



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA – ALIMENTOS

LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO



Facultad de Ciencias Químicas BUAP

TESIS:

ESTUDIO DE SANITIZANTES COMERCIALES DE ORIGEN NATURAL EN LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE *Salmonella typhi*, *Salmonella* Montevideo Y *Escherichia coli* EN SUPERFICIES DE ACERO INOXIDABLE.

PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA

p.Q.F.B. LAURA RODRÍGUEZ ROJAS

DIRECTOR DE TESIS

D.C. RAÚL ÁVILA SOSA SÁNCHEZ

CO-DIRECTOR

D.C. TERESA SOLEDAD CID PÉREZ

FEBRERO 2021

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres que respaldaron cada una de mis decisiones, me acompañaron y ayudaron a cumplir mis sueños, a mi padre que me enseñó a ser una mejor persona en todos los sentidos, a superar mi potencial todos los días, hacerme valiente y disfrutar el camino mientras llego a mi destino, gracias a mis madre por darme su apoyo y ayudarme a llegar hasta donde estoy, por impulsarme a salir de mi zona de confort. Gracias por el amor, esfuerzo y la seguridad de ser quien soy. Gracias por enseñarme a ser mi prioridad y valorar ser la de ustedes.

A mi mejor amiga Monserrat, por ser compañera, amiga y hermana en nuestra vida universitaria. Probablemente esta etapa de mi vida no habría sido tan grandiosa si tú no hubieras ocupado gran parte de ella, y definitivamente este trabajo no sería una de mis mejores experiencias sin todo el tiempo que pasamos trabajando, aprendiendo y riendo. Gracias por siempre estar ahí.

AGRADECIMIENTOS

DC. Raúl Ávila Sosa Sánchez le agradezco antes que nada su apoyo y paciencia para la realización del presente trabajo, porque sin su tiempo y enseñanzas no lo hubiera logrado.

A la DC. Paola Hernández Carranza, DC. Carlos Ochoa y a la DC. Soledad Cid por el apoyo en dudas surgidas, consejos que ayudaron en mi toma de decisiones, la confianza y los buenos momentos en el laboratorio.

A mi familia que siempre me ha dado su apoyo incondicional, a ustedes les debo este y todos los logros que he obtenido a lo largo de mi vida.

A mis amigos Jorge, Adolfo, Donaldo, Pamela y Joel por brindarme su amistad incondicional, por haber estado en los momentos buenos y siempre brindarme su hombro en los momentos malos, por la confianza, cariño y todos los momentos vividos dentro y fuera de la facultad de los cuales jamás olvidare.

A todos y cada uno de los profesores de la Facultad de Ciencias Químicas que ayudaron a mi formación profesional y crecimiento personal. A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por ser mi alma mater, mi segundo hogar y el lugar donde fui feliz, me sentí capaz y valiente.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	9
2. ANTECEDENTES	10
2.1 Contaminación alimentaria.....	10
2.2 <i>Escherichia coli</i>	13
2.3 <i>Salmonella</i>	15
2.4 <i>Salmonella typhi</i>	18
2.5 <i>Salmonella</i> Montevideo.....	18
2.6 Biopelículas.....	19
2.7 Formación de biopelícula	21
2.8 Factores que intervienen en el desarrollo de la biopelícula.	24
2.9 Sanitizantes.....	27
2.10 Factores que afectan la acción de los sanitizantes.	29
2.11 Sanitizantes de origen natural.....	31
2.12. Técnicas y métodos de limpieza en la industria alimentaria.	33
3. JUSTIFICACIÓN	36
4. OBJETIVOS	37
4.1 Objetivo general.....	37
4.2 Objetivos específicos	37
5. DIAGRAMA DE TRABAJO	38
6. MATERIALES Y MÉTODO	39
6.1 Material	39
6.2 Material biológico	39
6.3 Sanitizantes naturales.....	39
6.4 Equipos	39
6.5 Métodos	40
7. METODOLOGÍA	41
7.1. Caracterización y verificación de cepas.	41
7.2. Formación y recuperación de biopelículas.....	41
7.3. Evaluación de la efectividad de los sanitizantes.	42

7. 4. Efectividad de los sanitizantes a diferentes tiempos y dosis.....	43
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
8. 1 Formación y recuperación de biopelículas.....	44
8. 2 Evaluación de la efectividad de los sanitizantes.	47
8. 3 Efectividad de los sanitizantes a diferentes tiempos y dosis.....	50
9. CONCLUSIONES.....	56
10. RECOMENDACIONES.....	57

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Biopelículas encontradas en la industria de alimentos	12
Tabla 2. Determinantes de superficie de <i>Escherichia coli</i> en la formación de biopelículas	15
Tabla 3. Serotipos de <i>Salmonella</i> y sus serogrupos	19
Tabla 4. Clasificación de sanitizantes y mecanismo de acción.	30
Tabla 5. Zonas y objetos de limpieza en una fábrica de pan, y posibles alternativas de métodos mecanizados.	35
Tabla 6. Equipos utilizados durante la fase experimental.	39
Tabla 7. Determinación y métodos utilizados durante la fase experimental	40

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ejemplificación de contaminación cruzada en alimentos desde el hogar.	11
Figura 2. Diagrama representando la taxonomía del género <i>Salmonella</i>	16
Figura 3. Proceso de formación de las biopelículas bacterianas en una superficie.	22
Figura 4. Formación de biopelículas de <i>Salmonella typhi</i> a diferentes tiempos de incubación y teñidas con azul de metileno	44
Figura 5. Formación de biopelículas de <i>Salmonella</i> Montevideo a diferentes tiempos de incubación y teñidas con azul de metileno.	45
Figura 6. Formación de biopelículas de <i>Escherichia coli</i> a diferentes tiempos de incubación y teñidas con azul de metileno.	46
Figura 7. Promedio del conteo de colonias de <i>Salmonella typhi</i> posterior al uso de los sanitizantes en concentraciones establecidas por el fabricante.	47
Figura 8. Promedio del conteo de colonias de <i>Salmonella</i> Montevideo hecho posterior al uso de los sanitizantes en concentraciones establecidas por el fabricante.	48
Figura 9. Promedio del conteo de colonias de <i>Escherichia coli</i> hecho posterior al uso de los sanitizantes en concentraciones establecidas por el fabricante.	49
Figura 10. Promedio obtenido en las pruebas cuantitativas realizadas a <i>Salmonella typhi</i> evaluando la efectividad de los sanitizantes a diferentes tiempos y dosis.	51
Figura 11. Promedio obtenido en las pruebas cuantitativas realizadas a <i>Salmonella</i> Montevideo para evaluar la efectividad de los sanitizantes a diferentes tiempos y dosis.	52
Figura 12. Promedio obtenido en las pruebas cuantitativas realizadas a <i>Escherichia coli</i> para evaluar la efectividad de los sanitizantes a diferentes tiempos y dosis.	54

RESUMEN

Microorganismos como *Salmonella* y *Escherichia* tienen la capacidad de adherirse, crecer y formar biopelículas en superficies que forman parte de los equipos utilizados en la industria y que están en contacto con alimentos o materias primas usadas para la fabricación de productos alimenticios. Dichas capacidades son muy importantes en el sector alimentario porque pueden ocasionar problemas que perjudican los procesos al generar pérdidas de energía, taponamiento de membranas, reducción de flujo en tuberías o aumentar costos al estropear el funcionamiento de equipos, así que con el propósito de eliminar dichas biopelículas las industrias hacen uso de sanitizantes químicos que después de su uso dejan residuos que podrían llegar a contaminar el producto durante o al final de su elaboración y distribución.

El objetivo de este trabajo fue comprobar la eficacia de diferentes sanitizantes comerciales de origen natural en la disminución o eliminación de biopelículas formadas por *Salmonella typhi*, *Salmonella* Montevideo y *Escherichia coli*. Primero se estableció la capacidad de cada bacteria para formar biopelículas en placas de acero inoxidable, a dichas biopelículas se les dejó actuar los diferentes sanitizantes bajo las condiciones de elaboración y uso establecidas por el fabricante, una vez que se determinó su efectividad se hicieron cambios en la dosis del sanitizante y el tiempo de acción con la intención de observar mejorías.

Se demostró que algunos de los sanitizantes evaluados pueden eliminar la biopelícula o reducir la carga microbiana en las placas de acero inoxidable si se usan en las condiciones establecidas por el fabricante, y al aumentar la dosis o el tiempo de acción se observó un aumento en la efectividad de los sanitizantes para reducir la carga microbiana o eliminar por completo la biopelícula creada en placas de acero inoxidable.

1. INTRODUCCIÓN

Posiblemente el mayor desafío que se ha presentado en la industria alimentaria es la creación de áreas libres de contaminantes, toxinas y bacterias perjudiciales, tanto para el alimento como para el consumidor. Gran cantidad de métodos y diferentes sustancias de limpieza y desinfección se han empleado a lo largo de los años con el objetivo de crear una estrategia que asegure la inocuidad durante todo el proceso de fabricación. En todas estas estrategias han existido tres constantes en el mantenimiento del proceso alimenticio libre de patógenos dañinos, estos son la desinfección correcta de las áreas, aplicaciones estrictas de normativas higiénicas y el uso de acero inoxidable en equipos y/o superficies de trabajo.

El análisis de las superficies con las que contactan los alimentos exige técnicas que garanticen el desprendimiento del microorganismo de su matriz, ya que existen microorganismos formadores de biopelículas los cuales poseen capacidad de unirse firmemente a superficies, generando una matriz que los proteja de la actividad de sustancias químicas o actividad física como roces (Mortimore, 2004).

Los peligros que representan las biopelículas han sido la razón por la cual la industria alimentaria ha creado técnicas de sanitización que hacen uso de detergentes y sanitizantes químicos, que resultan ser muy efectivos para desprender los microorganismos, pero deterioran o dañan al alimento que tenga contacto con algún residuo de esas sustancias.

Por tal motivo se han hecho investigaciones sobre la efectividad que presentan los sanitizantes de origen natural en el desprendimiento de biopelículas para sustituir los detergentes y sanitizantes químicos, por sustancias que no alteren ni dañen el alimento.

En este trabajo se revisará el comportamiento de biopelículas formadas por bacterias Gram negativas ante sanitizantes de origen natural.

2. ANTECEDENTES

2.1 Contaminación alimentaria.

Se entiende por contaminación alimentaria a toda la materia que se incorpora al alimento sin ser propia de él que tiene la capacidad de modificar las características organolépticas del alimento de una forma negativa o causar una enfermedad a quien lo consume, puede percibirse el daño o encontrar un alimento contaminado que parece completamente inocuo, aunque realmente no lo está (PAHO, 2014). (Ver Fig.1)

En un mundo rodeado y lleno de microorganismos que no pueden ser identificados a simple vista, los alimentos son susceptibles de sufrir algún tipo de contaminación a medida que se producen y preparan (FAO, 2013). En el caso de la industria alimentaria se encuentran diferentes fuentes de contaminación cruzada como:

- Utensilios y equipos. Estos deben ser higienizados de forma correcta y constantemente ya que pueden convertirse en un foco de contaminación microbiológica constante debido a la formación de biopelículas.
- El hombre. Como manipulador de alimentos se convierte en el factor de mayor riesgo debido a su continuo contacto con ellos, de ahí que se deban extremar las buenas prácticas de manipulación, principalmente en la indumentaria de trabajo y en la higienización de las manos.
- Insectos, roedores, aves. Estos animales padecen y transmiten enfermedades que pueden afectar al hombre o que pueden llegar a tener contacto con el alimento, por ello es imprescindible que se aplique un buen programa de control de plagas.
- Agua. El agua puede ser un vehículo de sustancias tóxicas, microorganismos, metales pesados, etc.
- Ambiente. Pueden ser un vehículo de sustancias tóxicas y microorganismos que afecten el alimento (Garcinuño, 2017).



Figura 1. Ejemplificación de contaminación cruzada en alimentos desde el hogar (FAO, 2013).

Existen 3 tipos de peligros a los que puede estar expuesto un alimento, los físicos son la presencia de objetos como plástico, vello o vidrio que pueden pasar desapercibidos al momento de consumirlos y causarle algún daño físico al consumidor.

Los riesgos químicos son la presencia de sustancias como pesticidas, desinfectantes o contaminantes tóxicos que sean usados para tener un control de plagas y puedan adherirse al alimento generando una toxicidad en el consumidor. Los riesgos biológicos, el principal motivo de la existencia de las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs), es la presencia de bacterias, virus, parásitos y toxinas microbianas que al entrar al sistema del consumidor este puede presentar una enfermedad de carácter infeccioso o tóxico (FAO/OMS, 2007).

La Organización Mundial de la Salud declara anualmente miles de casos de enfermedades, de origen microbiano, causadas por la contaminación de alimentos. Las ETAs son generalmente de carácter infeccioso o tóxico y son causadas por bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas que penetran en el organismo a través del agua o los alimentos contaminados, bacterias como *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* y *Listeria* figuran entre los patógenos de transmisión alimentaria más

comunes que afectan a millones de personas cada año, a veces con consecuencias graves o mortales (FAO/OMS, 2015).

En la tabla 1 se muestran los diferentes microorganismos que se han aislado a partir de biopelículas halladas en la industria de alimentos.

Tabla 1. Biopelículas encontradas en la industria de alimentos.

Lugar	Aislados de los biofilms (%)	Referencia
Planta de procesamiento de leche, líneas de pasteurización	<i>Bacillus cereus</i> (12) <i>Escherichia coli</i> (11) <i>Staphylococcus aureus</i> (8)	Sharma y Anand, 2002
Plantas de helados, cinta transportadora o unidad de alimentación	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Shigella sp.</i>	Gunduz y Tuncel, 2006
Unidad procesadora de caviar	<i>Neisseriaceae</i> (25) <i>Pseudomonas</i> (6) <i>Vibrio</i> (10) <i>Listeria</i> (3)	Bagge-Ravn y col, 2003
Planta de procesamiento de pescado	<i>Pseudomonas</i> (66) <i>P. fluorescens</i> <i>P. putida</i> <i>Enterobacteriaceae</i> (27) <i>Serratia liquefaciens</i>	Guobjornsdottir y col, 2005

Tomado de: Biofilm formation and food safety in food industries (p.408), por Shi y Zhu, 2009.

