Zootecnia Tropical 23(2):171-181. 2005

Crecimiento de *Listeria monocytogenes* en atún ahumado empacado al vacío

Bertha E. Figuera[1*], Ana M. Cabello[2], Luz B. Villalobos[1],
Yunilde del Valle Márquez[1] y Osmicar M. Vallenilla[2]

[1]Universidad de Oriente. Postgrado de Biología Aplicada. Núcleo Sucre. Cumana, estado Sucre. Venezuela.

[2]Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. CIAE - Sucre/Nueva Esparta. Cumaná, estado Sucre. Venezuela.

RESUMEN

El pescado con frecuencia se contamina con bacterias patógenas como *Listeria monocytogenes*, las cuales son capaces de crecer en productos frescos y congelados, y su predominio en pescado ahumado es elevado. Este estudio plantea determinar el crecimiento de *L. monocytogenes* en un producto ahumado empacado al vacío, elaborado a partir de atún. Las muestras obtenidas de una empresa atunera fueron trasladadas al Laboratorio de Tecnología de Alimentos del INIA-Sucre/Nueva Esparta, donde se les realizaron los análisis para determinar grado de frescura de la materia prima y procesamiento del producto. El atún fue descabezado, eviscerado, lavado y cortado en trozos de aproximadamente 300 g. Se prepararon dos submuestras y se colocaron en salmuera de 8% y 10% por 20 minutos, se inocularon y se ahumaron (40°C y 50°C) por seis horas, se empacaron al vacío y se almacenaron en refrigeración. El inóculo se preparó con cepas certificadas a partir del patrón estándar de Mac Farland 0.4. El crecimiento de *L. monocytogenes* fue monitoreado cada 7 días, utilizando agar PALCAM. Los resultados promedios de pH (5,74), NBVT (20,85 mg/100g), coliformes (1,1 x 10^3 NMP/g) y mesófilos (2,7 x 10^5 UFC/g) realizados a la materia prima, demuestran que el pescado estaba en buenas condiciones para el ensayo y que los valores estuvieron dentro de los límites establecidos. Los resultados sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* durante refrigeración demostraron que el ahumado tuvo efecto inhibidor en la población inicial de *L. monocytogenes,* comenzando a observarse un ascenso después de los siete días de elaborados los productos.

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*, atún ahumado, contaminación.

Growth of *Listeria monocytogenes* in smoked tuna vacuum packaged

SUMMARY

Processed fish frequently gets contaminated with pathogenous bacteria like *Listeria monocytogenes*, which can grow in fresh or frozen products, with a high prevalence in smoked fish. The objective of this study is to determine growth of *L. monocytogenes* in a smoked tuna vacuum packed. Samples were obtained from a tuna processing plant and brought to Food Technology Laboratory INIA-Sucre/Nueva Esparta, where freshness analyses were performed on the fresh and the processed products. An

inoculum was prepared with certified Mac Farland 0.4 strains. The fish were beheaded, gutted, washed and cut in pieces about 300 g. Two subsamples were prepared which were placed in 8% and 10% brine by 20 min. Then they were inoculated and smoked (40°C and 50°C) by six hours. Afterwards, they were vacuum packed and refrigerated. Growth of *L. monocytogenes* was monitored every 7 days, using agar PALCAM. Average values of pH (5.74), BTVN (20.85 mg/100g), coliforms (1.1 x 10^3 MPN/g) and mesophils (2.7 x 10^5 CFU/g) from the raw material showed that it was in good condition for the essay, since they were under established limits. The results of *L. monocytogenes* growth during refrigeration showed that smoking had an inhibitory effect of the initial population, but an increase was observed after seven days of processing.

Key words: *Listeria monocytogenes*, smoking tuna, contamination.

INTRODUCCIÓN

En Venezuela, entre la pesca de mayor consumo y comercialización se encuentra el atún, que junto con la sardina y la pepitona son las principales materias primas de la Industria pesquera venezolana.

