

## Evaluación de la actividad de cultivos probióticos sobre *Listeria monocytogenes* durante la producción y almacenamiento de yogur

Darling Berrocal, María Laura Arias, Marjorie Henderson y Eric Wong

Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica

**RESUMEN.** Para evaluar el efecto de cultivos probióticos sobre *Listeria monocytogenes* durante la producción y almacenamiento de yogur se preparó una mezcla para yogur (10.6% de sólidos líquidos no grasos (SLNG), 3% de grasa y 0.3% de gelatina); la cual se homogeneizó y pasteurizó. El yogur se inoculó con cantidades de 0, 10<sup>2</sup>, 10<sup>4</sup> y 10<sup>6</sup> UFC/ml de *L. monocytogenes* y con 0.02% de cultivo láctico tradicional YC 180 (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*) y de cultivo probiótico ABY-1 (*Bifidobacterium longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*). La mezcla de yogur se incubó a 43°C por 3 horas, hasta un pH de 4.8 aproximadamente, seguido por refrigeración a 5°C durante 21 días. Durante la fermentación se tomaron muestras cada hora y durante el almacenamiento cada 3 días, determinándose, para cada tiempo, pH, conteo de bacterias lácticas, bifidobacterias y del patógeno. Se demostró que no hubo un efecto simple significativo para el tipo de cultivo (ABY-1 y YC180) (p=0.684) sobre la cantidad de *L. monocytogenes* presente en el yogur durante el periodo de fermentación y su almacenamiento, por lo que se puede decir que la presencia de bifidobacterias en el cultivo ABY-1 no presentó un efecto significativo sobre *L. monocytogenes*. Por su parte, el efecto de la variable tiempo sobre la *Listeria monocytogenes* no resultó ser significativo (p= 0.448). Se puede afirmar que para este caso en particular, los cultivos ABY-1 y YC 180 mostraron un efecto bacteriostático sobre el desarrollo del patógeno. Esto no tiene ninguna relación con el efecto protector que estos cultivos tienen a nivel intestinal ya que las condiciones in vivo favorecen la producción de antimicrobianos como ciertas bacteriocinas que actúan sobre los patógenos.

**Palabras clave:** Probióticos, yogur, *Listeria monocytogenes*.

### INTRODUCCION

El yogur es uno de los productos lácteos fermentados más aceptados en todo el mundo, ya que, además de su alto valor nutritivo, ofrece ventajas para el hombre, entre las que se puede citar el efecto inhibitorio que ejerce sobre algunas bacterias patógenas. Diversas investigaciones han demostrado que varias especies de bacterias ácido lácticas (BAL),

**SUMMARY.** Evaluation of the effect of probiotic cultures over *Listeria monocytogenes* during the production and storage of yogurt. The effect of probiotic cultures over *Listeria monocytogenes* during the production and storage of yogurt was evaluated. A yogurt mixture (10,6% non-fat solid liquids, 3% fat and 0,3% gelatin) was prepared, homogenized and pasteurized. Yogurt was inoculated with 0, 10<sup>2</sup>, 10<sup>4</sup> and 10<sup>6</sup> CFU/mL of *L. monocytogenes* and 0,02% of traditional lactic culture YC 180 (*Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*) and probiotic culture ABY-1 (*Bifidobacterium longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*). It was incubated for 3h at 43°C until pH reached an approximate value of 4,8, followed by refrigeration at 5°C for 21 days. During fermentation, samples were taken every hour, and during storage every 3 days, analyzing pH and lactic, bifidobacteria and pathogen count for each time. It was demonstrated that there was no significant simple effect for the type of culture used (ABY-1 and YC 180) (p=0,684) over the amount of *L. monocytogenes* present in yogurt during the fermentation and storage periods. The presence of bifidobacteria in the ABY-1 culture did not present a significant effect over *L. monocytogenes*. Neither the effect of time presented a significant effect over *L. monocytogenes* (p=0,448). In this case, the ABY-1 and YC 180 cultures present a bacteriostatic effect over the pathogen. The probiotic cultures had a bacteriostatic but not bactericidal effect over *L. monocytogenes*. This is not related to the protective effect of these cultures in bowel, since in-vivo conditions favor the production of antimicrobial substances, such as bacteriocins that act over pathogens.