2.2 *Escherichia coli*

La bacteria *Escherichia coli* fue inicialmente aislada y descrita por el pediatra alemán Escherich en 1885, quien demostró su existencia como huésped habitual del intestino. La denominó “*Bacterium coli commune*”, que puede traducirse como “bacteria común del colon”. Es la especie predominante de la microbiota aerobia y facultativa del tracto gastro-intestinal de los animales de sangre caliente y se elimina por las heces al exterior. A pesar de ser el microorganismo facultativo predominante representa una muy pequeña proporción del contenido total de bacterias en este sitio anatómico (Todar, 2008). *Escherichia coli* por su especificidad está considerado como un buen indicador de contaminación fecal, además vive poco tiempo en el ambiente por lo que su presencia en los alimentos indica que la contaminación es reciente (Forsythe, 2003).

Se caracteriza por ser un bacilo Gram negativo, no esporulante, productor de indol a partir de triptófano, no utiliza el citrato como fuente de carbono y no produce acetoina. Además, fermenta la glucosa y la lactosa con producción de gas. Es una bacteria mesófila, su temperatura óptima de desarrollo se encuentra entre los 35-43 °C. La temperatura límite de crecimiento se sitúa alrededor de 7 °C, lo que indica un control esencial y eficaz de la cadena de frío en las industrias alimentarias para evitar el crecimiento en los alimentos. La congelación tiene pocos efectos sobre la población en el alimento y no garantiza la destrucción de un número suficiente de bacterias viables para asegurar su inocuidad (Todar, 2008).

Es sensible a temperaturas superiores a 70 °C, a partir de la cual son fácilmente eliminadas. Además de la temperatura, el pH y la actividad de agua pueden influir en la proliferación de *Escherichia coli*. Las condiciones óptimas de desarrollo para estos parámetros son de 7.2 y 0.99 respectivamente. El desarrollo se detiene a pH extremos (inferiores a 3.8 o superiores a 9.5), y valores de a_w inferiores a 0.94. Por ello, el grado de acidez puede constituir un factor de protección y garantizar su seguridad.

Con base en su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *Escherichia coli* causantes de diarrea se clasifican en seis grupos: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC o VTEC o STEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y adherencia difusa (DAEC) (Anderson, 2005).

La capacidad de cepas patógenas de *Escherichia coli* para causar distintos tipos de infecciones extraintestinales se correlaciona con la expresión de múltiples factores de virulencia incluyendo adhesinas, toxinas, sideróforos, sistemas de secreción, formación de biopelículas y otros factores que contribuyen conjuntamente a potenciar su patogenicidad.

Su capacidad de formar biopelículas está relacionada con el gen que expresa la fimbria curli, esta se ha visto involucrada en la agregación celular, formación de biofilms y también media la adhesión e invasión de células eucariotas (Barnhart y Chapman, 2006).

Para la formación de biofilms, *Escherichia coli* emplea flagelos, pilis y proteínas de membrana para iniciar la adhesión. Cuando ya está unida a la superficie pierde sus flagelos e incrementa la producción de sustancias poliméricas extracelulares (Houdt y Michiels, 2005).

Estudios han encontrado que algunas cepas de *Escherichia coli* pueden desarrollar biopelículas como resultado de una mayor producción de exopolisacáridos y curli (Ryu, 2004). En la tabla 2 se muestran los determinantes de superficie implicados en las diferentes fases de formación de biopelícula. Además, cabe destacar que la formación de biofilms les proporciona una mayor resistencia cuando éstas se exponen a soluciones de hipoclorito, uno de los desinfectantes de mayor uso en la industria alimentaria (Wilks y col. 2005; Ryu y Beuchat, 2005) provocando así graves problemas en el sector industrial.

Tabla 2. Determinantes de superficie de *Escherichia coli* en la formación de biopelículas.

Fase de formación	Determinantes de superficie
Acondicionamiento y adhesión reversible	Flagelos y movilidad
Adhesión irreversible	Fimbrias tipo I Curli Sustancias poliméricas extracelulares
Etapas inicial de crecimiento	Motilidad Curli Antígeno 43 (proteína autotransportadora) Sustancias poliméricas extracelulares
Maduración	Sustancias poliméricas extracelulares Curli Pili conjugativo
Dispersión	Flagelos y movilidad

Tomado de: Role of bacterial cell Surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation (p.631), por Houdt y Michiels, 2005.

2.3 *Salmonella*

Salmonella pertenece a la familia Enterobacteriaceae. La mayoría de sus miembros se encuentra en el tracto intestinal del hombre y los animales como bacterias patógenas o comensales. Son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos no esporulados de 2 a 3 x 0.4 a 0.6 micras de tamaño. Son microorganismos quimioorganotrofos con pocos requerimientos nutricionales por lo que pueden crecer en medios de cultivo relativamente simples, tienen capacidad para metabolizar nutrientes por las vías metabólicas respiratorias y fermentativa (Doyle, 2001). Poseen metabolismo fermentativo y oxidativo, fermentan glucosa con producción de ácido y gas (exceptuando *S. typhi*), son oxidasa negativa y catalasa positiva. *Salmonella* es

la enterobacteria de mayor importancia a nivel de salud pública por producir trastornos del tracto gastrointestinal y septicemia no solo en los seres humanos sino en todas las especies animales (Lujan y Blas, 2007). Al ser parásitos intracelulares y por medio de los macrófagos en los que se encuentran, se diseminan por todo el organismo afectado aprovechando la vía linfática y sanguínea (Stanchi, 2007). Como se puede ver en la figura 2, las especies y subespecies del género *Salmonella* están extensamente diseminados en la naturaleza como comensales y como patógenos del aparato digestivo de los mamíferos domésticos y silvestres, aves, reptiles e insectos, en los cuales pueden llegar a producir una gama de enfermedades diferentes entre sí (Smith y Ahmer, 2003).

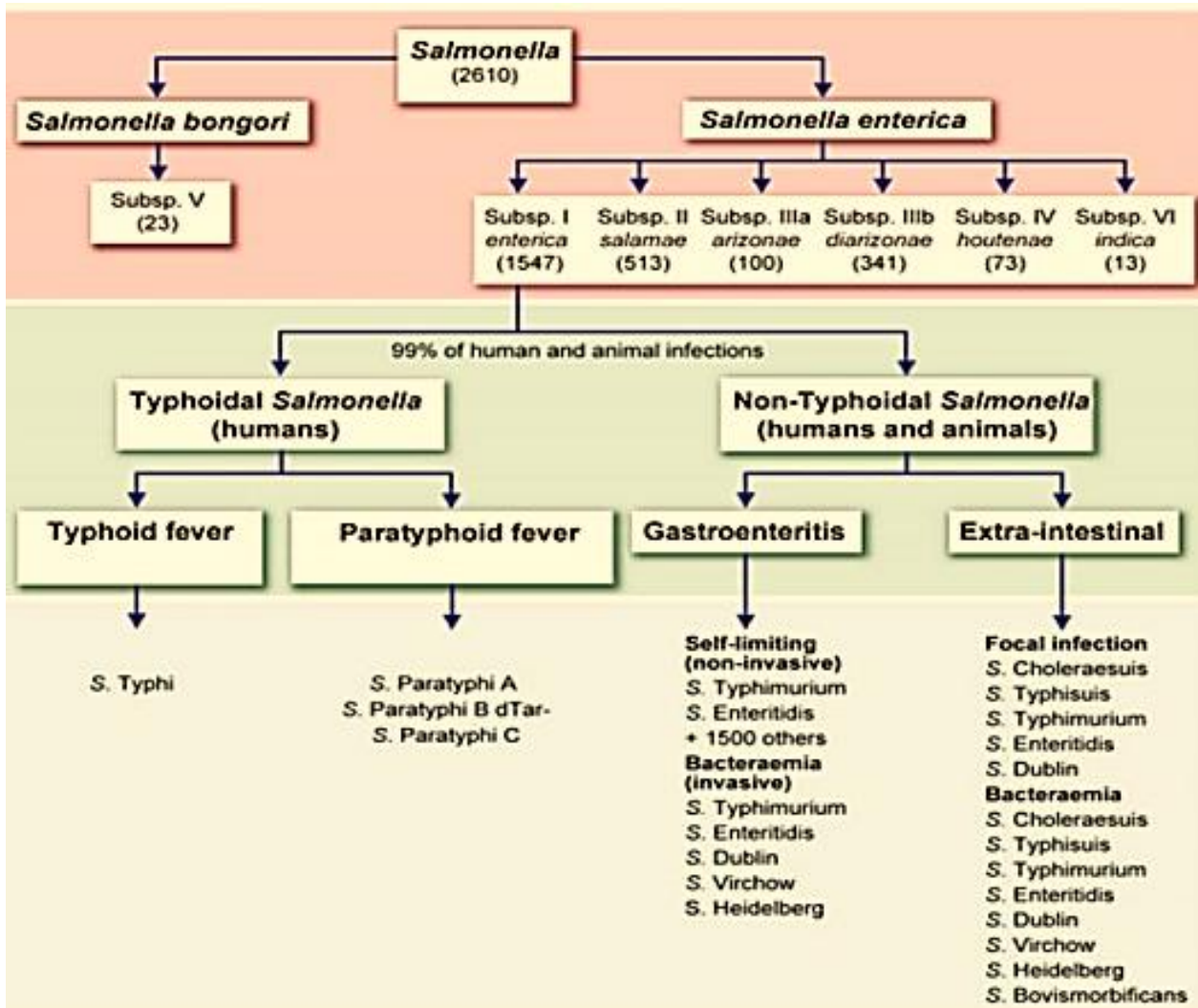


Figura 2. Diagrama representando la taxonomía del género *Salmonella*. Tomado de Langridge y col. 2008.

Uno de los factores que favorecen la persistencia de *Salmonella* en varios ambientes es su capacidad de formar biopelículas sobre diferentes tipos de superficies, inertes y vivas. Esta habilidad contribuye a su supervivencia tanto en ambientes hostiles como también en condiciones favorables para su desarrollo, así aumenta su capacidad de contaminar alimentos y al ser humano, esto se debe a que posee estructuras de superficie, como la SEF17 fimbriae, que les facilitan la adhesión a las superficies inanimadas (Austin, 1995). Dicha habilidad le permitiría a *Salmonella* sobrevivir a largo plazo en granjas de aves de corral y así contaminar la carne y huevos o alimentos derivados, convirtiéndolos en vehículos principales de los brotes de salmonelosis de origen alimentario (Lianou, 2012).

El género *Salmonella*, definido por su conjunto de características bioquímicas, reúne cerca de 2,500 tipos serológicos; cada tipo serológico a su vez está caracterizado por antígenos específicos que pueden ser identificados mediante pruebas serológicas. Los antígenos que caracterizan los tipos serológicos de las salmonellas son los antígenos O (somáticos), y los antígenos H (flagelares); algunos presentan el antígeno denominado Vi (White y col, 2008).

La identificación de los serotipos sobre la combinación antigénica está dada en el esquema de Kauffmann-White, el cual agrupa todas las serovariedades conocidas de *Salmonella sp.* Este esquema plantea las diferencias mediante la identificación de los antígenos de superficie que se producen en la bacteria. La especificidad del factor "O" (somático) de *Salmonella sp.* se determina por la composición y la estructura de la cadena polisacárida O del lipopolisacárido. *Salmonella sp.* se clasifica en serogrupos que surgen del antígeno somático O; a estos grupos se los designa con letras mayúsculas, por ejemplo, A, B, C, D, E, etc, (Bonne, 2001). (Ver tabla 3)

En México, las técnicas microbiológicas para la identificación de *Salmonella* que actualmente se usan en laboratorios están basadas en el uso de medios de cultivos, consisten principalmente en el pre-enriquecimiento, enriquecimiento selectivo, aislamiento en medios de cultivo, identificación bioquímica y la identificación serológica, con la que concluye la identificación específica del patógeno (NOM-114-

SSA1-1994). Estudios realizados en la industria alimentaria demostraron que existen diferencias entre los distintos serotipos de *Salmonella* entérica en la facilidad de producir biofilms y en la perdurabilidad de los mismos (Vestby, 2009).

2.4 *Salmonella typhi*

La temperatura óptima descrita para su crecimiento es entre 35 y 37°C, abarcando un intervalo de un mínimo de 7°C, y un máximo de 45°C. A temperaturas de congelación se produce una disminución inicial rápida del número de microorganismos viables, pero tiene la habilidad de sobrevivir por largos periodos de tiempo en almacenamiento congelado (Doyle, 2001). La resistencia de *Salmonella typhi* a las altas temperaturas aumenta en la medida en que la actividad de agua de los alimentos disminuye, en condiciones de pH bajo, la resistencia al calor se reduce (Podolak, 2010).

Los seres humanos son el único reservorio de este organismo, por lo tanto, las vías de transmisión son principalmente desde agua o desde portadores humanos. Los portadores pueden albergar el organismo en su vesícula biliar. Los alimentos pueden contaminarse con los manipuladores de alimentos o mediante el uso de superficies o agua contaminada durante el procesamiento. Una vez ingerida, se multiplica en el interior de los macrófagos y se extiende por todo el cuerpo a través del torrente sanguíneo, viaja hasta la médula ósea, el hígado y la vesícula biliar, liberándose en la bilis y en las heces. Los portadores asintomáticos pueden propagar la enfermedad como consecuencia de la colonización de la vesícula biliar (Molina, 2010).

2.5 *Salmonella* Montevideo

Salmonella serovar Montevideo (SM) con frecuencia se asocia a infecciones en humanos y es causa de enfermedades gastrointestinales, los casos son comunes particularmente entre individuos que tienen contacto cercano con aves de corral

vivas o productos de carne de aves de corral. Se ha encontrado persistentemente en algunas fábricas noruegas de piensos y harina de pescado durante varios años. *Salmonella* Montevideo ha mostrado gran capacidad de producir biopelículas en superficies de poliestireno y en interfaz líquido-aire (Vestby, 2009).

Tabla 3. Serotipos de *Samonella* y su serogrupo.

Serotipo	Nombre	Serogrupo
Typhi	Salmonella entérica, subsp. entérica, serotipo Typhi	D
Paratyphi A	S. entérica, subsp. entérica, serovar Paratyphi A	A
Paratyphi B	S. enterica, subsp. entérica, serovar Paratyphi B	B
Paratyphi C	S. enterica, subsp. entérica, serovar Paratyphi C	C
Typhimurium	S. enterica, subsp. enterica, serovar Typhimurium	B
Enteritidis	S. enterica, subsp. enterica, serovar Enteritidis	D
Newport	S. enterica, subsp. enterica, serovar Newport	C

Modificado de: Hunter's tropical medicine and Emerging Infectious Diseases. 9th ed. Philadelphia: Saunders, 2013. (Ninth Edition)

2.6 Biopelículas

Se sabe que las bacterias pueden existir en la naturaleza bajo dos disposiciones:

- a) bacterias planctónicas, de libre flotación y suspendidas en un fluido
- b) bacterias sésiles (formadoras de biopelículas) creciendo en colonias de microorganismos adheridas a superficies sólidas.