El atún, por su característica bromatológica, calidad de su carne y contenido de proteínas, vitaminas y minerales esenciales para el hombre, es una especie de consumo frecuente entre los venezolanos. Constituye una de las actividades de mayor importancia económica del país, por los elevados volúmenes de capturas y desembarques registrados, así como por su valor agregado, ingresos generados y número de empleos creados (Marcano *et al*., 1992).

El pescado con frecuencia se contamina con bacterias patógenas como *Salmonella sp.* y *L. monocytogenes,* siendo esta última, una bacteria Gram positiva, no esporulada que crece en condiciones aeróbicas y anaeróbicas facultativa. Son catalasas positivas y oxidasas negativa. Están ampliamente distribuidas en el medio ambiente: en el suelo (Chasseignaux *et al*., 2001), los vegetales (Aguado *et al*., 1997), la carne (Jay, 1996), la leche (Rijpens *et al*., 1997) y el pescado (Hartemink y Georgsson, 1991). Aunque la incidencia puede variar, es probable que parte de materiales no procesados (crudos) o ligeramente elaborados estén contaminados con especies patógenas como *Listeria monocytogenes*. Se ha reportado que un 2-6% de la población sana son portadores fecales asintomáticos de *L. monocytogenes* [Rocourt, 1991), por lo que este estudio busca probar las posibilidades de crecimiento de esta bacteria en un producto semiprocesado como es el atún ahumado a dos temperaturas y concentraciones de sal diferentes.

Según Duggan y Phillips (1998), el grado de contaminación y la incidencia de *Listeria* varían según el tipo de alimento. En general, las carnes frescas presentan cantidades <100 ufc/g, mientras que las carnes procesadas y los productos derivados de las aves presentan concentraciones mayores. Los alimentos de alto riesgo son frecuentemente productos con muchas manipulaciones, preparados para comer directamente, almacenados en refrigeración durante largos periodos de tiempo y que son contaminados con *L. monocytogenes* (>100 ufc/g).

Recientemente, Horak *et al*. (2005) demostraron que *L. monocytogenes* inoculada a hortalizas frescas se hace resistente cuando es sometida a radiaciones gamma en un rango de dosis de 0,3 a 2 KGy.

Los distintos modos mediante los cuales esta bacteria es capaz de entrar en las plantas de procesamiento de alimentos, su capacidad para sobrevivir durante períodos de tiempo prolongado y en condiciones adversas en el ambiente (agua, tierra y plantas) y en el interior o superficie del alimento; así como de crecer a temperaturas muy bajas (2 a 4°C), han hecho de esta bacteria una preocupación en la industria agroalimentaria durante la última década.

El crecimiento de *L. monocytogenes* está influenciado por muchas condiciones ambientales tales como temperatura, actividad de agua, concentración de NaCl, condiciones atmosférica, pH y accesibilidad a los nutrientes.

En este estudio se planteó como objetivo, determinar el crecimiento de *L. monocytogenes* en atún ahumado empacado al vacío.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras fueron obtenidas de una empresa atunera del estado Sucre y trasladadas al Laboratorio de Tecnología de Alimentos del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas de los estados Sucre y Nueva Esparta (INIA Sucre/Nueva Esparta), donde se le realizaron evaluaciones de frescura para proceder a la elaboración del producto. Dentro de los análisis físico-químicos que se realizaron estuvo pH y nitrógeno básico volátil total (NBVT), según normas de la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN 1315-79 y 1948-82, respectivamente) (Covenin, 1979; 1982). Se determinó el grado de humedad y el contenido de sal utilizando los métodos de la AOAC (1980). Se determino la carga microbiana inicial, a través de: índice de coliformes totales, empleando la técnica del Número Más Probable (NMP) y población aerobia mesófila y psicrófila, mediante conteo en placa, ambas según los métodos de la APHA (1992).

