

RECYT

Año 18 / Nº 26 / 2016 / 21–25

Determinación de la capacidad de sobrevivencia de *Salmonella enterica* en muestras de mantequilla de maní distribuidas de manera comercial en San José, Costa Rica

Survival capacity determination of *Salmonella enterica* in samples of peanut butter commercially distributed in San José, Costa Rica

Karen Brenes¹, María L. Arias^{1,*}¹ - Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

* E-mail: maria.ariasechandi@ucr.ac.cr

Resumen

La mantequilla de maní es un producto con un alto contenido de grasa y reducida actividad de agua, y que hasta finales de los noventa no había sido vinculado con la transmisión de *Salmonella*. El objetivo de este trabajo fue determinar el tiempo de sobrevivencia de dos poblaciones de *Salmonella enterica* inoculadas en mantequilla de maní y almacenadas a temperatura ambiente.

Se evaluó el recuento total aerobio, recuento de hongos filamentosos y levaduras y presencia de *Salmonella* spp. en tres lotes distintos de cuatro marcas comerciales de mantequilla de maní, obtenidos en los principales supermercados del área metropolitana de San José, Costa Rica. También, se evaluó la sobrevivencia de una densidad celular alta (107 UFC/ml) y baja (103 UFC/ml) de *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076, inoculada en muestras de mantequilla de maní e incubadas a temperatura ambiente. Los recuentos de la flora nativa fueron bajos, de la misma manera que todas las muestras fueron negativas para la presencia de *Salmonella* spp. *Salmonella enterica* inoculada a baja concentración mostró un valor inicial máximo de 2,78 log₁₀ UFC/g en las cuatro marcas comerciales evaluadas, y no fue capaz de sobrevivir luego de dos semanas de incubación. Las muestras inoculadas con una alta concentración de *S. enterica* presentaron una disminución constante del número de bacterias durante las seis semanas de incubación, siendo ésta diferencia mayor en las primeras dos semanas.

Palabras clave: *Salmonella enterica*, Mantequilla de maní; Sobrevivencia.

Abstract

Peanut butter is a product with high content of grease and reduced water activity. This product had not been associated with the transmission of *Salmonella* until the late nineties. The aim of this work was to determine the survival time of two populations of *Salmonella enterica* inoculated in peanut butter and stored at room temperature. Total aerobic plate count, molds and yeast count and the presence of *Salmonella* were determined in three different lots of four commercial brands of peanut butter, three imported and one of national production, obtained from the main supermarkets of the metropolitan area of San José, Costa Rica. Also, the survival of a high (107 UFC/ml) and low cell density (103 UFC/ml) of *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076, inoculated into peanut butter samples and incubated at room temperature during the storage time was evaluated.

The counts of the native flora were low; as well as all samples were negative for the presence of *Salmonella* spp. Samples inoculated with the low concentration of *Salmonella enterica* showed an initial count lower than 2.78 log₁₀ UFC/g in the four different brands evaluated and could not survive longer than two weeks. Samples inoculated with a high concentration of *Salmonella enterica* showed a constant decrease in the number of bacteria for the six weeks of the study with higher reductions observed during the first two weeks.

Keywords: Peanut butter; *Salmonella enterica*; Survival.

Introducción

Las enfermedades de transmisión alimentaria representan uno de los problemas de salud pública de mayor importancia a nivel mundial ya que, además de producir

una alta morbilidad y mortalidad, ocasionan grandes costos a los servicios de salud, pérdidas económicas, demandas y pérdida de confianza de los consumidores (1). La mayoría de brotes de origen alimentario registrados son atribuidos a *Salmonella* ssp. cuya incidencia se ha incrementado en

los últimos años a nivel mundial (1).

Los brotes causados por *Salmonella* spp. están asociados especialmente al consumo de productos de origen animal, incluyendo aves, carnes, huevos, y productos frescos (2). Las cepas de *Salmonella* también pueden sobrevivir durante largos periodos en alimentos con baja actividad de agua (a_w), como el chocolate o mantequilla de maní (1).