Se estima que el 99% de todas las células bacterianas existen bajo la forma de biopelículas y tan sólo 1% viven en un momento dado, flotando libremente o en estado planctónico (Ramadan y col., 2005).

Las biopelículas bacterianas se definen como comunidades sésiles microbianas que están unidas a una sustancia, superficie o entre sí. Son una agregación de microorganismos rodeadas por una matriz que está compuesta por una mezcla de sustancias extracelulares poliméricas (SEP) (Costerton y col, 1999).

Las SEP protegen a los microorganismos contra agentes antimicrobianos, previenen el acceso de biocidas, quelantes o toxinas, evitan la deshidratación, refuerzan la resistencia de la biopelícula al estrés ambiental y permiten a los microorganismos capturar los nutrientes, siendo muy difíciles de eliminar (Ledeboer, 2012).

Este complejo multicelular está rodeado por una matriz extracelular compuesta por exopolisacáridos. Los componentes principales de la matriz son el curli y la celulosa. El curli es una proteína que forma fibras amiloides, es producida por ciertas cepas de enterobacterias (Sutherland, 2001). Las fimbrias de curli están involucradas en la adhesión superficial, la agregación celular, la persistencia en el medio ambiente, la producción de biopelículas y la adhesión e invasión de las células huésped (Barnhart y Chapman 2006). La producción de celulosa confiere adherencia a las superficies abióticas y las interacciones entre células bacterianas (Römling, 2007).

Tanto cepas comensales como patógenas tienen posibles adhesinas que podrían participar en el proceso de adherencia. El ejemplo más estudiado son las fimbrias de tipo 1, que se pueden encontrar en la mayoría de las bacterias Gram negativas, incluyendo *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*., *Klebsiella spp.* y *Vibrio cholerae* (Edwards y Puente, 1998).

Las biopelículas pueden encontrarse en cualquier nicho ecológico, son de particular importancia para la industria alimentaria y para los alimentos perecederos en particular. En esencia, si las bacterias están presentes en cualquier superficie que combine abundante humedad y nutrientes, es susceptible a la formación de biopelículas (Galli y col., 2016).

La formación de biopelículas ha sido observada en la mayoría de las bacterias encontradas en ambientes naturales, en dispositivos clínicos y superficies industriales, pudiéndose convertir en una fuente constante de contaminación en la industria de procesamiento de alimentos (Zahir y col., 2015). Aunque las biopelículas pueden tener solo una especie bacteriana (patógeno o deteriorante), usualmente varias especies están presentes en ellas al mismo tiempo.

2.7 Formación de biopelícula

El proceso para la formación de biopelículas depende de diferentes factores, como las interacciones entre las células bacterianas (forma microbiana, estructura, composición molecular, presencia de flagelos, pili, cápsulas o sustancias exopoliméricas), la superficie de unión y las condiciones ambientales (pH, nutrientes disponibilidad, temperatura, proteínas del huésped y dinámica de fluidos) (Stoodley, 2002). Dicho proceso se puede observar en la figura 3 y en él se pueden identificar cinco fases: la unión de la bacteria a la superficie, la formación de una o varias monocapas que se convierten en microcolonias y forman multicapas, maduración, crecimiento y división del microorganismo; posteriormente se da una producción del exopolímero y el desarrollo final de la colonia con dispersión de células colonizadoras.

Todo el proceso inicia con la adherencia de células a la superficie, formando microcolonias por la activación de sus genes y producción de sustancias poliméricas extracelulares. El mecanismo de adhesión puede ser activo o pasivo dependiendo de la motilidad de las células. Una adhesión pasiva se da por gravedad, difusión y dinámica del fluido. En la adhesión activa los flagelos permiten la movilidad de las células hasta el sitio de adhesión, los pili, proteínas de adhesión cápsulas y cargas de las superficies, facilitan el proceso de agregación y adhesión (Chmielewski y Frank, 2003).

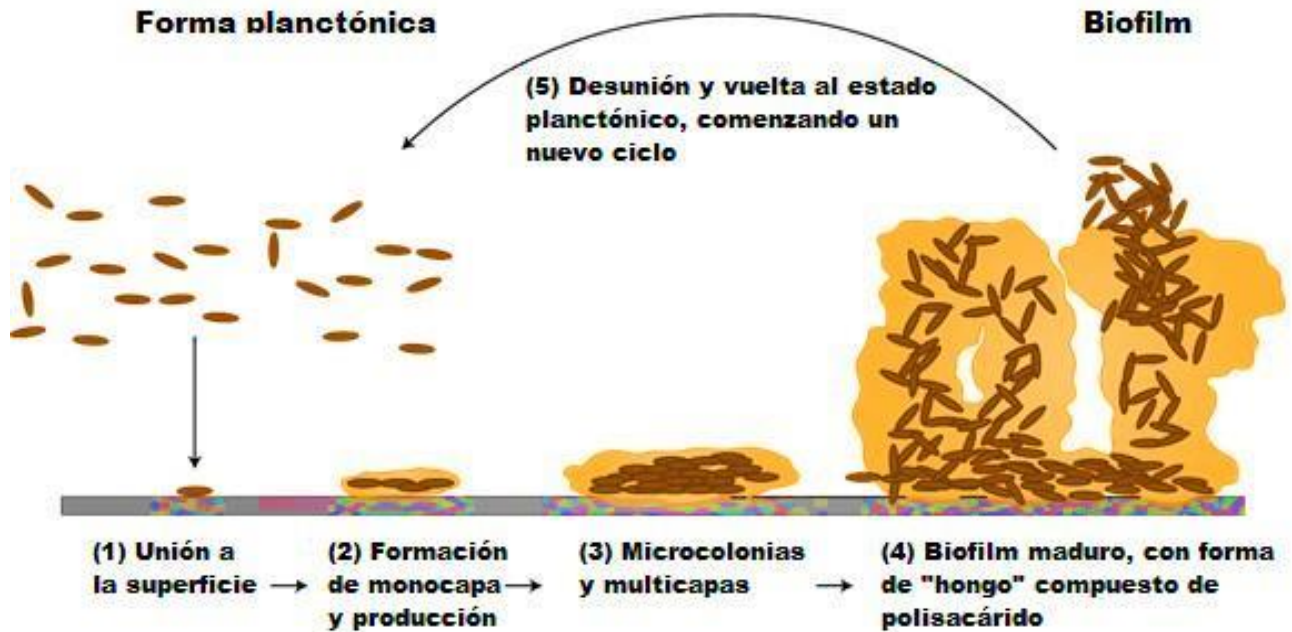


Figura 3. Proceso de formación de las biopelículas bacterianas en una superficie (British Society for Immunology, 2011).

Los diferentes tipos de bacterias que forman una biopelícula se comunican a través de un mecanismo de señalización célula-célula conocido como quorum sensing o autoinducción. Definido como un mecanismo en donde hay acumulación de moléculas señalizadoras, inductoras, llamadas péptidos estimulantes de competencia (CSP), que le permiten a una bacteria "saber" la densidad poblacional y cuándo ha alcanzado un valor crítico para que respondan de una manera fijada genéticamente. Las bacterias Gram negativas producen N-acilmonoserinas, como moléculas señal, que al acumularse en altas concentraciones en la biopelícula activan un receptor específico que altera la expresión de genes afectando a distintos fenotipos celulares (Marsh, 2004).

Una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie, comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia similar a la que ocurren cuando se forman colonias en placas de agar. En una etapa posterior la bacteria secreta un exopolisacárido que constituye la matriz de la biopelícula y forma unas estructuras similares a las de un hongo entre las cuales se observa la presencia de canales. La composición del exopolisacárido es diferente en

cada bacteria y varía dependiendo de especie (Lasa, 2009). La biopelícula desarrolla su estructura con canales, poros y redistribución celular; permitiendo el paso de nutrientes a la bacteria hasta el interior de la biopelícula.

Si las condiciones son adecuadas para un crecimiento suficiente de la biopelícula se desarrollará una estructura organizada. A este proceso se le denomina maduración. Una biopelícula madura puede consistir en una simple capa de bacterias, en un polímero extracelular poroso o en múltiples capas de microcolonias sueltas o embebidas por las sustancias poliméricas extracelulares, que puede contener polisacáridos o glicoproteínas de distintos azúcares (glucosa, fructosa, manosa, N-acetilglucosamina, etc.). También puede contener proteínas libres, fosfolípidos, ácidos teicoicos y ácidos nucleicos (Branda y col. 2005).

A medida que madura la biopelícula, se va adaptando a la presencia de nutrientes, al oxígeno y a los cambios poblacionales, formando microcolonias discretas separadas por canales de agua. Las bacterias con un metabolismo más activo permanecen en la superficie de las capas de la matriz, cerca de los canales de agua. Los canales permiten la dispersión y el intercambio de sustancias orgánicas, cationes metálicos y metabolitos. Los nutrientes se atrapan, se concentran en la matriz y se mueven por ésta por difusión. El número de bacterias viables se reduce con la edad de la biopelícula y finalmente, algunas bacterias de la matriz se liberan del mismo para poder colonizar nuevas superficies cerrando el proceso.

Los tres principales procesos que permiten la liberación celular son la erosión (eliminación continua de pequeñas porciones de biopelícula), la muda (liberación rápida y masiva) y la abrasión (desprendimiento debido a la colisión de partículas de líquido contra la biopelícula) (Donlan, 2002) (Lasa et al., 2009).

Las biopelículas bacterianas les permiten sobrevivir en escenarios impredecibles y bajo condiciones de estrés, tales como cambios de temperatura, pH, secado, y luz ultravioleta, entre otros. Las bacterias en las biopelículas pueden ser 100 veces más resistentes a antibióticos y hasta 300 veces más resistentes a algunos agentes desinfectantes (Galli et al., 2016).

Biopelículas formadas en tuberías, filtros y entornos cargados de partículas suelen estar sujetos a la dispersión por abrasión. La forma en que se produce la dispersión afectaría, aparentemente, las características fenotípicas de los microorganismos. Los conglomerados desprendidos desde la biopelícula conservarían, probablemente, ciertas características de éste, tales como la resistencia antimicrobiana. En cambio, las células bacterianas liberadas de manera aislada, parecen volver rápidamente a su fenotipo planctónico, tornándose nuevamente susceptibles a las defensas del huésped y a los antimicrobianos.

La liberación de bacterias desde biopelículas también se ha demostrado que es un proceso especie específico. Este proceso proporciona un mecanismo de migración bacteriana desde áreas fuertemente colonizadas que han sido agotadas de nutrientes a áreas más favorables para el crecimiento (Donlan y Costerton, 2002).

El crecimiento de la población bacteriana se produce dentro de la matriz extracelular y está limitado por la disponibilidad de nutrientes y la capacidad de las células para eliminar los residuos propios del metabolismo.

2.8 Factores que intervienen en el desarrollo de la biopelícula.

Existen varios factores que influyen en el desarrollo de la biopelícula como son las propiedades de las superficies de contacto, el tiempo de contacto, las características de la superficie bacteriana, la disponibilidad de nutrientes, composición de la comunidad microbiana y la disponibilidad de agua. (González, 2005; Fuster, 2006)

El tipo de sustrato influye en las características de la unión. Las bacterias tienden a unirse a las superficies hidrófilas uniformemente en una capa, mientras que en el caso de las superficies hidrófobas tienden a unirse en grupos. Las superficies rugosas acumulan suciedad y son más difíciles de limpiar que las lisas. En consecuencia, los defectos de las superficies proporcionan protección a la suciedad y los microorganismos, lo que hace que las bacterias puedan volver a multiplicarse y formar biopelículas (Fuster, 2006).

El acero inoxidable se usa frecuentemente como material para la cocina y en las instalaciones industriales porque es resistente a los golpes y corrosión, dura mucho tiempo y es de sencilla fabricación, a escala microscópica se observa que el acero presenta diminutas irregularidades que permiten una mayor retención de bacterias por el incremento del número de puntos de adhesión (Boyd y col. 2001).

Con respecto al tiempo de contacto (exposición), un mayor tiempo de contacto entre las células y el sustrato permite que se establezca un mayor número de uniones haciendo la adhesión irreversible, y, por tanto, factores como las condiciones ambientales, tipo de microorganismo, sustrato y presión en el caso de superficies de trabajo o utensilios, pueden también influir de manera importante en la mayor posibilidad de formación de la biopelícula (Pérez-Rodríguez y col, 2008).

Las características de la superficie celular como los flagelos, pili, proteínas de adhesión y cápsulas ejercen también su influencia. Los pili actúan como un velcro para anclar las bacterias a algunas superficies y también actúan como quimiorreceptores, dirigiendo a la bacteria hacia algunos sitios específicos. La pérdida de estos apéndices cambia las propiedades de superficie de la bacteria, lo que puede provocar una menor capacidad de adhesión (González, 2005).

Una de las técnicas que permite evaluar la adhesión de bacterias y el seguimiento del crecimiento microbiano es el método colorimétrico, en el cual por medio de la tinción de las células fijas con cristal violeta, azul de metileno o safranina y su posterior lavado, se analizan varias cepas en un tiempo estimado para observar la adherencia de las células teñidas después de la etapa de lavado.

Industrias como mataderos y procesadoras de alimentos son lugares favorables para la formación de biopelículas porque ofrecen condiciones ideales para el desarrollo de estas estructuras (Chmielewski y Frank, 2003). En la industria alimenticia también existe la posibilidad de que se generen biopelículas formadas por diferentes especies, estas biopelículas son más gruesas y estables frente al estrés ambiental que las formadas por una sola especie.

En una superficie, el grosor medio de las biopelícula es de 15 y 30 μm respectivamente, mientras que una biopelícula formada por ambas especies bacterianas presenta un grosor de 40 μm (Kumar y Anand, 1998). Esto se atribuye a la secreción combinada de las distintas sustancias poliméricas extracelulares resultantes de los diferentes microorganismos (Chmielewski y Frank, 2003).

También está bien establecido que las biopelículas bacterianas muestran más resistencia a los antimicrobianos que las células individuales cultivadas en suspensión (Kumar y Anand, 1998; Knowles y Roller, 2001; Chavant y otros, 2004).

Los microorganismos pueden formar parte de un ecosistema microbiano actuando como colonizadores primarios, o como socios de biopelículas posteriores estableciendo interacciones con otros microorganismos (Kolenbrander 2000).

