las dos especies bacterianas no se observó diferencia significativa en la susceptibilidad al compuesto en estudio.

En cambio, no se observó una reducción significativa ($p > 0,05$) en el recuento de *S. enterica* y *E. coli* O157:H7 inoculadas a dosis altas y bajas posterior al tratamiento con L.S y L.D.S a concentraciones de 2,5% y 3% en la masa madre de las “Formas de pollo” (datos no mostrados).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La Industria de procesamiento de alimentos está interesada en mitigar la contaminación por patógenos de transmisión alimentaria puesto que representan un constante peligro al provocar brotes de enfermedades que afectan a millones de personas cada año. El desarrollo de nuevos métodos para el control higiénico de las superficies y la prevención de la adherencia bacteriana son vías de desarrollo para evitar la propagación de bacterias patógenas o alterantes de los alimentos. El estudio realizado nos permitió observar que la aplicación de A.L. sobre superficies inertes reduce significativamente el recuento de UFC/ml de *S. enterica* y de *E. coli* O157:H7.

Estudios similares demostraron que el A.L. a concentraciones entre 0,5% y 2% presentaron un gran potencial para inhibir el crecimiento bacteriano (Oh y Marshall, 1995, González-Fandos y col., 2009) y para desinfectar reses bovinas (Castillo y col., 2001; Dormedy y col., 2000; Harris y col., 2006). Otros estudios han demostrado que el A.L. reducía significativamente el recuento de *Salmonella* spp. en productos cárnicos contaminados artificialmente respecto de muestras controles (Castillo y col., 2001; Mikołajczyk y Radkowski, 2002; Gill y Badoni, 2004).

Asimismo, otros autores demostraron reducciones significativas de 3,3 log UFC/ml con la aplicación de A.L. 2% (Ranson y col., 2003) y de 5,15 log UFC/ml con A.L. al 4,5% sobre el recuento de *E. coli* O157 (Chevise y col., 2019). Igualmente, se encontró efecto del A.L. sobre *E. coli* no-O157 (Pitmann y col., 2012) y *Staphylococcus aureus* (Raftari y col., 2009). Otros microorganismos, como *Campylobacter jejuni*, presentes en muestras de piel y carne de pollo mostraron reducciones de 2 log UFC/ml cuando fueron sumergidas en soluciones químicas de A.L. (2.5%), ácido fórmico (2%), fosfato trisódico (10%), entre otros (Riedel y col., 2009).

Además en este estudio se realizó una contaminación con bajo inóculo bacteriano para reproducir lo que ocurre en la industria alimentaria, demostrando una reducción en el recuento de patógenos a niveles no detectables a las concentraciones ensayadas. Estos resultados demuestran la factibilidad para aplicar el A.L. como una posible intervención en la desinfección de superficies y equipos en la industria alimentaria. Contrariamente, en el presente trabajo no se observaron reducciones significativas sobre las cepas

FIGURA 1 - Efecto del tratamiento del A.L. 3%, 4% y 5% a 25°C sobre superficies inertes contaminadas con alto y bajo inóculo de *S. enterica*. Bajo inóculo: a: piezas sin contaminar/sin tratamiento, b: piezas contaminadas/sin tratamiento c: piezas contaminadas/con tratamiento. Alto inóculo: d: piezas sin contaminar/sin tratamiento, e: piezas contaminadas/sin tratamiento f: piezas contaminadas/con tratamiento