Para la elaboración del producto, los atunes previamente analizados fueron descabezados, eviscerados, lavados y cortados en trozos de aproximadamente 300 g. Se prepararon seis tratamientos respectivos, que constaron de dos concentraciones de salmuera (8% y 10%) y dos temperaturas de ahumado (40ºC y 50ºC) con inóculo y sin inóculo. El salmuerado fue de 20 minutos, se dejaron escurrir y se inocularon con cepa certificada de *L. monocytogenes* (10^9 bacterias por gramo de alimento), para luego ahumarlas a 40°C y 50°C por seis horas. Se dejó enfriar, se empacaron al vacío y se almacenaron en refrigeración a 6°C. En total se realizaron 5 réplicas, incluyendo la utilizada para definir el diseño experimental.

Las cepas de *L. monocytogenes* fueron obtenidas del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos de la Universidad Central de Venezuela, las cuales fueron mantenidas en agar tripticasa de soya (TBS) hasta su utilización. El inóculo se preparó a partir del patrón estándar de Mac Farland 0.4.

El crecimiento de *L. monocytogenes* fue monitoreado cada 7 días, determinándose su presencia según el Manual Analítico Bacteriológico de la FDA (1992) utilizando agar PALCAM (Merck).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados promedios de la evaluación físico-química de la carne de atún fresco y ahumado pueden observarse en el Cuadro 1. La humedad es un parámetro importante porque está directamente relacionada con la posibilidad de crecimiento y desarrollo de flora bacteriana. Los valores de humedad para atún fresco, concuerdan con lo señalado

por Narváez (1999), para aleta amarilla (68,90%).

Cuadro 1. Análisis físicos y químicos del fresco y ahumado

Condición†	Humedad	Ceniza	Cloruro	pH	NBVT
	----------	----------	%	----------	mg/100 g
Fresco	69,70±0,294	1,95±0,412	2,95±0,129	5,74±0,017	20,85±0,351
A8/40	67,40±0,144	3,26±0,137	5,25±0,068	5,69±0,029	25,20±0,096
A8/50	65,40±0,226	3,26±0,137	5,55±0,021	5,70±0,082	26,00±0,082
A10/40	66,36±0,267	5,31±0,043	6,24±0,017	5,65±0,021	24,40±0,082
A10/50	64,30±0,269	5,31±0,021	6,28±0,016	5,71±0,045	25,50±0,086

† Ahumado: A8/40= 8% sal/40°C; A8/50= 8% sal/50°C; A10/40= 10% sal/40°C; A10/50= 10% sal/50°C

Tanto el pH como el NBVT indican que los atunes presentaron un grado de frescura y calidad aceptable. Existen numerosos trabajos donde se señala que el pH del músculo puede servir como indicador del estado de frescura de pescados, cuyo valor en pescado vivo es cercano a la neutralidad. Este parámetro varía según la especie, área de captura, época del año y ciclo reproductivo (Huss, 1999). Para los productos ahumados a 40°C y 50°C y salmuerado de 8% y 10% almacenados en refrigeración no hubo mucha variación. Sin embargo, el cloruro de sodio, la ceniza y humedad, presentaron un ligero aumento en los productos sometidos a concentraciones de 10% sal. La combinación del efecto de la salmuera, el ahumado y la temperatura sobre la disponibilidad de agua hace que se cree un obstáculo para el crecimiento de microorganismos deterioradores del pescado, lo que se conoce como tecnología de obstáculos, utilizada por Sánchez (1999) para la conservación de una torta seca de pescado, demostrando que el manejo de ambos parámetros puede ser una barrera para el crecimiento y desarrollo de bacterias, por lo que se planteo en el diseño un producto ahumado que ha perdido agua en los procesos de salazonado y ahumado.

Los resultados promedios obtenidos de los análisis microbiológicos realizados a los atunes frescos (Cuadro 2) se encuentran por debajo de los límites máximos establecidos por la norma COVENIN (1994); es decir, son valores aceptables para el procesamiento de esta materia prima y consumo humano, lo que confirmó la calidad higiénico sanitaria de la materia prima utilizada para los ensayos, que no estaba contaminada con la bacteria objeto de estudio. Los resultados demostraron crecimiento en los cuatro tratamientos (inoculados a 10^9 bacterias por gramo de alimento), los cuales fueron sometidos al análisis estadístico correspondiente.