Tradicionalmente, la mantequilla de maní no había sido vinculada con la transmisión de *Salmonella* (2), no obstante, a partir de 1996 se han registrado al menos cuatro brotes a nivel mundial producidos por serotipos de *Salmonella enterica*. Uno de estos brotes se presentó en 1996 al sur de Australia, debido a la venta de mantequilla de maní producida con maní tostado contaminado con *Salmonella* Mbandaka (3), entre el año 2006 y el 2007 se produjo otro brote causado por la persistencia de la bacteria *Salmonella* Tennessee en una planta de procesamiento de maní en Sylvester, Georgia, EEUU, que posteriormente llevó a la contaminación de la mantequilla de maní procesada en este sitio (4). El brote del 2008 al 2009 en Estados Unidos, involucró productos de mantequilla de maní contaminados con *Salmonella* Typhimurium y afectó más de 700 personas enfermas, de las cuales 150 sufrieron hospitalizaciones y 9 murieron (5). Recientemente, en el 2012, se presentó un brote multiestatal en Estados Unidos que afectó 20 estados. Éste fue causado por *Salmonella* Bredeney y dejó un total de 42 personas infectadas, de las cuáles 10 necesitaron hospitalización (6).

La contaminación de la mantequilla de maní puede ocurrir en la materia prima (maní) o durante su procesamiento. (6). Además, la limpieza del maní es insuficiente para garantizar la seguridad del producto final debido a la posible re-contaminación durante el procesamiento (7). Este producto proporciona un entorno para el crecimiento de *Salmonella*, y aunque por lo general durante su procesamiento se somete a un tratamiento de calor de hasta 158 °F, estos microorganismos no son inactivados completamente, por lo tanto, pueden estar presentes en el producto de consumo (6). Esto se debe a que las cepas de *Salmonella* son capaces de sobrevivir a altas temperaturas y su resistencia al calor se incrementa en un ambiente con alto contenido de grasa y con baja actividad de agua (6).

Tomando como antecedente que algunos de los más recientes brotes generados por los serotipos de *Salmonella enterica* han sido asociados al consumo de productos con alto contenido de grasa y reducida actividad de agua, es importante conocer las características de sobrevivencia de esta bacteria en mantequilla de maní, especialmente en las marcas comerciales que se venden en nuestro país.

Dado lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar el tiempo de sobrevivencia de dos poblaciones distintas y conocidas de *Salmonella enterica* inoculadas en mantequilla de maní y almacenadas a temperatura ambiente, con el fin de contribuir en la determinación de controles de sus rutas de transmisión.

Materiales y metodos

Determinación de *Salmonella* spp

Se evaluó la presencia de *Salmonella* spp, en tres lotes distintos de cuatro marcas comerciales de mantequilla de maní, tres importados y uno nacional y obtenidos en los principales supermercados del área metropolitana de San José, Costa Rica. Se siguió la metodología descrita por Pouch & Ito (8). Se pesaron 25 g de cada muestra y se enriquecieron usando 225 mL de agua peptonada estéril al 0,1% (APE) por 24 h, 35°C. El enriquecimiento selectivo se llevó a cabo en caldo Tetracionato (Oxoid) y caldo Rappaport (Oxoid), incubados a 42°C por 24 h y el aislamiento en agar Xisola-Lisina-Desoxicolato (XLD) (Oxoid), agar Hecktoen (Oxoid) y agar Sulfito de Bismuto (Oxoid), incubados a 35°C, por 24h.

Recuento total aerobio mesófilo

Se siguió la metodología descrita por Pouch & Ito utilizando agar para recuentos + 2,3,5 cloruro de trifetil tetrazolium (0,1%) (8).

Recuento de hongos filamentosos y levaduras

Se siguió la metodología descrita por Pouch & Ito, utilizando agar papa dextrosa acidificado (Oxoid) (8).