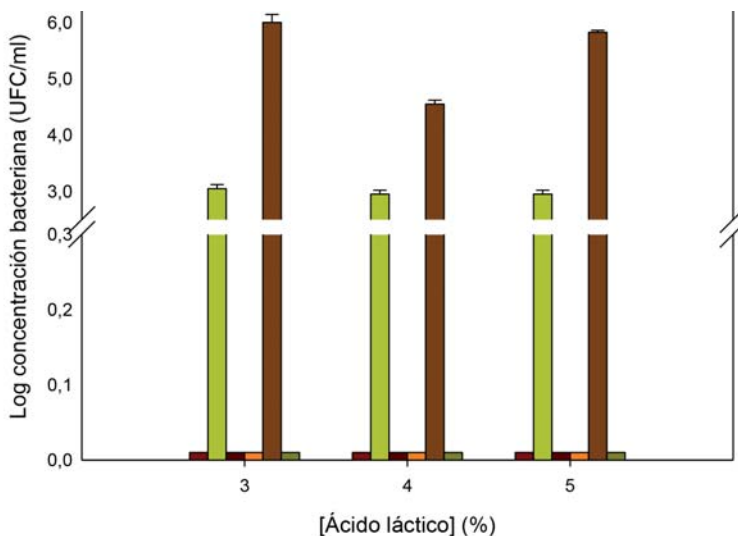
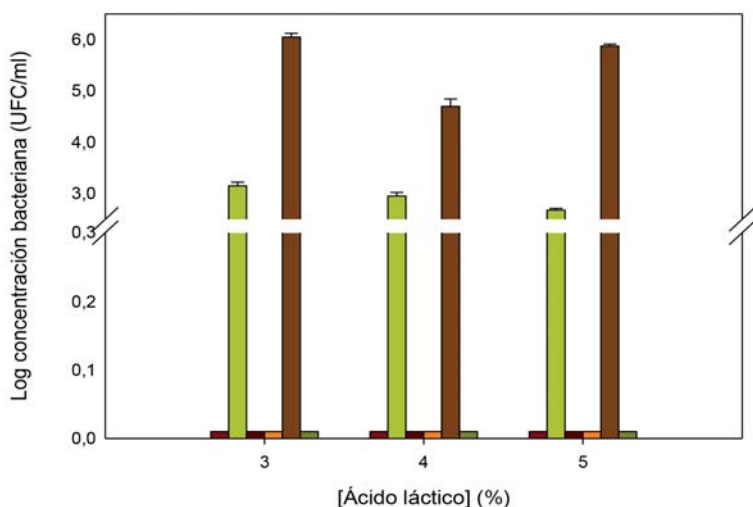


FIGURA 2 - Efecto del tratamiento del A.L 3%, 4% y 5% a 25°C sobre superficies inertes contaminadas con de alto y bajo inóculo de *E. coli* O157:H7. Bajo inóculo: a: piezas sin contaminar/sin tratamiento, b: piezas contaminadas/sin tratamiento c: piezas contaminadas/con tratamiento. Alto inóculo: d: piezas sin contaminar/sin tratamiento, e: piezas contaminadas/sin tratamiento f: piezas contaminadas/con tratamiento.



estudiadas mediante la adición de sales orgánicas como aditivos a la masa madre de las “Formas de pollo”.

La presencia de *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7 en plantas de industrias cárnicas y avícolas representan un grave problema debido a la posibilidad de contaminar alimentos y superficies. La evaluación de las propiedades del ácido láctico como agente biocida sobre *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7 proponen a este compuesto como una posible intervención en la industria cárnica avícola. Su acción biocida sobre superficies inertes disminuiría la contaminación cruzada bacteriana y, por ende, contribuiría al control de enfermedades de transmisión alimentaria producidas por estos patógenos.

BIBLIOGRAFÍA

1- Al-Ahmad, A.; Wiedmann-Al-Ahmad, M.; Auschill, T.M.; Follo, M.; Braun, G.; Hellwig, E. y Arweiler, N.B. (2008). Effects of commonly used food preservatives on biofilm formation of *Streptococcus mutans* in vitro. *Archives of Oral Biology* 53(8):765-72.

2- Castillo, A.L.; Robertson, K.; Stevenson, B.; Mercado, I. y Acuff, G.R. (2001). Lactic acid sprays reduce bacterial pathogens on cold beef carcass surfaces and in subsequently produced ground beef. *Journal of Food Protection* 64(1): 58-62.