Cuadro 2. Análisis microbiológicos realizados al atún fresco

Análisis	Cantidad	Límite máximo permitido
Mesófilo, ufc/g	$2,7 \times 10^5$ ± 0,017	$1,0 \times 10^7$
Psicrófilo, ufc/g	$1,7 \times 10^4$ ± 0,004	$1,0 \times 10^7$
Coniformes, NMP/g	$1,1 \times 10^3$ ± 0,010	$1,0 \times 10^5$
Listeria monocytogenes	ND	< 3

ND: No detectada

Al realizar el análisis de varianza con interacciones de dos factores para el crecimiento de *L. monocytogenes* inoculada, se demostró que existían diferencias altamente

significativas (F=14,08; P<0,001) entre todos los lotes analizados a los distintos tiempos de almacenamiento. Un análisis a posteriori basados en las diferencias mínimas significativas indicó que existen 4 grupos (40°C/8% sal, 40°C/10% sal, 50° C/8% sal y 50°C/10% sal) significativamente diferentes, existiendo menor crecimiento en los grupos ahumados a 50°C y con salmuera de 1%.

En las Figuras 1 y 2 se muestran los resultados del crecimiento de *L. monocytogenes* inoculada en las muestras con tratamientos de salmuera y temperatura. Se observó una reducción mayor en los productos que tenían una concentración de sal de 10% con respecto a los que tenían una concentración de 8%. Después de ahumado hay una reducción de 4 unidades logarítmicas en los productos sometidos a una concentración de sal de 10%, duplicando a los productos con 8%, cuya reducción fue de 2 unidades logarítmicas. Esto se debe a la acción bactericida del humo, a la reducción de agua por medio del proceso de ahumado y por el aumento de la concentración de sal en el producto producida por la deshidratación del mismo.

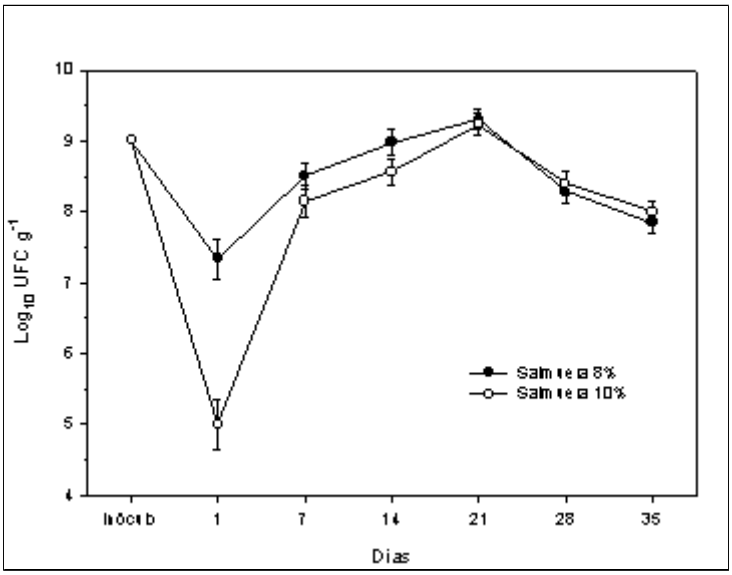

Figura 1. Crecimiento de *Listeria monocytogenes* en atún ahumado a 40°C, en dos concentraciones de salmuera. Barras representan dos desviaciones estándar.

La temperatura de almacenamiento (7°C) no fue limitante para el crecimiento de *L. monocytogenes,* resultado semejante al de Walker *et a*l. (1990), en el que a 5°C *L. monocytogenes* podía crecer una unidad logarítmica en intervalos de tiempos de 1 a 3 días, incrementándose este intervalo de tiempo cuando la temperatura era de 0°C.