La formación de dichas biopelículas puede generar pérdidas económicas debido al deterioro de las instalaciones y equipos, así como al deterioro de los alimentos (Hung y Henderson, 2009). También son un problema importante en la salud pública porque el rompimiento de estas estructuras puede provocar la liberación de microorganismos patógenos y, en consecuencia, la contaminación del producto.

La prevención de formación de biopelículas en las superficies es buscada a través de la utilización de agentes antimicrobianos bactericidas o bacteriostáticos o con el empleo de agentes desprovistos de acción antimicrobiana pero que interfieran o inhiban la adhesión bacteriana (Danese, 2002; Dunne Jr, 2002).

Para poder desarrollar estrategias, instrumentos o sustancias capaces de erradicar las biopelículas es necesario analizar los diferentes mecanismos de resistencia que se pueden presentar en las biopelículas. Se han descrito dos tipos de resistencia bacteriana, la correspondiente a las bacterias planctónicas las cuales presentan resistencia a los medicamentos, característica que está asociada a alguna mutación genética, y la de las bacterias que crecen dentro de biopelículas presentando una mayor barrera frente a biocidas, desinfectantes o agentes antimicrobianos que las células que viven en forma planctónica (Hollmann, 2011).

La obtención de nutrientes, el agua limitante, el diseño de equipos y el control de temperatura son aspectos importantes en el control de las biopelículas. Es muy frecuente, que las variables mencionadas no se puedan cambiar, por tanto, el control de la biopelícula se reduce a la efectividad en la limpieza que se realice sobre las áreas y equipos de proceso.

La limpieza puede estar acompañada por el uso de químicos o la combinación de procesos físicos y químicos. Los agentes químicos de limpieza que se usan disuelven residuos de los alimentos por la disminución de la tensión superficial, emulsificación de grasas y peptización de las proteínas (Austin y Bergeron, 1995).

Agentes alcalinos, presencia de quelantes, especialmente EDTA, han mostrado ser más efectivos en la remoción de biopelículas que la limpieza con agentes ácidos pero la principal limitación de los sistemas de limpieza reside en los problemas de acceso a diversas zonas como ranuras, grietas, finales ciegos, manchas de corrosión. Si la biopelícula queda como reservorio en estos puntos, la limpieza nunca podrá ser exhaustiva (Dunsmore, 1981).

Por otra parte, la acción misma de limpiar, química y mecánica, afecta a los materiales. Se ha podido demostrar que las condiciones de limpieza de una superficie tan inalterable como el acero inoxidable, cambia sus propiedades (Sinde y Carballo, 2000).

La adhesión de la biopelícula será diferente después de una limpieza alcalina o con ácido fuerte, las irregularidades que llegue a presentar la superficie permitirán el alojamiento de bacterias y de materia orgánica y, por lo tanto han de limpiarse a fondo, pero se deberá guardar un cierto equilibrio entre la intensidad de la limpieza y el mantenimiento de los instrumentos (LeClerq-Perlat y Lalande, 1994).

2.9 Sanitizantes

Se le llama sanitización a la acción de eliminar o reducir los niveles de partículas viables por medio de agentes físicos o químicos, posterior a la actividad de limpieza (NOM-059-SSA1-2006).

La sanitización de superficies y ambientes en industrias alimentarias es fundamental para garantizar la inocuidad del alimento, para evitar que pueda ser un punto de infección para el consumidor y conseguir una mayor vida comercial del producto.

El sanitizante es una sustancia que tiene acción sobre los microorganismos cuyo resultado es eliminar o disminuir la carga microbiana de superficies, equipos o utensilios. Según la EPA (Agencia de Protección Ambiental), se clasifican como sanitizantes todos los productos químicos utilizados sobre objetos o superficies en contacto con alimentos, con el objetivo de reducir carga microbiana (Garcinuño, 2009).

Cabe aclarar que una actividad de desinfección puede ser realizada por otros medios, no solamente por la aplicación de un agente químico, sino también por medios físicos como lo son la ebullición o la exposición prolongada a rayos ultra violeta o por medios químicos con la adición de agentes clorados, basados en amonio u otros. Algunos ejemplos de sanitizantes usados en la industria alimentaria son los productos que contienen hipoclorito de sodio, amonios cuaternarios, triclosán, soluciones yodóforas, ácidos peracéticos, dióxido de cloro, glutaraldehído entre otros (Secretaria de Salud, 1996).

Debido a que en la industria alimentaria el alimento está expuesto a todo tipo de factores que podrían ser un foco de contaminación, es necesario tener un sanitizante con capacidades germicidas y/o antimicrobianas que puedan asegurar la limpieza de las áreas de trabajo, las herramientas que se usen y las superficies en las que será puesto el alimento, pero un sanitizante químico capaz de lograr eso también es un riesgo de contaminación si no se hace un buen manejo de éste y si deja residuos en las zonas donde fue aplicado (Lonade y Blaker, 1981).

Esta es la razón de que se hayan hecho amplias investigaciones sobre la creación y uso de sanitizantes hechos a base de compuestos naturales que no tengan la capacidad de perjudicar el alimento y el material durante todo el proceso (Burt, 2004).

2.10 Factores que afectan la acción de los sanitizantes.

La actividad de los sanitizantes depende de una serie de factores, algunos inherentes a la sustancia, microorganismo que se desea eliminar o la forma de uso o aplicación. Depende en gran medida de la resistencia de los microorganismos en los que actúan.

Con este objetivo, las cepas utilizadas en los ensayos deben ser representativas de la flora bacteriana general a evaluar, así el número de microorganismos influye en la eficacia, lo que implica que la cantidad a usar de sanitizante o el tiempo de contacto sean directamente proporcionales a la cantidad de microorganismo que se va a evaluar, para así medir el nivel de inactividad que proporciona el sanitizante.

El tiempo de contacto y concentración del producto son probablemente el factor más importante que influye en la inactividad microbiana. Cuanto mayor es la concentración, por lo general su eficacia es mayor, y por tanto, el tiempo de contacto será menor. Un tiempo de contacto suficiente es un punto crítico para asegurar la reducción de la población bacteriana en los ensayos, asegurando que en un estado de contaminación fuera de los ensayos, el sanitizante evaluado cumplirá con su objetivo. (Holah, 1995). Algo importante que se debe tener en cuenta es que los microorganismos pueden encontrarse en zonas de difícil acceso, impidiendo la sanitización correcta. El diseño de las infraestructuras y equipos, la selección del tratamiento que se realice sobre ellos para limitar la adherencia de los microorganismos, son factores determinantes en la higiene de las superficies. (Maukonen y col, 2003)

También la temperatura de acción y el pH son factores que influyen en la efectividad de los sanitizantes, la potenciación o inhibición biocida puede cambiar si la temperatura es mayor a la óptima para el sanitizantes, o si se producen variaciones en el pH óptimo de acción generando la ionización y actividad de la sustancia. (Holah, 1995) Durante muchos años el hipoclorito de sodio fue el sanitizante de mayor uso a nivel mundial, por su eficacia y su costo, sin embargo, desde hace algunos años se ha promovido su eliminación debido a que se ha demostrado que al

reaccionar con materia orgánica forma compuestos órgano clorados tóxicos y mutagénicos, incluso en algunos países se prohibió su uso. Debido a esto es que han surgido diversas alternativas considerando sustancias químicas inocuas, entre ellas el ácido peracético y diversos ácidos orgánicos. (Gómez-López y col., 2014)

Tabla 4. Clasificación de sanitizantes y mecanismo de acción.

CLASIFICACIÓN		MECANISMO DE ACCIÓN	
INORGÁNICOS	Halogenados	Yoduros	Oxidación de componentes bacterianos y precipitación de proteínas.
		Cloruros	Desnaturalización proteica.
	Gases	Óxido de etileno	Inhibición irreversible de enzimas celulares.
	Metales pesados	Plata Mercurio	Reacción con los grupos SH de las proteínas microbianas. Inhibe actividad enzimática
	Oxidantes	Peróxido de hidrógeno Ac. Peracético	Producción de oxígeno molecular por la acción de catalasas tisulares.
ORGÁNICOS	Alcoholes	Etanol 70% Isopropanol 70%	Disuelven lípidos, alteran permeabilidad y desnaturalizan proteínas.
	Fenoles	Triclosan Resorcinol Eugenol	Disrupción de la membrana plasmática, desnaturalización de enzimas y rompe enlaces químicos de proteínas.
	Ac. Orgánicos	Ácido cítrico	Inhibición de metabolitos
	Compuestos cuaternarios de amonio	Detergentes	Alteran la integridad de la membrana, facilitan el arrastre mecánico del material contaminado. Inhiben enzimas.

Tomado de: Diseño e implementación del programa de control microbiológico de un laboratorio (p. 30), por González, 2011.

2.11 Sanitizantes de origen natural

El uso de compuestos antimicrobianos naturales en la industria de alimentos ha ganado atención debido a que el uso inapropiado de antibióticos ha dado lugar al dramático incremento de cepas multirresistentes, cepas más tolerantes a procesos de elaboración, conservación y sanitización química (Gyawali, 2014).

Los problemas toxicológicos asociados con el uso de ciertos sanitizantes químicos en alimentos han generado interés en la industria de los alimentos por el uso de compuestos naturales, ya que estos compuestos exhiben varios grados de actividad antimicrobiana (Delaquis, 2002).

Los sanitizantes de origen natural son productos hechos a base de sustancias naturales, la mayoría son a base de extractos cítricos o aceites esenciales que han presentado efectos germicidas debido a su mecanismo de acción donde presenta un efecto oxidante de las paredes celulares, modificando la estructura citoplasmática, alterando los procesos reproductivos y causando daño al ciclo vital del microorganismo, lo que finalmente causa la muerte (Witkowska y col, 2013). Este tipo de sanitizante a su vez puede ser combinado con conservadores y aditivos con la finalidad de prolongar la vida de anaquel del alimento, sin causarle una modificación de olor ni sabor (Kim y col. 1995).

Los sanitizantes naturales pueden clasificarse por su origen:

1. Origen animal, incluye proteínas, enzimas líticas tales como lisozima, hidrolasas tales como lipasas y proteasas (Beuchat y Golden, 1989) y polisacáridos como el quitosán (Davidson y Zivanovic, 2003).
2. Origen vegetal, incluye compuestos fenólicos provenientes de cortezas, tallos, hojas, flores, ácidos orgánicos presentes en frutos y fitoalexinas producidas en plantas (Beuchat y Golden, 1989).
3. Origen microbiano, incluye compuestos producidos por microorganismos.

Los ácidos orgánicos han mostrado amplia actividad contra microorganismos patógenos, siendo promovidos como una alternativa con una amplia aceptación por los consumidores, ya que la mayoría de ellos están presentes de manera natural en los alimentos. La ventaja que toman los ácidos orgánicos versus tratamientos químicos es que son generalmente reconocidos como inocuos para utilizarlos en el tratamiento y sanitización en la industria de alimentos (Cherry 1999).

El poder antimicrobiano de los ácidos orgánicos se debe a su forma no disociada, la cual depende del pH, y tiene más importancia que la disminución del pH extracelular que estos produzcan (Samelis et al., 2000).

La forma disociada al ser un anión, es altamente polar y, por lo tanto, no atraviesa fácilmente la membrana plasmática de los microorganismos; por el contrario, su forma no disociada sí atraviesa la membrana. Una vez en el interior de la bacteria, el ácido puede disociarse y entonces afecta directamente al pH intracelular microbiano (Doors, 1983). Esto puede afectar gravemente a su metabolismo, ya que afecta al gradiente de protones y de carga eléctrica con el exterior, e interfiere con los sistemas de transporte de aminoácidos y fosfatos. Además, muchas enzimas esenciales para el metabolismo microbiano se inactivan a pH ácido (Mountney y O' Malley, 1965).

También ocasiona un aumento del turgor celular; al producirse la disociación del ácido en el interior de la célula, la concentración interna de aniones se incrementa, esto desencadena un mecanismo de compensación de la carga eléctrica que obliga a la bacteria a aumentar los niveles de Na^+ y K^+ , lo que lleva a mayor fuerza iónica intracelular y del turgor, originando un gran aumento de la presión mecánica sobre la pared del microorganismo, lo que hace que eventualmente estalle (Juven y col., 1974).

La desinfección con ácidos orgánicos disminuye la prevalencia y la carga microbiana (Huffman, 2002). Es más efectivo contra Gram-negativos, ya que las Gram-positivos tienden a ser más resistentes (Bosilevac et al., 2006). Estos aditivos son reconocidos generalmente como seguros (GRAS), no presentan residuales tóxicos, por lo cual no

necesitan ser declarados en la etiqueta de los productos elaborados a partir de las mismas.

2.12. Técnicas y métodos de limpieza en la industria alimentaria.

El proceso de limpieza puede llegar a eliminar el 90% de los microorganismos de una superficie. La principal limitación de los sistemas de limpieza reside en los problemas de acceso a diversas zonas como ranuras, grietas, finales ciegos, manchas de corrosión. Si la biopelícula queda como reservorio en estos puntos, la limpieza nunca podrá ser exhaustiva. (Dunsmore, 1981)

La limpieza y sanitización son procedimientos muy importantes que condicionan directamente la calidad de los productos, por lo tanto, es claro que las operaciones que preceden a la sanitización: prelavado y lavado tienen una incidencia considerable en esta calidad. (Leveau, 2002)

Los sistemas de aplicación existentes son métodos aceptables para transportar el sanitizante a las zonas deseadas, el sistema más adecuado depende de las operaciones o áreas donde se apliquen, debe adaptarse a la suciedad y al objeto que se trata de limpiar, las características esenciales del método a elegir se reducen en forma y tamaño de los objetos a limpiar. (Wildbrett,2000) (Ver tabla 5.)