**Key words:** Yogurt, probiotics, *Listeria monocytogenes*.

utilizadas en la producción de yogur, presentan una acción antagónica contra patógenos intestinales y de deterioro en alimentos. Las BAL son capaces de prevenir la adherencia, establecimiento, replicación y/o acción patogénica de enteropatógenos específicos. Estas propiedades antagónicas se pueden manifestar por el descenso del pH a través de la producción de ácidos orgánicos volátiles de cadena corta, tales como ácido acético, láctico, o propiónico, compitiendo

por nutrientes específicos para los patógenos, disminuyendo el potencial redox del medio, produciendo peróxido de hidrógeno bajo condiciones anaerobias, y/o produciendo compuestos inhibitorios específicos tales como las bacteriocinas (1). Dentro de los enteropatógenos afectados por la presencia de las BAL se cita *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*, entre otros (2).

Recientemente se ha popularizado el uso de un nuevo tipo de cultivo láctico, denominado probiótico, el cual se define de la siguiente manera:

... "probiótico es un suplemento alimenticio microbiano que afecta benéficamente la fisiología del huésped mediante la modulación de la mucosa intestinal y el sistema inmunológico, tanto como mejora el balance nutricional y microbiano en el tracto intestinal"... (1).

Existen diversas preparaciones disponibles en el mercado que contienen, por lo general, *L. delbreuckii* ssp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. lactis*, y *L. reuteri*. Las bifidobacterias (*Bacillus bifidus*) también son utilizadas como probióticos, las especies usadas comúnmente son *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*, y *B. thermophilum* (1).

La salud y beneficios que se le atribuyen a las bifidobacterias pueden generalizarse bajo las siguientes categorías: mantenimiento del balance de la microflora normal intestinal, especialmente en ancianos y niños, mejoramiento de la tolerancia a la lactosa y digestibilidad de los productos lácteos, actividad antitumorogénica, reducción de los niveles de colesterol en suero, producción de sustancias antimicrobianas, síntesis de vitaminas del complejo B y absorción de calcio. A partir de estos hallazgos, la industria láctea se ha enfocado en nuevos procesos de producción (3).

Diversas investigaciones en las que se ha estudiado y evaluado el comportamiento de *L. monocytogenes* durante la elaboración, maduración y almacenamiento de diversos productos lácteos, han demostrado que el microorganismo es capaz de sobrevivir durante los procesos de manufactura y maduración y/o fermentación y en algunos casos también durante el almacenamiento (2,4-6). Por otro lado, varios autores incluyendo a Schaack y Marth (7) y Carminati et al. (8) han demostrado que los cultivos lácticos tienen propiedades antagónicas contra *L. monocytogenes*. Dada esta divergencia de criterio, se pretende en este estudio evaluar el efecto de los cultivos probióticos sobre el comportamiento de *L. monocytogenes* durante la elaboración y almacenamiento de yogur.

## MATERIAL Y METODOS

### Localización del proyecto

El Proyecto se llevó a cabo en el Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), Facultad de Agronomía y en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica.

### Materias primas

#### Leche y grasa láctea

Se utilizó leche descremada y ultrapasteurizada (U.H.T), con 8.4% de sólidos no grasos y 0.12% de grasa. Para ajustar la cantidad de grasa, se utilizó grasa láctea al 30%.

#### Leche en polvo

Para el ajuste de sólidos se utilizó leche íntegra en polvo, con un contenido de sólidos no grasos del 69% y un 26% de grasa.

### Cultivos

Se utilizaron cultivos lácticos liofilizados de la marca Christian Hansen (CHR. HANSEN®).

Estos cultivos son de inoculación directa en el proceso (DVS, Direct Vat Set). Se pesaron cantidades exactas de cultivo necesarias para 4 kg. de producto final, utilizando el cultivo en un 0.02%, y se almacenaron en ampollas de vidrio estériles selladas a -60°C, durante el desarrollo del proyecto (1 mes). Lo anterior se realizó con el fin de asegurar la actividad y disminuir al máximo la variación de microorganismos durante el tiempo.

El cultivo probiótico utilizado fue ABY-1, el cual corresponde a una mezcla de *Bifidobacterium longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Como cultivo tradicional iniciador se utilizó el YC 180, el cual contiene una mezcla de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*.

### Formulación y definición del proceso

#### Formulación

La formulación del producto se hizo con base a la composición del yogur comercial en cuanto a grasa y sólidos lácteos no grasos (SLNG), determinada por Carvajal (9), la cual corresponde a un 10.6% de SLNG, 3% de grasa y 0.3% de gelatina.