Cole *et al.* (1990) demostraron que la concentración óptima de sal para que crezca *Listeria spp.* a temperaturas inferiores a 10°C es de 2-2,5%. Sin embargo, en nuestro estudio las concentraciones de sal utilizadas en la elaboración del producto no impidió el crecimiento de *L. monocytogenes*, lo que confirma lo reportado por Nolan *et al.* (1992), quienes demuestran que *L. monocytogenes* es capaz de crecer en medios con un 10% (w/w) de NaCl y sobrevivir durante un año en soluciones que contengan un 16% (w/w) de NaCl.

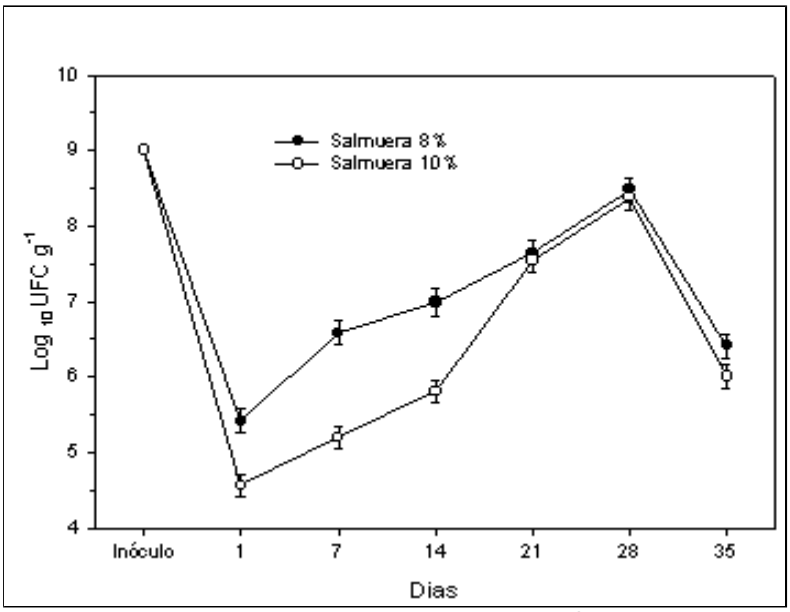

Figura 2. Crecimiento de *Listeria monocytogenes* en atún ahumado a 50°C, en dos concentraciones de salmuera. Barras representan dos desviaciones estándar.

El efecto del vacío sobre *Listeria monocytogenes* no afecto su supervivencia y crecimiento. En estudios realizados por Schmidt y Kaya (1991), se observa que en los productos cárnicos envasados al vacío y almacenados a 4°C se incrementaba la población de *L. monocytogenes* de 2 a 4 unidades logarítmicas. Además, una de las principales características del género *Listeria* es la de tener un metabolismo anaerobio facultativo, lo que indica que un producto ahumado de atún, debe ser bien manipulado y en condición higiénico–sanitaria que impidan la contaminación con este microorganismo.

CONCLUSIONES

1. El ahumado, como proceso de conservación del atún, tuvo un efecto inhibidor sobre la población inicial de *L. monocytogenes* y durante los primeros días de almacenamiento en refrigeración, efecto que se reduce después de los 7 días de almacenamiento.

2. Hubo una mayor reducción en el número de recuentos de esta bacteria en los productos ahumados a 50°C y sometidos a un salmuerado de 10%.

3. La combinación de salmuerado, ahumado y temperaturas superiores a los 40°C reducen en más de 3% la humedad de los productos ahumados, afectando el crecimiento de *L. monocytogenes*

4. La temperatura de almacenamiento y el empaque al vacío no inhiben el crecimiento de *L. monocytogenes*.

BIBLIOGRAFÍA

Aguado V., A. Vitas e I. García. 1997. Estudio comparativo de tres métodos de enriquecimiento para recuperación y aislamiento de *Listeria monocytogenes* en alimentos. Memorias X Congreso de Microbiología de Alimentos. Valencia.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1980. Official Methods of Analysis. 13va Ed. Washington. D.C., USA. 520 pp.

APHA (American Public Health Association). 1992. Compendium of Methods for Microbiological Examination of Food. 3ra Ed. Washington, D.C. USA. 1115 pp.