- Limpieza manual o cepillado. Se utilizan sanitizantes no agresivos para el operador, este método requiere eliminar la suciedad fregando con cepillos, raspadores o esponjas o pistolas de vapor que mezclan vapor y/o compuestos limpiadores por aspiración.
- Nebulización. Consiste en aplicar el desinfectante en forma de fina niebla que desinfecta el aire y las superficies de un lugar (Marriott, 2003). Pese a la delgada aplicación, la cantidad principal del líquido se escurre y se pierde. La película de líquido que se deja actuar el mayor tiempo posible; se puede aplicar sobre objetos imposibles o difíciles de empapar, como paredes, suelos, zonas inaccesibles, equipos de grandes superficies, cintas transportadoras, canales, etc. La desecación lenta ocasiona la concentración creciente del

principio activo, lo que inicialmente favorece el efecto desinfectante. (Wildbrett, 2000)

- Empapado o pulverización. Se basa en utilizar un sanitizante disuelto en agua, que se aplica en gran cantidad para asegurar una exposición extensiva. En las instalaciones abiertas debe trabajarse generalmente con una película de líquido, que en muchos casos actúa breve tiempo, por esta razón la desinfección solo requiere una escasa cantidad de solución por unidad de superficie (Wildbrett, 2000)
- Desinfección por inmersión. Esta técnica consiste en sumergir el equipo o partes de este y utensilios en un tanque que contenga la solución sanitizante. Esta desinfección por inmersión es equiparable a una desinfección in situ, con largos tiempos de actuación hay que reducir al mínimo los riesgos de corrosión, resulta defectuosa cuando las piezas no se sumergen del todo o si incluye aire (Wildbrett, 2000)
- Limpieza con ultrasonido. La limpieza mediante ultrasonido se utiliza en barricas, moldes y tapas, el transformador que produce las oscilaciones mecánicas puede introducirse en forma de sonda en los recipientes a limpiar. Por lo general se instala en tanques abiertos, en éstos se sumergen cestillos de alambre con el artículo a limpiar, o bien los objetos atraviesan este baño sobre una cinta transportadora. (Wildbrett, 2000)
- Desinfección COP (limpieza fuera de posición) o máquinas lavadoras. El equipo que funciona como unidad COP cuenta con un montaje de cepillado y otro para el enjuagado. Muchas unidades COP disponen de cepillos giratorios para limpiar tanto el exterior de las partes y utensilios, para que la solución limpiadora se introduzca a través de los cepillos que limpian el interior. (Marriot, 2003)
- Desinfección CIP (limpieza in situ o sin desmontar). Este método realiza una limpieza de partes completas de una planta o de circuitos de tuberías, realizada sin desmontar o abrir el equipo y con poca o ninguna intervención del operador. En el sistema CIP se alcanzan sin problemas todas las superficies internas en contacto directo con los alimentos (Hazelwold, 1994),

ya que este sistema consiste en hacer circular el sanitizantes por el interior de tuberías, circuitos y equipo. (Marriot, 2003)

Tabla 5. Zonas y objetos de limpieza en una fábrica de pan, y posibles alternativas de métodos mecanizados.

OBJETO DE LIMPIEZA	MÉTODO MANUAL	MÉTODO ALTERNATIVO
Utensilios de trabajo como cuchillos	Remojar y/o fregar	Pulverizar
Maquinas cortadoras de pan	Fregar	Pulverizar
Cutter, picadoras, amasadoras y removedores	Cepillar y lavar con manguera	Cubrir de espuma y pulverizar
Superficies de trabajo y tajos de corte	Cepillar y/o fregar	Cubrir de espuma
Moldes, bandejas, cestos y transportadoras	Fregar, cepillar y/o remojar	Desinfección COP y ultrasonidos
Hornos de panadería	Cepillar y/o barrer	Aspirar
Suelos	Fregar y/o lavar	Lavado y cepillado con maquina
Bandejas y moldes de panadería	Raspar y/o cepillar	
Piezas desmontables de instalaciones como válvulas, grifos, filtros, etc	Remojar y/o cepillar, lavar	Pulverizar y ultrasonidos

Tomado de: Limpieza y desinfección en la industria alimentaria por Wildbrett, 2000.

3. JUSTIFICACIÓN

Uno de los problemas más serios que enfrenta la industria alimentaria es el resultado de la capacidad que tienen algunas bacterias de formar biopelículas en superficies que tienen contacto con alimentos o trabajadores, convirtiéndolos en un foco de contaminación cruzada, ante esto la solución que tienen las industrias es utilizar sanitizantes químicos que logren eliminar dicha contaminación, generando la posibilidad de dejar residuos químicos que puedan tener contacto con los alimentos y así perjudicar su inocuidad, de tal forma que se presente ante el consumidor un alimento contaminado que llegue a ser el motivo de una posible ETA o intoxicación química, es por eso que en esta investigación se evaluará la efectividad de sanitizantes comerciales de origen natural (Citrik Dx, Citrodex, Citrik Agro, Citrik Max, Citrol K-Ultra, Citrik Plus, Citrik polvo y toallas húmedas Orlix) en biopelículas formadas por *Salmonella typhi*, *Salmonella* Montevideo y *Escherichia coli* en superficies de acero inoxidable.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad de los sanitizantes comerciales de origen natural (Citrik Dx, CitroDEX, Citrik Agro, Citrik Max, Citrol K-Ultra, Citrik Plus, Citrik polvo y toallas húmedas Orlix) en la formación de biopelículas de *Salmonella typhi*, *Salmonella* Montevideo y *Escherichia coli* en superficies de acero inoxidable.

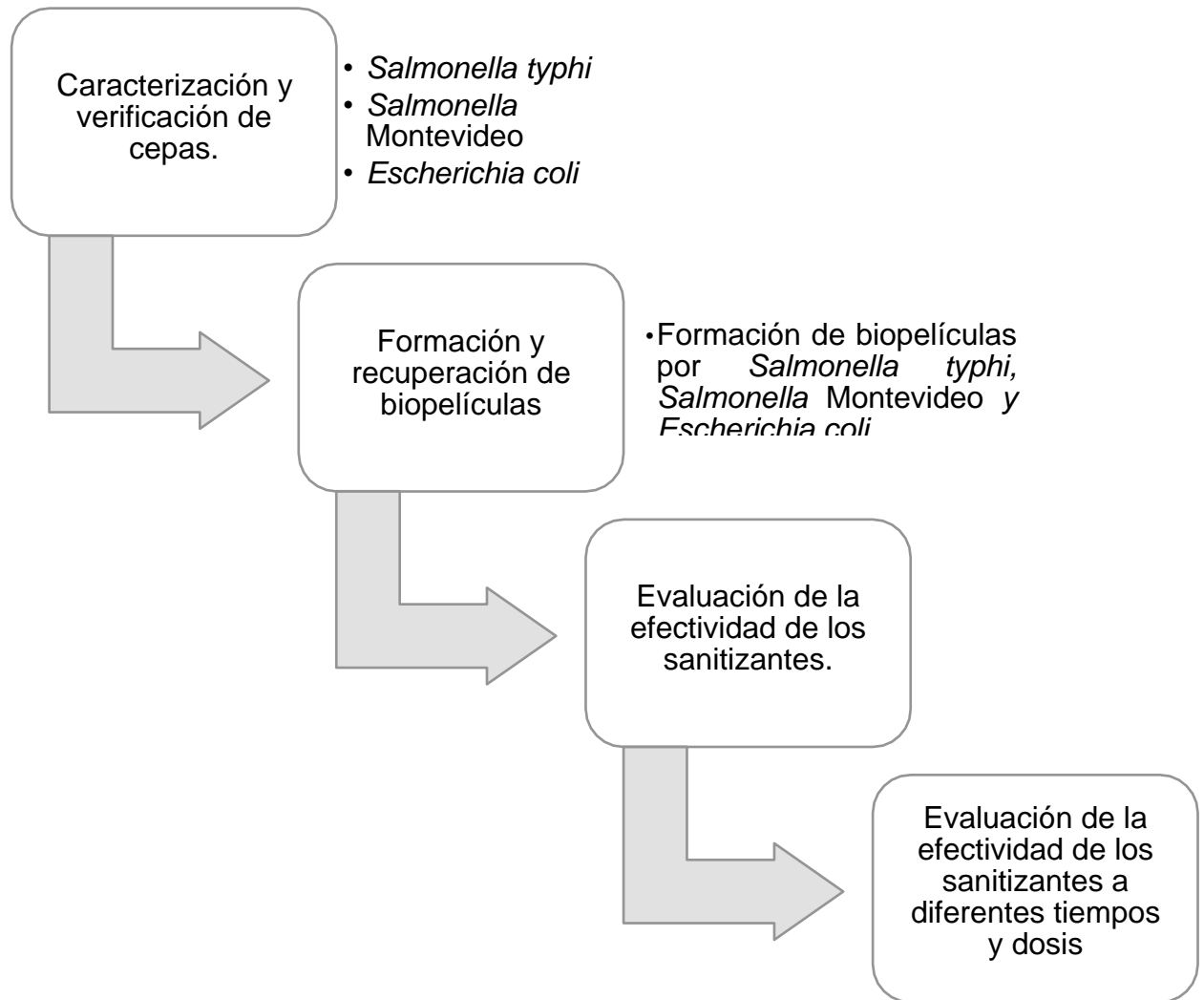
4.2 Objetivos específicos

4. 2. 1 Caracterizar la formación de biopelículas en superficies de acero inoxidable de las cepas de *Salmonella typhi*, *Salmonella* Montevideo y *Escherichia coli* mediante tinción de azul de metileno.

4. 2. 2 Verificar la efectividad de los sanitizantes comerciales de origen natural en las biopelículas de las cepas de *Salmonella typhi*, *Salmonella* Montevideo y *Escherichia coli* en superficies de acero inoxidable de acuerdo a las dosis y tiempos establecidas por el fabricante.

4. 2. 3 Evaluar la efectividad de los sanitizantes comerciales de origen natural en las biopelículas de las cepas de *Salmonella typhi*, *Salmonella* Montevideo y *Escherichia coli* a diferentes tiempos y dosis de aplicación.

5. DIAGRAMA DE TRABAJO



6. MATERIALES Y MÉTODO

6.1 Material

Material de vidrio y de grado analítico, los necesarios para cada determinación.

6.2 Material biológico

Cepas de *Salmonella typhi*, *Salmonella* Montevideo y *Escherichia coli* sembradas a 37°C y preservadas en caldo nutritivo. Las cepas evaluadas fueron proporcionadas por el cepario de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP.

6.3 Sanitizantes naturales

Se hizo evaluación de sanitizantes comerciales de origen natural (Citrik Dx, Citrodex, Citrik Agro, Citrik Max, Citrol K-Ultra, Citrik Plus, Citrik polvo y toallas húmedas Orlix) preparados en concentraciones diferentes en base a las indicaciones del fabricante.

6.4 Equipos

Los equipos utilizados durante el desarrollo experimental son los mencionados en la tabla 6.

Tabla 6. Equipos utilizados

EQUIPO	MARCA	MODELO
Balanza.	VELAB.	VE-5000.
Incubadora.	BG	E-41
Cuenta colonias.	SPIRAL BIOTECH.	Q-COUNT.
Campana de flujo.	ESEVE.	CFL-102V.
Parrilla de calentamiento.	FISHER CIENTIFIC.	ISOTEMP.
Micropipeta 1000µl.	LABMATE PRO	LMP 1000
Micropipeta 100µl	LABMATE PRO	LMP 100

6.5 Métodos

Los métodos y técnicas usadas durante el desarrollo experimental son mencionados en la tabla 7.

Tabla 7. Métodos utilizados

MÉTODOS	TÉCNICA	REFERENCIA
Sincronización de cepas	Aislamiento en placas	NOM-210-SSA1-2014
Sincronización de cepas	Diluciones seriadas	NOM-110-SSA1-1994
Formación de biopelícula	Sembrado directo	Speranza y col., 2011
Conteo de colonias	Vertido en placa	NOM-092-SSA1-1994
Dilución en placa	Extendido en placa	NOM-115-SSA1-1994
Recolección de muestra	Raspado con hisopo	NOM-251-SSA1-2009

7. METODOLOGÍA

7.1. Caracterización y verificación de cepas.

Se verificó la viabilidad y morfología microscópica de *Salmonella typhi*, *Salmonella* Montevideo y *Escherichia coli* sembrándolas en caldo nutritivo y agar nutritivo por 24 h a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo se hizo una tinción gram al caldo y a la placa para verificar que no existía contaminación y se observó la morfología microscópica y macroscópica.

7.2. Formación y recuperación de biopelículas.

Se limpiaron 9 placas de acero inoxidable de 3cm por 5 cm aproximadamente en su respectivo envase de vidrio (previamente esterilizado) con tapa hermética, estos fueron esterilizados en una autoclave durante 15 min a una presión de 15 libras, por otro lado se inoculó 1 mL de *Salmonella typhi*, *Salmonella* Montevideo y *Escherichia coli* en 9mL de caldo nutritivo cada uno con ayuda de una micropipeta de 1000µl., se dejó incubando por 24 h a 37°C. Dentro de una campana de flujo previamente esterilizada se sacaron las placas de los envases, colocándolas encima de las tapas se inocularon 500µl de cada caldo, usando 3 placas por cada bacteria donde se esparció el caldo de tal forma que recubriera toda la placa de acero, una vez que se secaron por método de aireación, las placas fueron introducidas en su respectivo envase, tapado y acomodado de forma horizontal dentro de una palangana rectangular grande. Se dejó formar la biopelícula a los 24, 72 y 120 h. Una vez transcurrido el tiempo respectivo para cada placa se usó azul de metileno al 5% vertiéndolo en toda la placa de acero, se retiró el colorante a los 5 min con una piceta llena de agua estéril, una vez que se retiró la mayor parte del colorante, se dejaron secar y se observaron las manchas azules que se generaron en la placa de acero, eso ayudó a ver la formación de biopelícula en la placa. La capacidad de formar biopelículas por las bacterias ya mencionadas fue evaluada mediante una modificación de la técnica Speranza y col en el 2011 y en base a eso se escogió la placa que mostró una coloración o manchas más intensas.

7.3. Evaluación de la efectividad de los sanitizantes.

Se esterilizó en una autoclave durante 15 minutos a una presión de 15 libras 30 placas de acero inoxidable dentro de envases de vidrio tapados con tapas forradas de papel aluminio, 60 tubos con 9.9ml de agua peptonada usados para las diluciones y 14 tubos con 20ml de agua destilada estéril para la preparación de los sanitizantes. Con una micropipeta se tomaron 500µl de caldo nutritivo de la bacteria a evaluar y dicha cantidad se inoculó en un caldo nutritivo nuevo, este se incubó por 24h a 37°C.

Se inocularon 500µl del caldo con la bacteria a evaluar (*Salmonella typhi*, *Salmonella* Montevideo o *Escherichia coli*) sobre placas de acero inoxidable ya esterilizadas, con ayuda de un hisopo se esparció el caldo en toda la placa y se secó para ingresarlas a su envase y acomodarlo de forma horizontal dentro de la palangana, dejando que se formara la biopelícula durante 120 h a temperatura ambiente.