#### Definición del proceso

Se siguió el procedimiento descrito por Henderson (10), con la única modificación de que la leche utilizada fue descremada.

### Inoculación del yogur con *L. monocytogenes*

Se utilizó una cepa de *L. monocytogenes*, ATCC 7644, obtenida en forma liofilizada. Se reconstituyó en caldo tripticasa de soya con levadura incubando a 37°C durante 24h.

La mezcla para yogur se inoculó con una cantidad conocida de *L. monocytogenes* en concentraciones de 10<sup>2</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>6</sup> UFC/ml. Las concentraciones del patógeno se establecieron según las dosis mínimas y máxima reportadas en alimentos por Farber & Peterkin, 1991 (11).

La concentración de *L. monocytogenes* se verificó con el método para determinación de *Listeria* descrito por FDA, 1995 (12).

Inoculada la mezcla para yogur, se incubó a 43°C hasta que el pH descendió a 4,8 aproximadamente. En este punto el matraz de fermentación se colocó en hielo hasta llevarlo a la temperatura de refrigeración y fue almacenado a 4°C.

Un control de fermentación, en el cual *Listeria monocytogenes* no se agregó a la mezcla para yogur con cultivo láctico iniciador, se evaluó para determinar si este microorganismo ejerce alguna influencia en el proceso de fermentación (13).

### Recuento de *L. monocytogenes*

Las muestras para enumeración de *L. monocytogenes* se tomaron de las preparaciones después de la inoculación, y cada hora hasta terminar la fermentación, una vez que el pH llegó a 4.8 aproximadamente. A partir de este momento el recuento se hizo cada 3 días hasta completar el periodo de 21 días de vida útil sugerido por el proveedor de los cultivos.

El recuento se realizó tomando una alícuota de 25 ml del matraz de fermentación y se colocó en 225 ml de agua peptonada estéril (APE) (10<sup>-1</sup>). A partir de esta dilución se hicieron diluciones consecutivas decimales que se inocularon en agar Oxford, según el procedimiento para determinación de *Listeria* descrito por la FDA, 1995 (12).

### Recuento de *Bifidobacterium* y bacterias ácido lácticas (BAL)

El recuento de bifidobacterias así como el de BAL, se realizó en los mismos tiempos descritos para *L. monocytogenes*.

Para el recuento de bifidobacterias, se utilizó un medio de agar MRS (pH 4,8) (OXOID CM 361), al cual se le agregó una solución de antibióticos: NNL (ácido nalidíxico, sulfato de neomicina y cloruro de litio) en un 5%, la cual inhibe al *L. acidophilus*. Los recuentos se realizaron a partir de diluciones decimales hasta 10<sup>-8</sup>, por duplicado y utilizando la técnica de vaciado. La incubación se realizó en anaerobiosis, a una temperatura de 37°C, durante 3 días. Transcurrido este tiempo, se hizo el recuento de las colonias típicas.

Para el conteo de BAL se siguió el procedimiento descrito anteriormente, eliminando la adición de la solución NNL e incubando en aerobiosis.

### Determinación del pH

Se midió el pH a las muestras de cada preparación de yogur a partir de la inoculación y durante los intervalos descritos para el recuento de bacterias.

Este se midió usando un pHímetro marca Werkstätten, modelo 8120 weilhein, según el método descrito por Bodnaruk (12).

### Diseño experimental estadístico

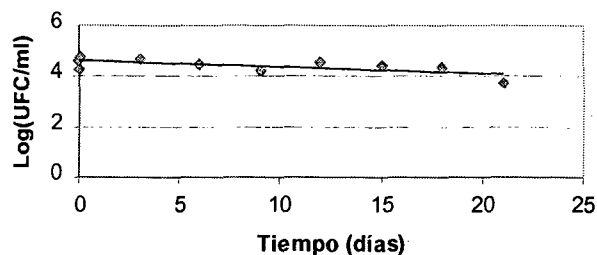
Se utilizó un modelo irrestricto aleatorio con el cual se compararon las tendencias de *Bifidobacterium*, BAL y *Listeria monocytogenes*, en el yogur con probióticos y el yogur elaborado con cultivos iniciadores tradicionales, en el tiempo. Se realizaron tres corridas, lo cual produce tres repeticiones en cada dato generado.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Las Figuras 1 y 2 muestran el comportamiento en el tiempo de *L. monocytogenes*, las bacterias ácido lácticas y bifidobacterias en la mezcla de yogur. La población de *L. monocytogenes* se mantuvo constante durante la fermentación (0-3h) así como durante el almacenamiento a 5°C; mientras que las cepas de BAL y Bifidobacterias mostraron un comportamiento normal en yogur.