3- Dormedy, E.; Brashears, M.; Cutter, N. y Burson, E. (2000). Validation of acid washes as critical control points in hazard analysis and critical control points systems. *Journal of Food Protection* 63(12): 1676-1680.

4- Echeverry A; Chance Brooks J.; Miller M., Collins J.; Loneragan G, Brashears M. (2010). Validation of Lactic Acid Bacteria, Lactic Acid, and Acidified Sodium Chlorite as Decontaminating Interventions to Control *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium DT 104 in Mechanically Tenderized and Brine-Enhanced (Nonintact) Beef at the

Purveyor Journal of Food Protection. 73 (12): 2169–2179.

5- Gill, C. O.; Badoni, M. (2004). Effects of peroxyacetic acid, acidified sodium chlorite or lactic acid solutions on the microflora of chilled beef carcasses. *International Journal of Food Microbiology* 91: 43–45.

6-Gonzalez-Fandos, E., Herrera, B.; Maya, N. (2009). Efficacy of citric acid against *Listeria monocytogenes* attached to poultry skin during refrigerated storage. *International Journal of Applied Microbiology* 44: 262-268.

7- Harris, K.; Miller, M.F.; Loneragan, G.H. y Brashears, M.M. (2006). Validation of the use of organic acids and acidified sodium chlorite to reduce *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* Typhimurium in beef trim and ground beef in a simulated processing environment. *Journal of Food Protection* 69(8): 1802–1807.

8- Oh, D. y Marshall, D. (1995). Influence of packaging method, lactic acid and monolaurin on *Listeria monocytogenes* in crawfish tail meat homogenate. *Food Microbiology* 12: 159-163.

9- Pittman, C.I.; Geornaras, I.; Woerner, D.R.; Nightingale, K.K.; Sofos, J.N.; Goodridge, L. y Belk, K.E. (2012). Evaluation of lactic acid as an initial and secondary subprimal intervention for *Escherichia coli* O157:H7, non-O157 Shiga toxin-producing *E. coli* and a nonpathogenic *E. coli* surrogate for *E. coli* O157:H7. *Journal of Food Protection* 75(9):1701-1708.

10- Raftari M.; AziziJalilia, F.; Abdulmir, A.S.; Son, R.; Sekawi, Z. y Fatimah, A.B. (2009). Effect of organic acids on *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* contaminated meat. *The Open Microbiology Journal* 3: 121-127.

11- Ranson, J.R.; Belk, K.E.; Sofos; J.N.; Stopforth, J.D.; Scanga, J.A. y Smith, G.C. (2003). Comparison of intervention technologies for reducing *Escherichia coli* O157:H7 on beef cuts and trimmings. *Food Protection Trends* 23 (1): 24-34.

12- Riedel, C.T.; Brondsted, L.; Rosenquist, H.; Haxgart, S.N. y Christensen, B.B. (2009). Chemical decontamination of *Campylobacter jejuni* on chicken skin and meat. *Journal of Food Protection* 72(6):1173-80.

13- Stasiewicz, M.J.; Wiedmann, M. y Bergholz, T.M. (2011). The transcriptional response of *Listeria monocytogenes* during adaptation to growth on lactate and diacetate includes synergistic changes that increase fermentative acetoin production. *Applied and Environmental of Microbiology* 77(15): 5294–5306.

14- Chevisse, T.; Stelzleni, A.; Rincon, A., Kumar, S.; Rigdon, M.; Robert, M. y Harshavardhan, T. (2019). Validation of Antimicrobial Interventions for Reducing Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Surrogate Populations during Goat Slaughter and Carcass Chilling. *Journal of Food Protection* 82: 364-370.

15- Heredia, N. y García, S. (2018). Animals as sources of food-borne pathogens: A review. *Animal Nutrition* 4(3): 250–255.

16- Mikołajczyk, A. y Radkowski, M. (2002). Elimination of *Salmonella* spp. By lactic acid. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 5(3):139-43