Se usaron 3 placas para verificar la formación de biopelícula con ayuda del azul de metileno, una vez comprobada la formación de biopelícula se usaron 3 placas para el control y 3 placas para cada uno de los sanitizantes a evaluar, se vertió el sanitizante sobre toda la placa de acero recubriéndola por completo y dejándolo actuar en el tiempo especificado por el fabricante (15 min), transcurrido el tiempo se retiró el sanitizante de la placa con ayuda de agua destilada estéril dejándolo escurrir por unos minutos. Para el caso de las Toallitas Orlix se hizo una limpieza manual y se dejó secar por 15 minutos, se hizo un raspado de toda la placa con un hisopo y éste se introdujo en un tubo de agua peptonada, en las placas control se usó un hisopo remojado en agua estéril destilada, haciendo un raspado de la placa control e introduciéndolo en un tubo de agua peptonada, una vez terminado ese proceso se hicieron las diluciones, escurriendo y desechando cada uno de los hisopos que estaban dentro de los tubos. Se tomó 1 ml vertiéndolo en placas Petri, se tomaron 100µl que fueron agregados a un segundo tubo que contenía 9.9 ml de agua peptonada, del segundo tubo se tomó 1 ml y se vertió en una caja Petri, eso se hizo con cada uno de los tubos y sus diluciones.

Con todas las placas con inóculo se realizó vertido en placa con agar nutritivo, dejando gelificar e incubándolas a 37°C. Se hizo conteo de colonias a las 24 y 48h,

anotando los resultados en tablas y evaluando la efectividad de los sanitizantes mediante la comparación del número de unidades formadoras de colonias obtenidas en las placas control.

7. 4. Efectividad de los sanitizantes a diferentes tiempos y dosis.

Se realizó el mismo procedimiento que el paso anterior sólo que en este caso se hicieron modificaciones en la dosis y el tiempo. Se usaron 5 placas para revisar la formación de biopelícula con azul de metileno, 2 placas control y 4 placas por sanitizante, 2 placas se usaron para evaluar la efectividad del sanitizante al tiempo establecido por el fabricante y con doble dosis de sanitizante, las otras 2 placas se usaron para evaluar la efectividad al doble de tiempo y con la misma dosis establecida por el fabricante. Se hizo el mismo procedimiento para las diluciones y vertido en placa. El conteo de colonias se realizó a las 48 h, registrando los resultados y comparando los datos obtenidos en el paso 3 con los datos obtenidos en este paso.

7.5 Análisis de resultados

Con los resultados obtenidos en UFC/cm² se realizó un análisis de varianza (ANOVA). Para los valores significativos se realizó un análisis de media por prueba de Tukey para con un intervalo de confianza del 95%.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8. 1 Formación y recuperación de biopelículas.

Salmonella typhi presentó capacidad de formar biopelículas desde las 24 horas de incubación, en la figura 4 se observa el desarrollo de ésta y el aumento de número de bacterias adheridas a la superficie conforme transcurrió el tiempo, también se observó que con más horas de incubación la zona de contacto de la biopelícula era mayor hasta llegar a las 120 horas donde la biopelícula cubría toda la placa de acero inoxidable. Austin y col. (1998) hablan de la capacidad que tiene *Salmonella* para adherirse y formar biopelículas en superficies, se debe a que posee estructuras de superficie como la SEF17 fimbriae, que le facilitan la adhesión a las superficies inanimadas y actúan como quimiorreceptores, dirigiendo a las células a sitios específicos, dando a las células una capacidad de resistencia frente a fuerzas mecánicas.



a) 24 horas



b) 72 horas



c) 120 horas

Figura 4. Formación de biopelículas de *Salmonella typhi* a diferentes tiempos de incubación a 37°C, teñidas con azul de metileno.

Salmonella Montevideo mostró poca capacidad para formar biopelícula a las 24 horas, pero con el paso del tiempo se ve mayor colonización a lo largo de la placa y mayor coloración al centro de las placas, tal como se observa en la figura 5.

Vestby (2009) demostró que existen diferencias entre los distintos serotipos de *Salmonella* en la facilidad de producir biofilms y cabe mencionar que en esta investigación *Salmonella* Montevideo es un excelente productor de biopelículas en poliestireno.

A través de esta evaluación, podemos decir que comparado con el comportamiento de *Salmonella typhi*, la capacidad de formar biofilms de *Salmonella* Montevideo fue menor, lo que puede deberse a los materiales utilizados para examinarla, ya que no es idóneo para *Salmonella* Montevideo porque no se adhiere completamente, pero muestra la capacidad de formar una biopelícula, lo que puede convertirlo en un tema de preocupación en diferentes industrias alimentarias.

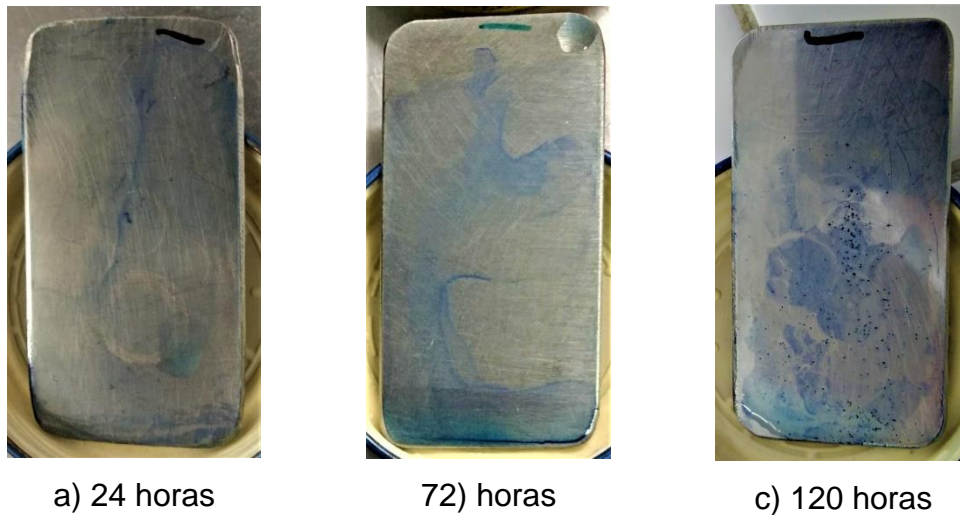


Figura 5. Formación de biopelículas de *Salmonella* Montevideo a diferentes tiempos de incubación a 37°C, teñidas con azul de metileno.

Para *Escherichia coli*, se observó una formación de biopelícula muy obvia a las 24 horas porque la tinción con azul de metileno cubrió más del 70% de la superficie. Chmielewski y Frank (2003) demostraron que *Escherichia coli* tiene la capacidad de producir exopolisacarido, estos exopolisacáridos se encuentran involucrados en el proceso de adhesión celular y formación de biopelícula. Se puede observar en la figura 6 que a las 120 horas existe una mayor coloración en algunas partes de la placa de acero, a partir de las 72 horas se observaron las placas rayadas y con pequeños agujeros en el centro, lo que significa que *Escherichia coli* comenzó un proceso de corrosión, esto es preocupante porque la corrosión en las superficies los convierten en excelentes reservorios de materia orgánica y con el tiempo, los microorganismos lo podrían usar como un nutriente para su desarrollo.



a) 24 horas



b) 72 horas



c) 120 horas

Figura 6. Formación de biopelículas de *Escherichia coli* a diferentes tiempos de incubación a 37°C, teñidas con azul de metileno

8. 2 Evaluación de la efectividad de los sanitizantes.

Los siguientes resultados son los valores de inhibición obtenidos a partir de diferentes sanitizantes utilizados para *Salmonella typhi*, *Salmonella* Montevideo y *Escherichia coli* en condiciones normales y preparados según las indicaciones y concentraciones especificadas por el fabricante. Se hizo el recuento promedio de cada tipo de bacteria evaluada a las 24 y 48 horas, comparamos con los controles y se obtuvieron gráficos de los resultados.

En la figura 7 podemos ver que Citrik Dx, Citrol K-Ultra, Citrik plus y Citrik polvo destruyeron exitosamente la biopelícula y eliminaron parte de la misma, porque si lo comparamos con el control, estos sanitizantes mostraron menos colonias formadoras de *Salmonella typhi*. Por otro lado, Citrodex y Citrik Agro son los sanitizantes que no lograron destruir la biopelícula porque el número de colonias fue mayor o igual al número de colonias en la placa de control. En este caso, el único sanitizante que pudo eliminar completamente la biopelícula formada por *Salmonella typhi* en la placa de acero inoxidable fueron las toallitas Orlix. Estas toallitas son las únicas que utilizan limpieza manual ya que limpiamos toda la placa y la dejamos secar para después tomar una muestra de los residuos.

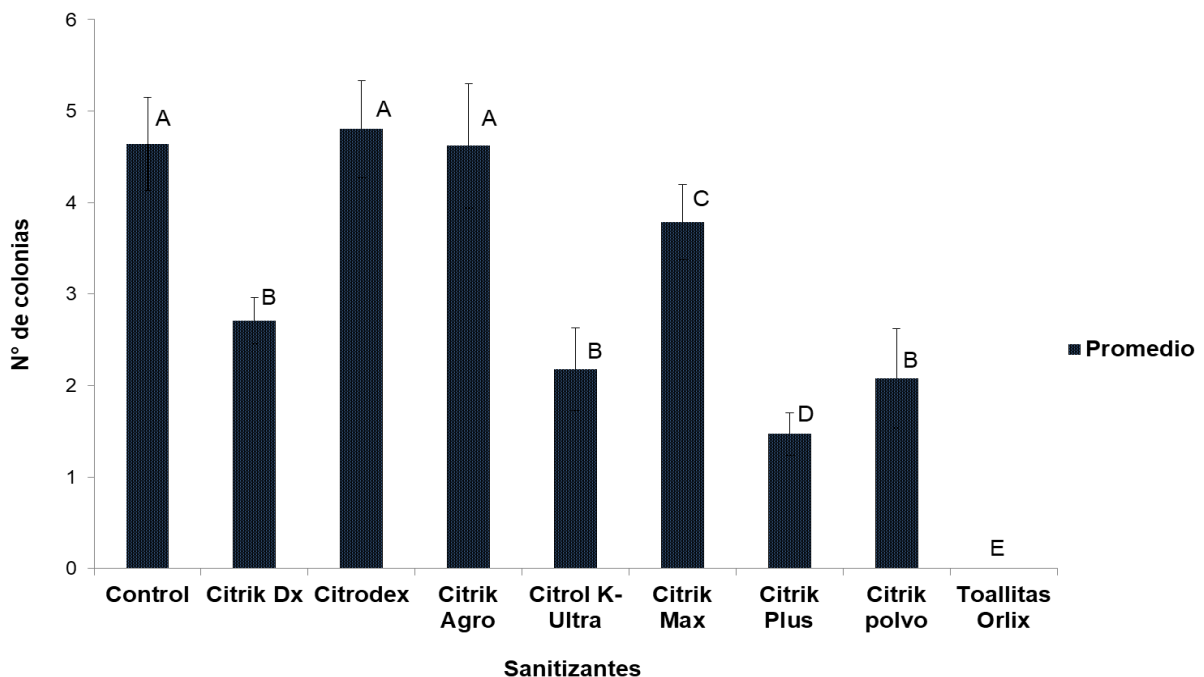


Figura 7. Promedio del conteo de colonias de *Salmonella typhi* hecho a las 24 y 48 horas posterior al uso de los sanitizantes comerciales en concentraciones establecidas por el fabricante. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

En el caso de *Salmonella* Montevideo se observó mayor sensibilidad a los sanitizantes, ya que todos mostraron una reducción significativa en el número de colonias formadoras. En este caso Citrol K-Ultra, Citrik Plus, Citrik polvo y las toallitas Orlix fueron los sanitizantes que mostraron mayor capacidad para eliminar la biopelícula de la superficie. Citrodex y Citrik Agro mostraron un mejor comportamiento ya que lograron reducir la carga bacteriana, si los comparamos con los resultados obtenidos con *Salmonella typhi*, hay que destacar que estos sanitizante fueron más efectivos y mostraron mayor capacidad de desprendimiento con *Salmonella* Montevideo.

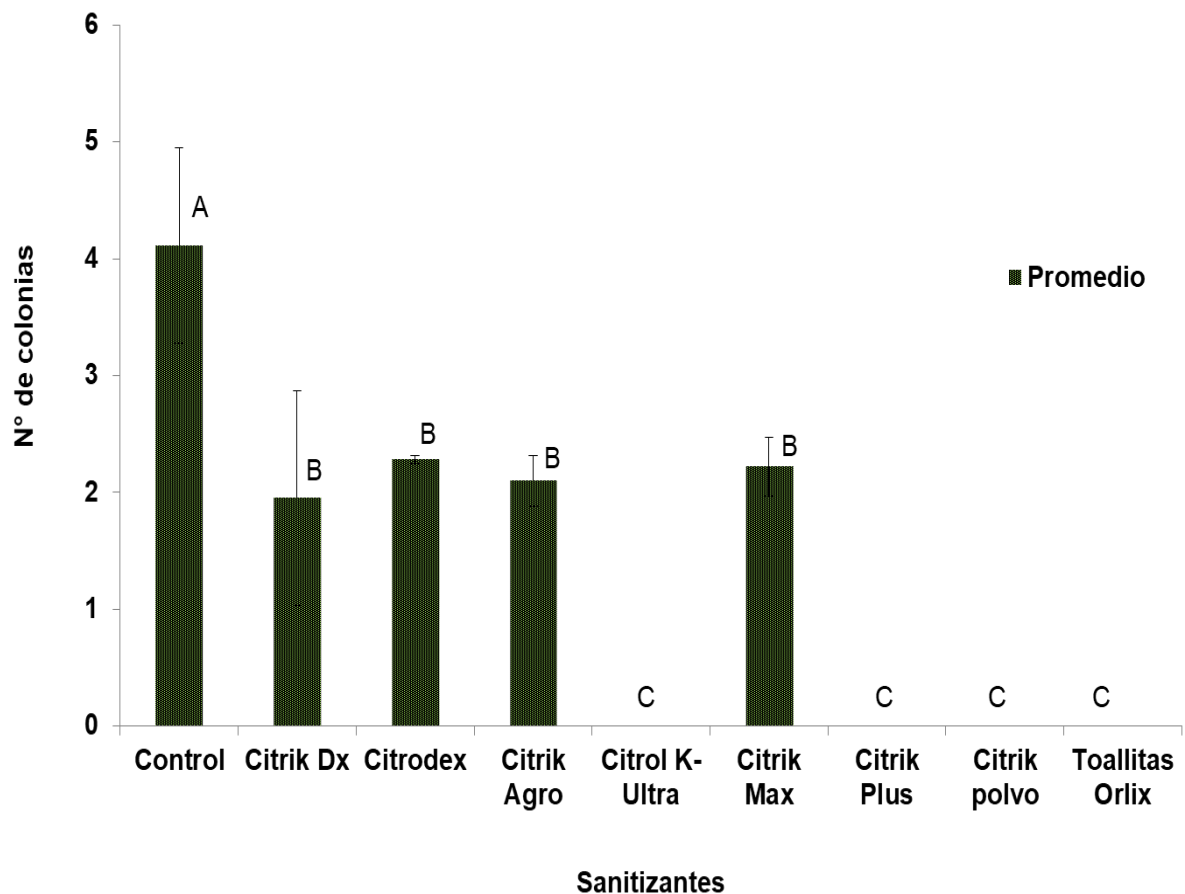


Figura 8. Promedio del conteo de colonias de *Salmonella* Montevideo hecho a las 24 y 48 horas posterior al uso de los sanitizantes comerciales en concentraciones establecidas por el fabricante. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

En la figura 9 *Escherichia coli* muestra que Citrik Dx, Citrik Agro, Citrol K-Ultra y Citrik Max tienen mayor efectividad porque el número de colonias formadoras se reduce en comparación con los resultados del control. Citrik Plus, Citrik polvo y las Toallitas Orlix pueden eliminar completamente la biopelícula producida en la placa de acero, ya que no se encontraron colonias en las 24 y 48 horas de conteo.