Cole M., M. Jones y C. Holyoak. 1990. The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of Listeria monocytogenes. J. Appl. Bact., 69: 63-72.

COVENIN (Comisión Venezolana de Normas Industriales). 1979. Alimentos. Determinación de pH (Acidez iónica). Norma 1315-79. Caracas, Venezuela, 3 pp.

COVENIN (Comisión Venezolana de Normas Industriales). 1982. Pescados y Productos Marinos. Determinación de Nitrógeno Básico Volátil Total. Norma 1948-82. Caracas, Venezuela, 4 pp.

COVENIN (Comisión Venezolana de Normas Industriales). 1994. Alimentos. Pescado Salado, Seco, Seco-Salado. Norma 2394-94. Caracas, Venezuela, 3 pp.

Chasseignaux E., M. Toquin, C. Raqimbeau, G. Salvat, P. Colin y G. Ermel. 2001. Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from the environment, raw meat and raw products in two poultry- and pork-processing plants. J. Appl. Microbiol.,91: 888-899.

Duggan J. y C. Phillips. 1998. *Listeria* in the domestic environment. Nutr. Food Sci., 2: 73-79.

FDA (Food and Drug Administration). 1992. Bacteriological Analytical Manual. 7ma Ed. 31 pp.

Hartemink R. y F. Georgsson. 1991. Incidence of *Listeria* species in seafood and seafood salads. Int. J. Food Microbiol., 12: 189-196.

Horak C., T. Fernández y E. Kairiyama. 2005. Estudio de la sensibilidad a la irradiación gamma de *Escherichia coli* 0157:H7 VT1 y VT2 en carne bovina picada refrigerada y congelada. Memorias X Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 1er Simposio Internacional de Nuevas Tecnologías. Mar del Plata. Argentina.

Huss H. 1999. El pescado fresco: su calidad y cambios de calidad. Manual de capacitación FAO/DANIDA en Tecnología Pesquera y Control de Calidad. Colección FAO Pesca, N° 348. 345 pp.

Jay M.J. 1996. Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. Food Control, 7: 209-214.

Marcano J., L. Marcano y X. Gutiérrez. 1993. Informe programa Atún año 1992. MAC - Fonaiap. 11 pp.

Narváez M. 1999. Caracterización físico-química del músculo del atún listado *Katsuwonus pelamis* (Linnaeus, 1758) y del aleta amarilla T*hunnus albacares*

(Bonnaterre, 1788) de los océanos Atlántico y Pacífico. Tesis de grado. Universidad de Oriente. Escuela de Ciencias. Departamento de Biología. Cumaná. 131 pp.

Nolan D., D. Chamblin y J. Troller. 1992. Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. Int. J. Food Microbiol., 16 (4): 323-335.

Rocourt J. 1989. Human Listeriosis. WHO/HPP/FOS/91.3.

Rijpens N., G. Jannes y L. Herman. 1997. Incidence of *Listeria spp*. and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat chicken and turkey products determined by polymerase chain reaction and line probe assay hybridization. J. Food Protect., 60 (5):548-550.

Sánchez D. 1996. Elaboración y evaluación de un producto de humedad intermedia preparado a partir de fauna acompañante del camarón. Tesis de postgrado Ingeniería y Ciencia de los Alimentos. Universidad de Oriente. Núcleo de Anzoátegui. Cumaná. 131 pp.

SARPA (Servicio Autónomo de los Recursos Pesqueros y Acuícolas). 1996. Estadísticas del subsector pesquero y acuícola de Venezuela (1990-1995). Ministerio de Agricultura y Cría. 105 p.

Schmidt U. y M. Kaya. 1991. Comportamiento de *Listeria monocytogenes* en rodajas de embutidos escaldado envasadas al vacío. Fleischwirtsch (español), 1.

Walker S., P. Archer y J. Banks. 1990. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. J. Appl. Bact., 68:157-162.

---

^

Zootecnia Tropical > Colección > Sumario > Volumen 23 > Artículo