Evaluación de la sobrevivencia de *Salmonella* spp en mantequilla de maní

A partir de un cultivo de 24 h de *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 se procedió a preparar suspensiones de alta (10^7 UFC/ml) y baja (10^3 UFC/ml) densidad celular, utilizando McFarland 0,5 como estándar. Se inocularon 250 g de mantequilla de maní con 1 ml de las respectivas suspensiones celulares. Las muestras fueron homogeneizadas e incubadas a temperatura ambiente. La elección de la temperatura de almacenamiento se basó en el hecho de que ésta es la temperatura usual de almacenamiento de este producto (1). A partir del día 0 hasta la desaparición de la bacteria, se procedió a realizar un recuento de *Salmonella* spp, según la metodología descrita anteriormente.

Resultados y discusión

Al analizar la formulación para las cuatro marcas de mantequilla de maní evaluadas se puede destacar que, a pesar de que comparten ingredientes entre sí, incluyendo el maní tostado, la sal y los aceites vegetales, divergen en cuanto a la adición de jarabe de maíz y miel de abeja, presentes únicamente en la marca A, y lecitina y pectina, presentes en la marca D.

En la Tabla 1 se presentan los valores obtenidos para el recuento total aerobio mesófilo y el recuento de hongos

filamentosos y levaduras de las muestras evaluadas.

Tabla N° 1: Recuento total aerobio mesófilo y recuento de hongos filamentosos y levaduras de las muestras de mantequilla de maní evaluadas.

Marca comercial	Producto	Recuento total aerobio mesófilo (log UFC/g)	Recuento de hongos y levaduras (log ₁₀ UFC/g)
A	Tradicional	<1	4,6 ± 1,2
B	Cremosa	<1	5,6 ± 0,9
C	Cremosa	<1	5,5 ± 1,3
D	Cremosa	3,20± 0,5	4,1 ± 0,6

Cabe destacar que la marca D, única con un recuento bacteriano positivo, es de producción nacional. Por otro lado, las cuatro marcas evaluadas presentaron un recuento de hongos y levaduras que varió entre 4,1 log₁₀ y 5,6 log₁₀ UFC/g. Ninguna de las muestras evaluadas presentó positividad por *Salmonella* spp.

El bajo recuento total aerobio mesófilo obtenido para las muestras evaluadas, permite demostrar la extensa vida útil asociada a este tipo de producto. Este bajo recuento puede deberse, entre otros, a la baja actividad de agua (aw) que posee la mantequilla de maní (9,10). Es importante destacar que la vida útil de este producto oscila entre 12 y 18 meses (11) por lo que cualquier patógeno que logre introducirse después del proceso térmico, podría permanecer viable también por este período.

El recuento de hongos y levaduras obtenido a partir de las muestras analizadas permite evidenciar que esta población es capaz de sobrevivir condiciones más extremas, incluyendo un bajo aw. La importancia de este grupo radica en el hecho de que, debido a la capacidad que tienen de transitar a través de la fase de lípidos pueden causar deterioro a largo plazo (12).

La ausencia de *Salmonella* spp en las muestras analizadas asegura que el producto utilizado en este estudio no estaba previamente contaminado.

S. Enteritidis ATCC13076 inoculada a baja concentración mostró un recuento inicial menor a 2,78 log₁₀ UFC/g en las cuatro marcas comerciales evaluadas, y no fue capaz de sobrevivir más allá de dos semanas, llegando todas las muestras a valores de < 2,0 log₁₀ UFC/g (límite de detección de la metodología empleada) en este tiempo. La mayor sobrevivencia la presentó en la marca A, donde resistió dos semanas, en las marcas B, C y solo fue detectable la primera semana.

Con respecto a las muestras inoculadas con una alta densidad de *S. Enteritidis* ATCC13076, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2. Los resultados demuestran una disminución constante del número de bacterias inoculadas durante las seis semanas de incubación, siendo ésta diferencia mayor en las primeras dos semanas, entre 1,31 log₁₀ UFC/g para las muestras de las marcas B y D y de 2,40 log₁₀ UFC/g para la marca A.

Cabe destacar que para las marcas B y C se pudo de-

tectar esta bacteria hasta la sexta semana de inoculación, no así para las marcas A y D donde fue detectada hasta las semanas 4 y 5 respectivamente. Las muestras inoculadas con una alta concentración de *S. enterica* presentaron una disminución constante del número de bacterias durante las seis semanas de incubación, siendo ésta diferencia mayor en las primeras dos semanas.