FIGURA 1

Comportamiento de un inóculo inicial aproximado de 10<sup>4</sup> UFC/mL de *Listeria monocytogenes* (log UFC/mL) durante la fermentación y almacenamiento de yogur elaborado con ABY-1



En la Tabla 1 se muestran los resultados del análisis de varianza para el recuento de *L. monocytogenes*. Como se observa, el único efecto simple significativo correspondió al nivel de inóculo colocado en la mezcla para yogur (p= 0.000). Esto implica que los promedios de *L. monocytogenes* para cada uno de los niveles ensayados son significativamente diferentes entre sí, tal y como fue diseñado el estudio.

FIGURA 2

Comportamiento de BAL y Bifidobacterias durante el almacenamiento de la mezcla de yogur inoculada con  $10^4$  UFC *L. monocytogenes*

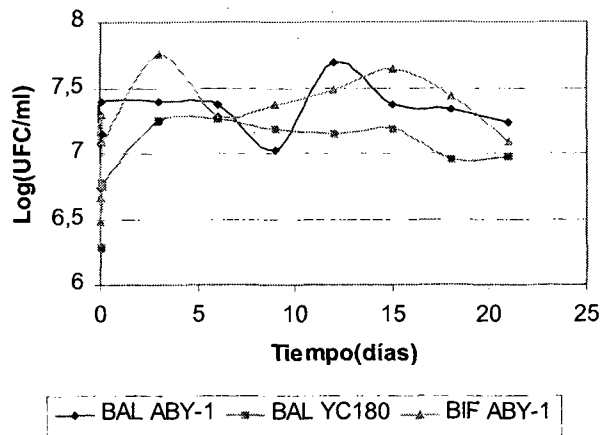


TABLA 1

Resultados del análisis de varianza para recuento de *Listeria monocytogenes*. Probabilidades asociadas al valor de la distribución F en los efectos simples e interacciones

Efecto	Probabilidad (p)
Cultivo	0.684
Tiempo	0.448
Nivel de inóculo	0.000 <sup>1</sup>
Cultivo*tiempo	0.367
Cultivo*nivel del inóculo	0.921
Tiempo*nivel del inóculo	0.491
Cultivo*tiempo*nivel del inóculo	0.342

<sup>1</sup> = Único efecto significativo a un nivel de significancia del 0.1%.

Por otro lado, no hubo un efecto simple significativo para el tipo de cultivo (ABY1 y YC180) ( $p=0.684$ ) sobre la cantidad de *L. monocytogenes* presente en el yogur durante el periodo de fermentación y almacenamiento del mismo. Se esperaba que el cultivo ABY-1 tuviera un efecto considerable sobre *L. monocytogenes*, dada la presencia de bifidobacterias y de las bacterias de cultivos tradicionales (*Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus lactis*), sin embargo esto no sucedió. Por lo anterior, con estas observaciones se demuestra que la presencia de bifidobacterias no representa un efecto adicional sobre *L. monocytogenes*, al que ya ejercen las bacterias de los cultivos tradicionales.

En estudios similares realizados con *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454, Yildirim & Johnson, 1998 (14)

demonstraron que la bifidocina B producida por *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454 actúa contra algunos patógenos de alimentos entre los que se cita *Listeria* sp. La bacteriocina altamente purificada producida por esta bacteria (bifidocina B), fue absorbida en un 95% por *L. monocytogenes*, sin embargo, esto depende de la pureza de la bacteriocina y de la cantidad a la que es expuesto el patógeno. Bajo las condiciones experimentales de este estudio, a pesar de que el cultivo iniciador ABY-1 contiene en su fórmula *B. bifidum*, se demostró que no representó un efecto bactericida sobre el patógeno. Esto puede deberse a que la cepa de *B. bifidum* no corresponda a la cepa NCFB 1454 y por tanto no produjo bifidocina B, o bien a que la cantidad y pureza de bifidocina B producida no fue suficiente para que el efecto sobre *L. monocytogenes* fuera notorio.