Los sanitizantes que mostraron un efecto general deficiente fueron Citrodex, porque el número de colonias no disminuyó mucho en comparación con los otros sanitizantes y con el control. Comparándolos con la nula efectividad que tuvo con *Salmonella typhi* y la mayor efectividad que presentó con *Salmonella* Montevideo se

puede decir que estos sanitizantes no pueden penetrar completamente y sólo puede desprender un poco la biopelícula.

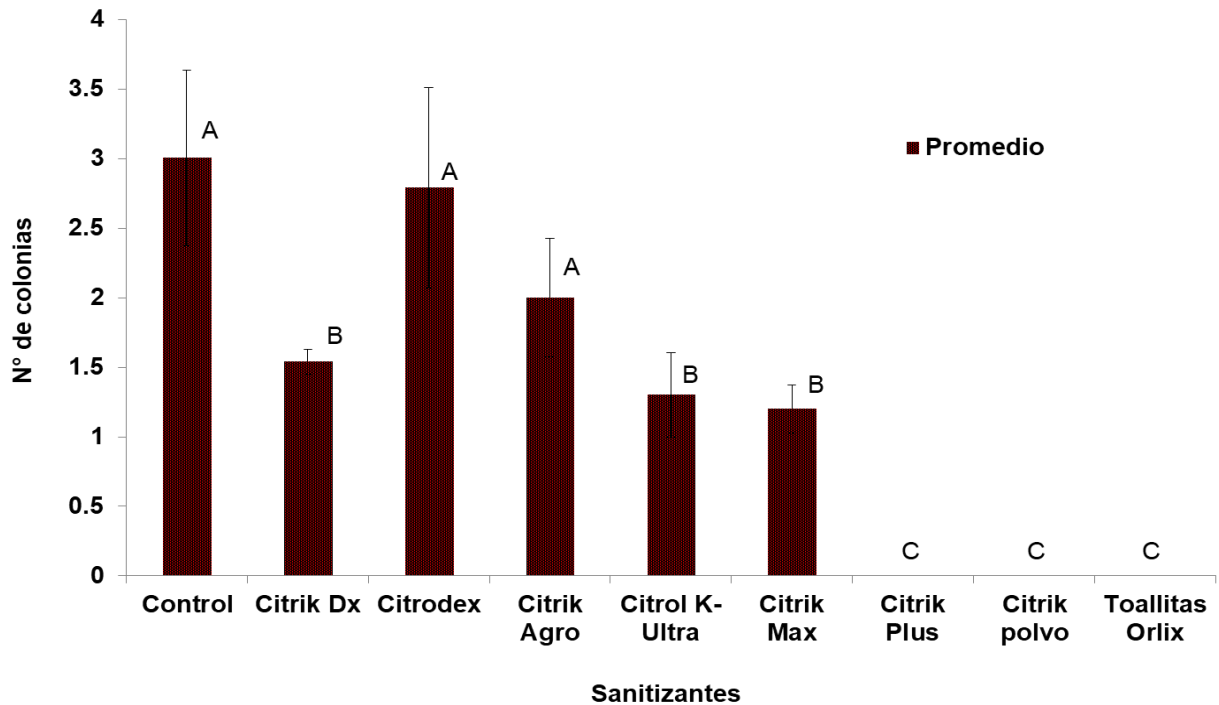


Figura 9. Promedio del conteo de colonias de *Escherichia coli* hecho a las 24 y 48 horas posterior al uso de los sanitizantes comerciales en concentraciones establecidas por el fabricante. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

8. 3 Efectividad de los sanitizantes con doble dosis y doble tiempo.

La eficacia de los sanitizantes se probó utilizando el doble de tiempo y el doble de la dosis prescrita por el fabricante, para *Salmonella typhi*, *Salmonella* Montevideo y *Escherichia coli* respectivamente. En los gráficos puede ver los resultados obtenidos en el segundo paso, el valor promedio obtenido después de usar el doble de tiempo con la misma dosis y el valor promedio obtenido después de usar el mismo tiempo con el doble de dosis.

Como se puede ver en la figura 10, Citrik Plus y Citrik polvo muestran una mayor efectividad al cambiar el tiempo y la dosis recomendada. Al utilizar Citrik Max no hay buenos resultados, ya que al comparado con los resultados obtenidos en el paso 2,

la carga microbiana es mayor en las dos pruebas, lo que demuestra que es incapaz de destruir la biopelícula *Salmonella typhi* a distintas dosis y diferentes tiempos.

Citrol K-Ultra es menos efectivo si se deja actuar el doble de tiempo, pero usando doble dosis con el mismo tiempo mostró mayor capacidad para romper la biopelícula. Citrik Agro logró reducir la carga microbiana en el doble de tiempo y pudo eliminar la biopelícula de *Salmonella typhi* usando el doble de la dosis. CitroDEX mostró mejores resultados con el doble de dosis y el doble de tiempo, ya que no mostró ninguna capacidad para reducir la carga microbiana usando las indicaciones de uso establecidas por el fabricante. Citrik Dx mostró buenos resultados sólo cuando se le dejó actuar el doble de tiempo, ya que usando el doble de la dosis no se pudo desprender la biopelícula, se observó que la carga microbiana no disminuyó en comparación con el control y los resultados obtenidos en el procedimiento 2.

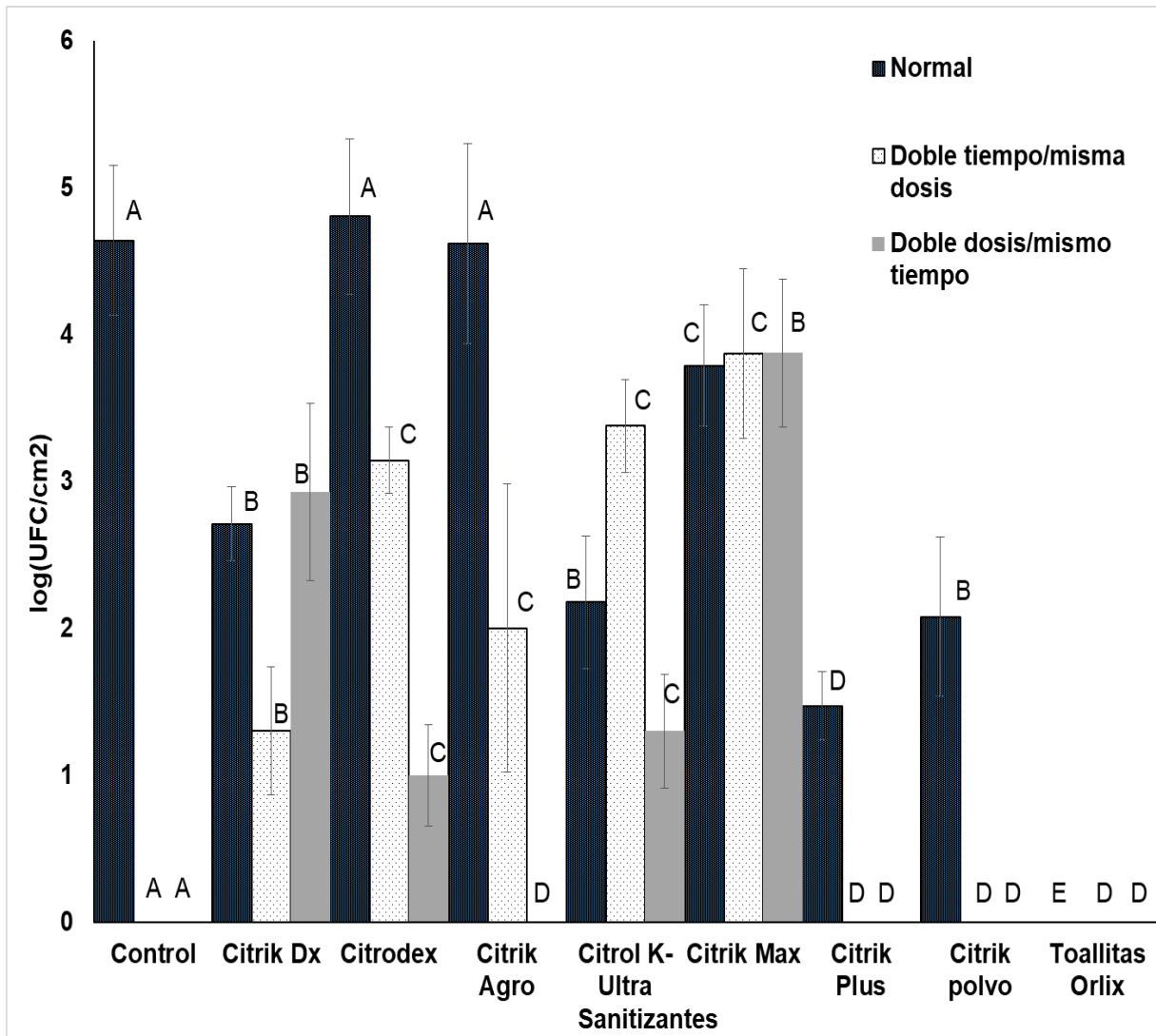


Figura 10. Promedio obtenido en las pruebas cuantitativas realizadas a *Salmonella typhi* para evaluar la efectividad de los sanitizantes de origen natural con doble dosis y expuesto el doble de tiempo. Las barras representan la desviación estándar de cada prueba. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

En el caso de *Salmonella* Montevideo, los sanitizantes Citrol K-Ultra, Citrik Plus, Citrik en polvo y las toallitas Orlix mostraron los datos esperados, porque desde el procedimiento 2 fueron adecuados para romper la biopelícula y desprenderla por completo de las placas de acero.

Citrik Max y Citrodex no disminuyeron la carga microbiana usando doble dosis pero sí lograron disminuirla con el doble de tiempo y eliminarla en el caso de Citrodex. Citrik Agro requiere del doble de la dosis para desprender por completo la biopelícula de la placa de acero y si se usa la misma dosis pero con el doble de tiempo se puede reducir significativamente la carga microbiana. En comparación con los datos que obtuvimos usando el doble de dosis y el valor obtenido en el procedimiento 2, Citrik Dx redujo la carga microbiana aún más dejándolo actuar el doble de tiempo.

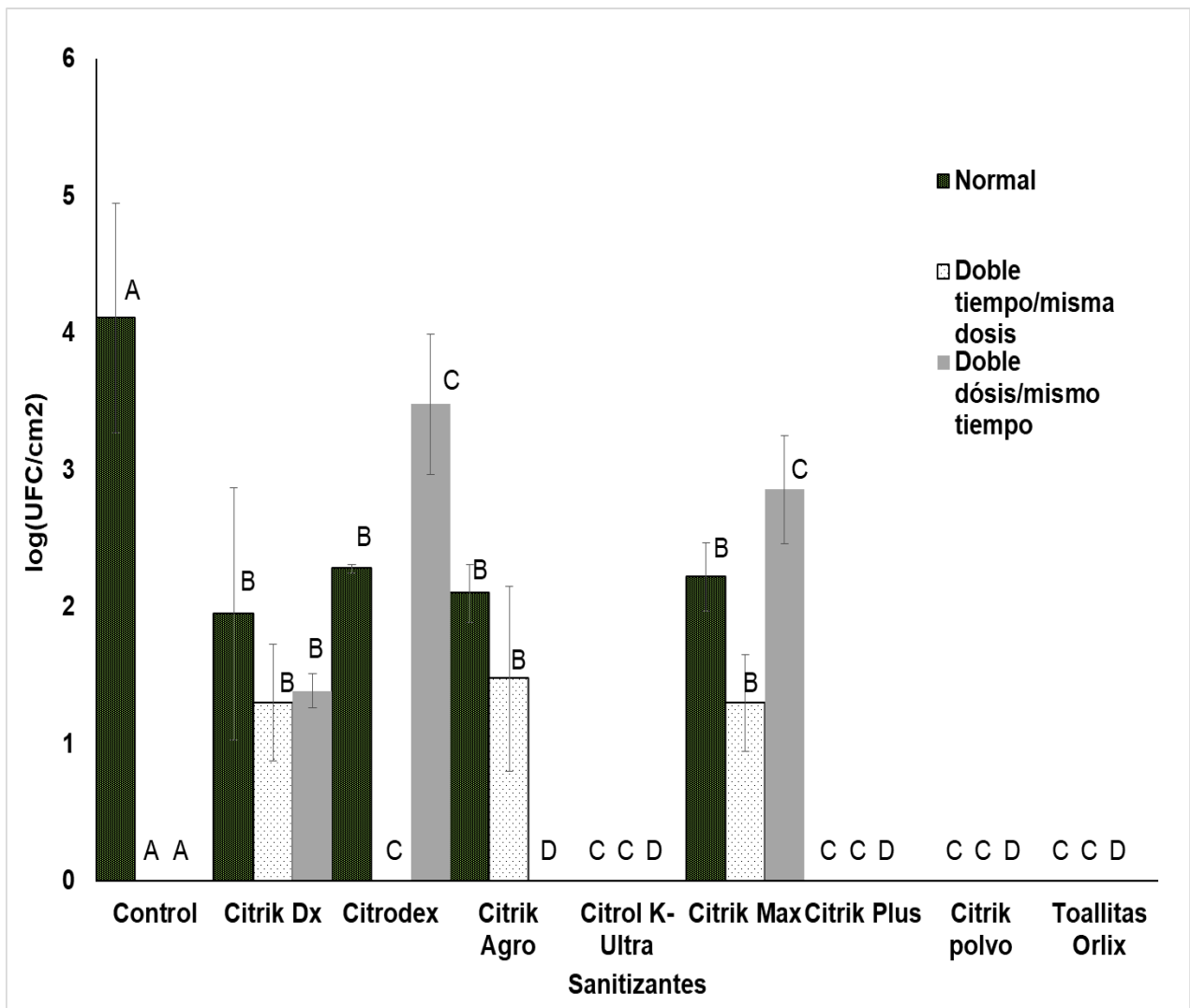


Figura 11. Promedio obtenido en las pruebas cuantitativas realizadas a *Salmonella* Montevideo para evaluar la efectividad de los sanitizantes de origen natural con

doble dosis y expuesto el doble de tiempo. Las barras representan la desviación estándar de cada prueba. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Escherichia coli mostró un resultado diferente al esperado ya que siguiendo las instrucciones del fabricante, los sanitizantes Citrik Max y Citrol K-Ultra ayudaron a disminuir la carga bacteriana de las placas de acero, pero fueron ineficaces cuando se le duplico el tiempo usando Citrik Max y al momento de duplicar la dosis Citrol K-Ultra no logró penetrar la biopelícula del todo.