Tabla 2: Sobrevivencia de *S. Enteritidis* ATCC13076 inoculada en cuatro muestras comerciales de mantequilla de maní.

Marca comercial	Recuento (log ₁₀ UFC/g)						
	Semanas						
	0	1	2	3	4	5	6
A	5,7±0,6	4,1±0,8	3,3±0,6	2,9±0,2	2,5±0,6	<2,00	<2,00
-log ₁₀ (N/N0)	0	0,14	0,24	0,29	0,43	----	---
B	6,3±0,3	5,1±0,5	5,0±0,4	4,3±0,5	3,7±0,7	3,3±0,4	2,7±0,7
-log ₁₀ (N/N0)	0	0,09	0,1	0,17	0,23	0,28	0,36
C	6,3±0,5	4,8±0,6	4,6±0,7	4,2±0,3	3,9±0,7	3,2±0,5	2,6±0,5
-log ₁₀ (N/N0)	0	0,11	0,14	0,15	0,20	0,30	0,38
D	5,6±0,5	4,8±0,7	4,3±0,4	2,8±0,7	2,4±0,5	2,3±0,4	<2,00
-log ₁₀ (N/N0)	0	0,06	0,11	0,30	0,37	0,39	----

* Suspensión de *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 de 10⁹ UFC/ml.

La disminución observada en la sobrevivencia de *S. enterica* está de acuerdo con los estudios de Burnett y col, 2000 (17) quienes reportaron una disminución entre 4,14 y 4,50 log₁₀ UFC/g a partir de un inóculo inicial de 5,68 log₁₀ UFC/g en 5 marcas de mantequilla de maní inoculadas a 21°C (12). De la misma manera, Park y col, 2008 (2) observaron que al inocular cinco marcas comerciales de mantequilla de maní con una mezcla de tres cepas de *Salmonella* Tennessee y almacenarlas a 22 °C durante 1, 3, 5, 7 y 14 días, hubo una disminución entre 0,34 y 1,29 log₁₀ UFC/g, dependiendo de la formulación. También, Nummer y col, 2012 (13) obtuvieron una reducción de 3,14 y 3,18 log₁₀ UFC/g en la población de *Salmonella* Typhimurium, luego de inocular un cultivo concentrado (aproximadamente 10⁹ - 10¹⁰ UFC/ml) en mantequilla de maní previamente calentada a 65 °C y mantenerla a temperatura ambiente durante 7 semanas.

La diferencia en las tasas de inactivación observadas en el presente estudio se puede explicar por las diferencias en la formulación de cada producto, ya que la viabilidad de *Salmonella* puede ser retenida en la mantequilla de maní por la presencia en su composición de sólidos de jarabe de maíz, proteína de soya y suplementos vitamínicos (12). De hecho, la marca comercial A contenía jarabe de maíz y la marca comercial D aceite de soya, lo que pudo contribuir a que estos dos productos tuvieran la menor tasa de inactivación. Varios factores pudieron influir en la limitación de esta bacteria para permanecer viable por mucho más tiempo en la mantequilla de maní, entre ellos un pH ácido, pérdida de nutrientes, la presencia de aditivos como sorbato y benzoato, cloruro de sodio y pobres caracterís-

ticas de emulsión. Lo anterior explica el por qué la marca comercial D que contenía lecitina como emulsificante, tuvo la menor reducción comparado con las otras tres marcas comerciales.

Dentro de los factores que pueden también afectar la capacidad de sobrevivencia de *Salmonella* se encuentran la disponibilidad de nutrientes y el tamaño de las gotas de lípidos y agua (12). Al ser la mantequilla de maní una suspensión coloidal de lípidos y agua (1, 12), las células de *S. entérica* inoculadas tienden a agruparse dentro o cerca de la fase acuosa con el fin de obtener los nutrientes necesarios para su crecimiento, por lo tanto las diferentes tasas de reducción de esta bacteria se pueden deber a diferencias en el tamaño de las gotas de lípidos y agua, así como a la densidad celular (inóculo) que afecta la disponibilidad de nutrientes dentro de las gotas de agua (12).