Diversos estudios científicos proponen que, debido a la acción del cultivo iniciador, en todo momento los productos lácteos fermentados se encuentran libres de patógenos, especialmente de *L. monocytogenes* (15). Los resultados obtenidos demuestran que, de haber una contaminación con esta bacteria en productos fermentados, ésta no necesariamente va a ser inactivada por el cultivo iniciador, coincidiendo con los datos reportados por Zúñiga, 1995 (2) y Shaack y Marth, 1998 (7), donde la sobrevivencia de *L. monocytogenes* en yogur es una función de la temperatura de incubación, del inóculo de bacterias lácticas y de la concentración de la cepa patógena.

Como se muestra en el cuadro 1 el efecto de la variable tiempo sobre la *L. monocytogenes* no fue significativo ( $p=0.448$ ). Esto quiere decir que los promedios de *Listeria monocytogenes* para cada uno de los tiempos no difieren significativamente. Por lo tanto, se puede afirmar que para este caso en particular, ambos cultivos mostraron un efecto bacteriostático sobre el desarrollo del patógeno.

El comportamiento mostrado por *L. monocytogenes* puede deberse principalmente a dos factores: a) el efecto inhibitorio del pH y b) el fenómeno de respuesta ácido tolerante (ATR). La acidez del medio es considerada como un factor importante para controlar el crecimiento de patógenos, pues muchos se ven inhibidos a pH bajos. Estudios efectuados con *L. monocytogenes* revelan que ésta puede crecer en un ámbito de pH entre 5.0 y 9.6, siendo su pH óptimo de crecimiento alrededor de 7.0, aunque le favorece una ligera alcalinidad (16). Por su parte, Brackett (17) establece que el ámbito de pH en el cual *L. monocytogenes* puede crecer es de 5.6 a 9.8. Es importante destacar que Sorrels et al. (18) reportaron que la bacteria puede crecer a pH 4.4, un valor considerablemente inferior de lo anteriormente reportado. De la misma manera, Doyle (19) encontró que puede crecer a pH 5.0 y Pertran & Zottola (20) también observaron crecimiento a pH 5.0 a una temperatura de 30°C, determinando además que un pH de 4.2 inhibe su crecimiento.

Además del efecto inhibitorio de la acidez sobre *Listeria monocytogenes*, existen otros factores involucrados en esta inhibición, por parte de bacterias lácticas durante la fermentación y almacenamiento del yogur. La acción bactericida global se debe también al efecto combinado de factores como: la formación de ácidos orgánicos (láctico y acético), producción de peróxido de hidrógeno, reducción del potencial de oxido-reducción y producción de sustancias antimicrobianas (1,15,21).

La sobrevivencia de la *Listeria monocytogenes* exhibida en esta investigación, podría atribuirse también a una adaptación de la bacteria a las condiciones ácidas, mediante un fenómeno conocido como respuesta ácido tolerante (ATR). Gahan et al. (22), examinaron el efecto de ATR en la supervivencia de *L. monocytogenes* durante la fermentación de leche con *S. thermophilus*. Se agregaron cultivos de *L. monocytogenes* (ácido-adaptada y no adaptada) durante la fermentación. Como consecuencia, la supervivencia del patógeno ácido-adaptado fue superior en comparación con los cultivos no adaptados, logrando sobrevivir a un pH de 3.87. Esto demuestra que la sobrevivencia de *L. monocytogenes* durante la fermentación de leche mediante bacterias ácido lácticas, fue aumentada considerablemente mediante la adaptación ácida previa a la inoculación. Esta adaptación se puede producir durante la fermentación (22).

Debe reconocerse *L. monocytogenes* como un importante patógeno en alimentos, y tomarse medidas efectivas para minimizar su contaminación. El patógeno tiene la habilidad de soportar una gran variedad de condiciones ambientales adversas como temperaturas de refrigeración, concentraciones de sal de hasta un 10%, y niveles de pH inferiores a 5.0 (23).

Investigaciones previas hechas en Costa Rica ponen al descubierto la presencia *L. monocytogenes* en plantas productoras de productos lácteos. Tal es el caso de Oreamuno (24), quien determinó la presencia de esta bacteria en plantas productoras de queso Turrialba. Así mismo, demostró que la leche cruda es la principal fuente de contaminación por *Listeria sp.* durante la elaboración del producto. Por su parte, Monge et al. (25) revelaron la presencia de *L. monocytogenes* en 2% y 45% de muestras de helado y queso estudiadas.