El contenido de grasa es uno de los elementos que pudo tener mayor relevancia en la capacidad de sobrevivencia de *Salmonella*. En el presente estudio, el contenido de grasa en las cuatro marcas comerciales varió entre 19-25%. Las marcas A y D tenían el menor contenido de grasa y en éstas la tasa de inactivación de la bacteria fue mucho menor en comparación a las marcas B y C.

De la misma manera, los productos A y D, también tenían un bajo contenido de sodio, 8 y 13 g respectivamente, lo cual pudo contribuir a una mayor viabilidad de las células de *Salmonella*, tal y como lo informaron Lanciotti y col, 2002 (14).

Un factor clave en el crecimiento de *Salmonella* en productos coloidales como la mantequilla de maní, es la actividad de agua (a_w), el cual es considerado como una barrera protectora para el crecimiento de muchos patógenos incluyendo *Salmonella* (15). La mantequilla de maní contiene 1% de humedad y un a_w de 0.20-0.33 (12). A pesar de lo anterior, no se puede afirmar que este sea un factor fuertemente influyente tal y como lo demostraron Janning y col, 1994 (16) al estudiar la sobrevivencia de 18 cepas bacterianas, incluyendo *Salmonella*, bajo condiciones secas a 22 °C. Después de una disminución inicial en el número de células, las cepas de *Salmonella* evaluadas permanecieron estables por un largo periodo de tiempo y se necesitaron de 248 a 1351 días para conseguir la reducción de 1 log.

La cantidad de azúcar presente en la formulación de la mantequilla de maní también pudo jugar un papel importante en las tasas de inactivación de la bacteria, así la marca con mayor cantidad de azúcar y menor tasa de inactivación, fue marca comercial D. Esto coincide con lo sugerido por Hiramatsu y col, 2005 (17), quienes al estudiar la capacidad de *Salmonella* de resistir bajo condiciones secas, encontraron que su sobrevivencia incrementó hasta 79 veces en alimentos como el chocolate y la mantequilla de maní cuando la sacarosa estaba presente.

Aunque se espera que el tratamiento térmico que recibe este producto durante la trituración y molienda elimine

a *Salmonella* del producto final, se ha visto que ésta es capaz de sobrevivir al proceso térmico, debido a que el alto contenido de grasa y bajo contenido de humedad de la mantequilla de maní hace que su distribución sea muy heterogénea, lo que resulta en la disminución de su sensibilidad al calor (11-13). Además, el alto contenido de grasa provee regiones locales de amortiguamiento que permiten que *Salmonella* pueda sobrevivir con mayor resistencia al calor (10).

Tal como lo sugieren diversos autores (11-13) los últimos brotes causados por *Salmonella* en productos con baja humedad como mantequilla de maní se han dado por contaminación post-proceso debido a prácticas sanitarias deficientes, instalaciones subestándar, diseño de equipos y mantenimiento inadecuado. Por lo tanto, el verdadero riesgo alimentario ocurre cuando *Salmonella* contamina el producto luego del tratamiento térmico. Uno de los métodos más simples para evitar la aparición de brotes de *Salmonella* relacionados con mantequilla de maní u otros alimentos, es la aplicación de Buenas Prácticas de Manufactura así como otros programas de seguridad alimentaria, ya que su implementación puede prevenir la contaminación del producto.

Conclusiones

El análisis de indicadores realizado a los tres distintos lotes de cada una de las cuatro marcas comerciales de mantequilla de maní permite demostrar la extensa vida útil del producto así como la ausencia de contaminación previa de este producto con *Salmonella*.

La limitada sobrevivencia de la suspensión celular de baja densidad de *Salmonella entérica* en mantequilla de maní es esperable debido a la naturaleza coloidal del producto.

El inóculo de alta densidad de *S. enterica* sobrevivió en la mantequilla de maní de 4 a 6 semanas, dependiendo de la formulación en cada una de las cuatro marcas estudiadas, lo cual pone de manifiesto la capacidad de supervivencia de esta bacteria durante toda o gran parte de la vida útil del producto.

Referencias

1. Park, E.; Oh, S.; Kang, D. Fate of *Salmonella Tennessee* in peanut butter at 4 and 22 Degrees C. *J Food Sci.* 73: M82-M86. 2008.
2. Scallan, E.; Hoekstra, R.; Angulo, F.; Tauxe, R.; Widdowson, M.; Roy, S. Foodborne illness acquired in the United States. Major pathogens. *Emerg Infect Dis.* 17: 7-15. 2011.
3. Scheil, W.; Cameron, S.; Dalton, C.; Murry, C.; Wilson, D. A south Australian *Salmonella* Mbandaka outbreak investigation using a database to select controls. *Aust New Zeal*

- J Pub Health. 536-539. 2008.
4. Centers for Disease Control and Prevention. *Multistate outbreak of Salmonella serotype Tennessee infections associated with peanut butter-United States, 2006-2007*. MMWR- 56: 521-524. 2007.
 5. Centers for Disease Control and Prevention. *Multistate outbreak of Salmonella infections associated with peanut butter and peanut butter containing products-United States, 2008-2009*. MMWR. 58: 1-6. 2009.
 6. Centers for Disease Control and Prevention. *Multistate outbreak of Salmonella Bredeney infectins linked to peanut butter manufactured by Surland, Inc. (Final Update)*. <http://www.cdc.gov/Salmonella/bredeney-09-12/index.html>. 2012.
 7. Grasso, E.; Somerville, J.; Balasubramaniam, V.; Lee, K. *Minimal effects of high pressure treatment on Salmonella Enterica Serovar typhimurium inoculated into peanut butter and peanut products*. J Food Sci. 75: E522-E526. 2010.
 8. Pouch, F.; Ito, K. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. (4th ed). American Public Health Association. 800 I St., Washington, DC. 343-363. 2001.
 9. Ma, L.; Zhang, G.; Gerner-Smith, P.; Mantripragada, V.; Exeoke, I.; Doyle, M. *Thermal inactivation of Salmonella in peanut butter*. J Food Prot. 72: 1596-1601. 2009.
 10. He, Y.; Guo, D.; Yang, J.; Lou, M.; Zhang, W. *Survival and heat resistance of Salmonella Enterica and Escherichia coli O157:H7 in peanut butter*. Appl Environ Microbiol. 77: 8434-8438. 2011.
 11. Sheth, A.; Hoekstra, M.; Patel, N.; Ewald, G.; Lord, C.; Clarke, C. *A national outbreak of Salmonella Serotype Tennessee infections from contaminated peanut butter: a new food vehicle for Salmonellosis in the United States*. Clin Infect Dis. 53: 356-362. 2011.
 12. Burnett, S.; Gehm, E.; Weissinge, W.; Beuchat, L. *Survival of Salmonella in peanut butter and peanut butter spread*. J Appl Microbiol. 89: 472-477. 2000.
 13. Nummer, B.; Sherstha, S.; Smith, J. *Survival of Salmonella in a high sugar, low water-activity, peanut butter flavored candy fondant*. Food Control. 27: 184-187. 2012.
 14. Lanciotti, R.; Massa, S.; Guerzoni, M.; DiFabio, G. *Light butter: natural microbial population and potential growth of Listeria monocytogenes and Yersinia enterocolitica*. Lett Appl Microbiol. 15: 256-258. 2002.
 15. Carrasco, E.; Morales, A.; Garcia, R. *Cross-contamination and recontamination by Salmonella in foods: A review*. Food Re Int. 45: 545-556. 2012.
 16. Janning, B.; Veld, P.; Notermans, S.; Kramer, J. *Resistance of bacterial strains to dry conditions: use of anhydrous silica gel in a desiccation model system*. J Appl Bacteriol. 77: 319-324. 1994.
 17. Hiramatsu, R.; Matsumoto, M.; Sakae, K.; Miyasaki, Y. *Ability of shiga toxin producing Escherichia coli and Salmonella spp. to survive in a desiccation model system and in dry foods*. Appl Environ Microbiol. 71: 6657-6663. 2005.

Recibido: 23/02/15.

Aprobado: 25/11/15.