Se demuestra en este trabajo que factores como el pH bajo y temperaturas de refrigeración, que generalmente son utilizados para prevenir el crecimiento de patógenos, no han sido suficientes para destruir a *L. monocytogenes* bajo las condiciones experimentales. Por tanto debe recalcar que la prevención y buenas prácticas de manufactura, siguen siendo claves para evitar la contaminación de los productos elaborados.

Un cuidadoso manejo de la leche, uso de cultivos iniciadores activos y un adecuado manejo de los productos cultivados podría minimizar el riesgo de la presencia de patógenos en esta clase de alimentos.

## REFERENCIAS

1. Naidu A, Bidlack W & Clemens A. Probiotic spectra of Lactic Acid Bacteria (LAB). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1999;38(1):13-126.
2. Zúñiga A, López-Merino A & Mota de la Garza L. Sobrevivencia de *Listeria monocytogenes* en leche fermentada con un cultivo iniciador para elaborar yogur. *Rev Lat Microbiol*. 1995;37:257-265.
3. Hoover D. Bifidobacteria: activity and potential benefits. *Food Tech*. 1993;47(6):120-124.
4. Papageorgiou D & Marth E. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture, ripening and storage of feta cheese. *J. Food Prot*. 1989;52(2): 82-87.
5. Ryser E & Marth E. Behavior of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of cheddar cheese. *J Food Prot*. 1987a;50(1):7-13.
6. Ryser E & Marth E. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of camembert cheese. *J Food Prot*. 1987b ;50(5):372-378.
7. Shaack M & Marth E. Behavior of *Listeria monocytogenes* in skim milk during fermentation with mesophilic lactic starter cultures. *J Food Prot*. 1988;51(8):600-606.
8. Carminati D, Giraffa G & Bossi M. Bacteriocin-like inhibitors of *Streptococcus lactis* against *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot*. 1989;52(9): 614-617.
9. Carvajal N. Estudio del efecto del uso de cultivos probióticos en la elaboración de un producto similar al yogur. Tesis Lic. en Tecnología de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José, 1999.
10. Henderson M. Ficha técnica. Yogur natural batido. CITA. San José. Costa Rica, 1997.
11. Farber J & Peterkin P. *Listeria monocytogenes*, a food borne pathogen. *Microbiological Reviews*. 1991;55(3):476-511.
12. FDA. Bacteriological Analytical Manual. 8 ed. APHA. Washington, 1995.
13. Bodnaruk P. Survival of *Yersinia enterocolitica* during fermentation and storage of yogur. *J Food Science*. 1998;63(3):535-537.
14. Yildirim Z & Johnson M. Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *J Food Prot*. 1998;61(1):47-51.
15. Northold MD. Grow and inactivation of pathogenic microorganisms during the manufacture and storage of fermented dairy products. A review. *Netherland Milk Dairy Journal*. 1984;30:135-150.
16. Donnelly C & Briggs E. Psychrotrophic growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* as a function of milk composition. *J Food Prot*. 1986;49(12):994-998.
17. Bracket R. Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. *Food Tech*. 1988;42(4):162-164.
18. Sorrells K, Enigl D & Hatfield J. Effect of pH, acidulant, time, and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot*. 1989;52(8):571-573.
19. Doyle M. Effect of environmental and processing conditions on *Listeria monocytogenes*. *Food Tech*. 1988;42(4):169-171.

20. Pertran R & Zottola E. A study of factors affecting growth and recovery of *Listeria monocytogenes* Scott A. J Food Science. 1989;54(2):458-460.
21. Hayes P. Isolation of *Listeria monocytogenes* from raw milk. Appl. Environ. Microbiol. 1986;51(2):438-439.
22. Gahan C, O'Driscoll B & Hill C. Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. Food Tech.1996; 62(9):3128-3132.
23. Ryser E, Marth E. & Doyle M. Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture and storage of cottage cheese. J Food Prot. 1985;48(9):746-750.
24. Oreamuno S. Presencia de *Listeria monocytogenes* y su relación con el nivel de coliformes fecales durante la manufactura de queso blanco en plantas de la zona de Santa Cruz de Turrialba. Tesis Lic. en Tecnología de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José, 1994.
25. Monge R, Utzinger D & Arias ML. Incidence of *Listeria monocytogenes* in pasteurized ice cream and soft cheese in Costa Rica. Revista de Biología Tropical. 1992;42 (1/2):327-328.

Recibido: 12-06-2001

Aceptado:14-06-2002