Citrik Agro resultó ser un buen sanitizante para eliminar la biopelícula usando el doble de dosis establecida por el fabricante, y consigue reducir la carga en casi un 50% si se deja expuesto el doble del tiempo establecido. La mejora se puede observar con Citrodex porque en comparación con las otras bacterias, ha logrado reducir significativamente la carga bacteriana usando el doble de tiempo y el doble de dosis. Si se cambia la indicación, se podría convertir en un sanitizante específico.

Citrik Dx tuvo buenos resultados usando doble dosis y doble tiempo, pero no hubo diferencias significativas en comparación con los resultados obtenidos en el segundo procedimiento. Como en todos los casos Citrik Plus, Citrik en polvo y las toallitas Orlix son la mejor opción para desprender por completo la biopelícula y eliminar los residuos que puedan encontrarse en la placa de acero.

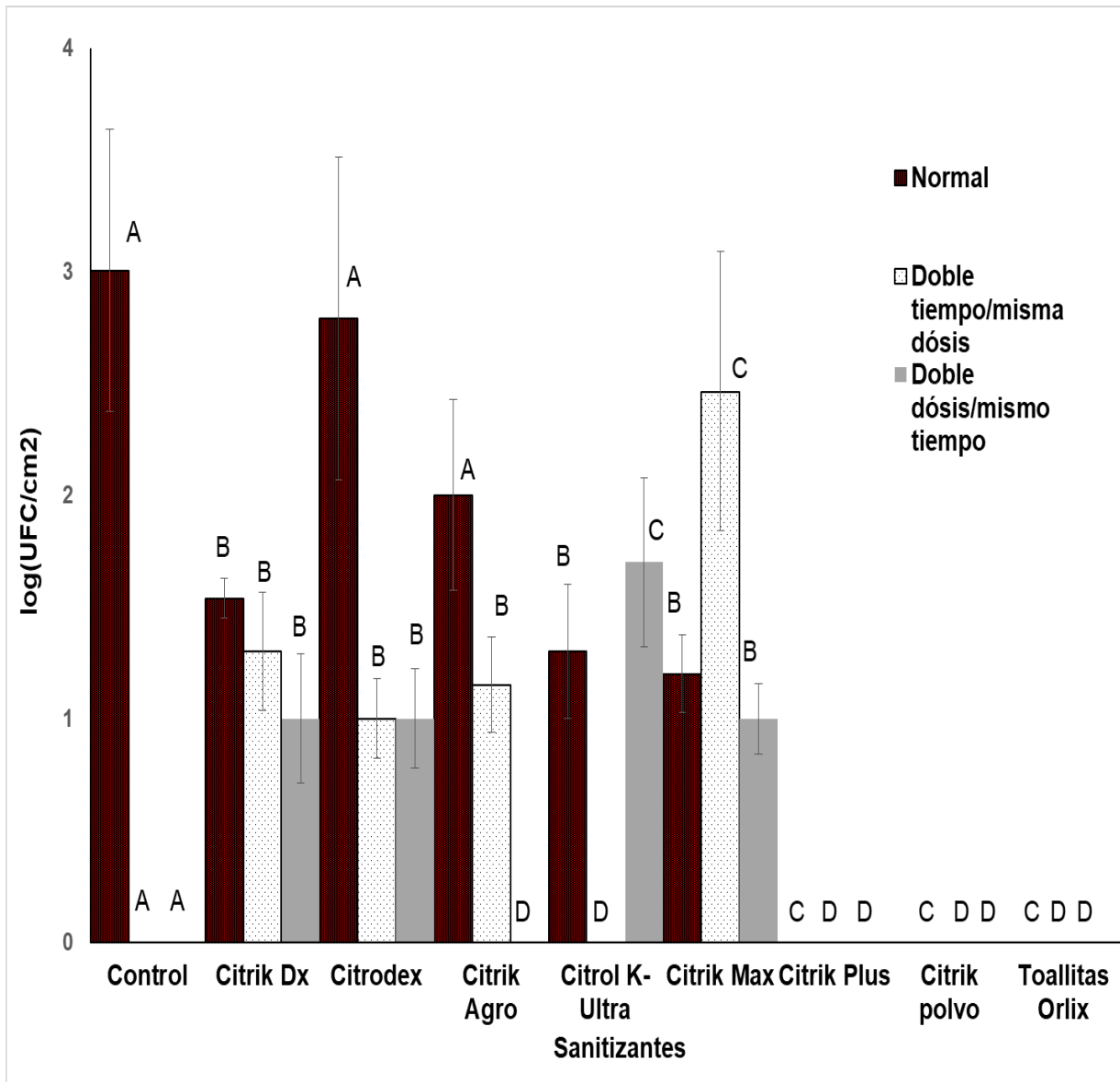


Figura 12. Promedio obtenido en las pruebas cuantitativas realizadas a *Escherichia coli* para evaluar la efectividad de los sanitizantes de origen natural con doble dosis y expuesto el doble de tiempo. Las barras representan la desviación estándar de cada prueba. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

9. CONCLUSIONES

- ❖ Se logró evaluar la efectividad de los sanitizantes sobre biopelículas formadas por *Salmonella typhi*, *Salmonella* Montevideo y *Escherichia coli*, también se demostró que los microorganismos evaluados tienen la capacidad de formar biopelículas en placas de acero inoxidable desde las 24h.
- ❖ Al evaluar los sanitizantes en las concentraciones y el tiempo de acción establecido por el fabricante se pudo observar que algunos de estos inhiben el crecimiento de los microorganismos evaluados, pero al usar doble concentración y exponerlos el doble de tiempo se favoreció el desprendimiento total de las biopelículas en las placas de acero inoxidable
- ❖ De manera general puede concluirse que los sanitizantes comerciales de origen natural tienen la capacidad de desprender biopelículas formadas por microorganismos como *Salmonella typhi*, *Salmonella* Montevideo y *Escherichia coli*, las Toallitas Orlix es el sanitizante que tiene mayor efectividad al eliminar la biocarga existente en las placas de acero, esto demuestra que no es necesario usar rigurosas estrategias de sanitización usando sustancias químicas que podrían dañar el material o la materia prima, y quizá sería una buena alternativa combinar métodos de limpieza usando sanitizantes naturales para lograr una mejor limpieza de las superficies.

10. RECOMENDACIONES

- Evaluar la eficacia de los sanitizantes de origen natural para inhibir la formación de biopelículas formadas por otras bacterias causantes de contaminación alimentaria.
- Revisar otras técnicas o combinación de métodos usando sanitizantes de origen natural para la eliminación total de la biopelícula sobre placas de acero inoxidable.
- Comprobar la eficacia de los sanitizantes para inhibir la formación de biopelículas sobre otros materiales.
- Comparar y evaluar la efectividad de los sanitizantes de origen natural en conjunto con otros antimicrobianos para reducir la formación de biopelículas en acero inoxidable u otro material.

BIBLIOGRAFIA

Ahmed D, Islam MS, Begum YA, Janzon A, Qadri F, Sjoling A. (2012). Presence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in biofilms formed in water containers in poor households coincides with epidemic seasons in Dhaka. *Journal of Applied Microbiology*;114. 1223- 1229p.

Álvarez-Parrilla, I. (2006). *Microbiología de los alimentos. Características de los patógenos microbianos*. ICMSF. 134-140p.

Alviano, D. S., Alviano, C. S. (2009). Plant extracts: Search for new alternatives to treat microbial diseases. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10(1), 106-121p.

An, Y H., Friedman, R J. (1998). Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res*, 338-348.

Anderson, Ma. R. (2005). *Enfermedades de origen alimentario. Su prevención*. Díaz de Santos, S. A. España. 41-52p.

Andersson, D., Hughes, D. (2014) Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology* 12. 465-478.

Annous, A.; Smith, J. L. and Fratamico, P. M. (2009) . *Biofilms in fresh fruit and vegetables. Biofilms in the food and beverage industries*. Woodhead Publishing and CRC Press. Boca Raton. 517-535 p.

Annous, B., Ethan, S., Cooke, P., Burke, A. (2005). Biofilm formation by *Salmonella spp.* on Cantaloupe melons. *J. Food Safety*. 25:276-287p.

Austin, J.W. y Bergeron, G. (1995). Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. *Journal of Dairy Research*. 509-519p.

Azzouz M.A. y Bullerman L.B. (1982). Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents. *Journal of Food Protection*.

Bahrani-Mougeot F, Gunther NW, Donnenberg MS, Mobley HLT. (2002). *Escherichia coli* in: *Escherichia Coli: Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen*. Donnenberg MS, Ed. Elsevier Science Inc. Estados Unidos, 239-259.

Balaban N, Ren D, Givskov M, Rasmussen TB. (2008). Introduction In: Control of biofilm infections by signal manipulation. Balaban N, Ed. Springer Series on Biofilms 2. 1-11p.

Barnhart, M. M. y Chapman M. R. (2006). Curli biogenesis and function. Annu. Rev. Microbiol. 131- 147p.

Beech I y Gaylarde C. (1999). Recent advances in the study of biocorrosion - an overview. Rev. Microbiol; Vol.30 (3).

Bell, C. y Kyriakides, A. (2000). E. coli. Una aproximación práctica al microorganismo y su control en los alimentos. Ed. Acribia, S. A. Zaragoza, España. 1-12p.

Bjarnsholt, T., Alhede, M., Moser, C., Kühl, M., Jensen P, et al. (2013) The *in vivo* biofilm. Trends in Microbiology. 466-474p.

Blanco M, Blanco JE, Alonso MP, Mora A, Balsalobre C, Muñoa F, Juárez A. (1997) Detection of pap, sfa and afa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with expression of adhesins and production of toxins. Res Microbiol, 148: 745-755p.

Burt, S.A (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. International Journal of Food Microbiology.

Carballo J. y Araujo A. (2012). Evaluation of the efficacy of commercial sanitizers against adhered and planktonic cells of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. Ciênc. Tecnol. Aliment-Campinas.España. 607-610p.

Carvajal LF, Gomez A y Ochoa S. (2007) Simulación de un lavado hidráulico en tuberías para el control del crecimiento de biopelícula. Dyna rev.fac.nac.minas; Vol. 74,152p.

Chen, D., Zhao, T., y Doyle, M. P. (2015). Single-and mixed-species biofilm formation by *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella*, and their sensitivity to levulinic acid plus sodium dodecyl sulfate. Food Control 57, 48-53p.

Chmielewski, R. A. N. y Frank, J. F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety*. 22-32p.

Clements, A., Young, J.C., Constantinou, N., Frankel, G. (2012). Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut microbes* 3. 71-87p.

Copeland, M.F., Weibel, D.B. (2009). Bacterial swarming: a model system for studying dynamic self-assembly. *Soft matter* 5. 1174-1187p.

Costerton J., Stewart P. y Greenberg E. (1999). Bacterial biofilms: A common cause of persistent infection. *Science*, 284; 1466-1477p.

Costerton, J. (1995). Introduction to biofilm: Discussion, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 11, 217- 221p.

Daniels, R., Vanderleyden, J., Michiels, J. (2004). Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS microbiology reviews* 28. 261-289p.

Deel, M. (1998). Introduction to sterilization and infection control. Chichill living Stone, London.

Díez-García M, Capita R, Alonso-Calleja C. (2012). Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiol.* 1173- 1176.

Dong H, Peng D, Jiao X, Zhang X, Geng S, Liu X. (2011) Roles of the *spiA* gene from *Salmonella enteritidis* in biofilm formation and virulence. *Microbiology*; 157: 1798-1805p.

Doyle, M., Beuchant, L. y Montville, T. (2001). *Microbiología de los alimentos. Fundamentos y fronteras*. Acribia, S.A. Zaragoza, España. 133-215p.

Else, T.A., Pantle, C.R. y Amy, P.S. (2003). Boundaries for Biofilm Formation: Humidity and Temperature. *Applied and Environmental Microbiology*; 69: 5006-5010.

Ezpeleta, C., Sota M, Ibarra K, Cisterna R, (1995). Estudio multicentrico de la actividad antimicorrbiana de un nuevo desinfectante. Rev Esp Quimioter, 18. 118-124p.

FAO/OMS. (2015). Inocuidad de los alimentos. Principales enfermedades transmitidas por los alimentos y sus causas. Roma. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/a-i5896s.pdf>

Ferreira, C., Pereira, A., Melo, L., y Simões, M. (2010). Advances in industrial biofilm control with micro-nanotechnology. Journal of Applied Microbiology, 845-854p.

Forsythe, S.J. (2003). Alimentos seguros: microbiología. Acribia, S.A. Zaragoza, España. 140-168p.

Franklin, T.J., Snow G. A. (1998). Biochemistry of antibacterial action. Chapman and Hall, Londres. 4a edición.

Fuster I Valls, N. (2006). Importancia del control higiénico de las superficies alimentarias mediante técnicas rápidas y tradicionales para evitar y/o minimizar las contaminaciones cruzadas. Disponible en: [http:// www.tesisenred.net/TEISIS_UAB/AVAILABLE/TDX1005107165210//nfv1de1.pdf](http://www.tesisenred.net/TEISIS_UAB/AVAILABLE/TDX1005107165210//nfv1de1.pdf) [acceso: 10-08-2011].

García-Heredia, A., Orue, N., Heredia, N., García, S. (2013). Efficacy of citrus-based disinfectants to inhibit growth, swarming, and biofilm formation of Salmonella and decontaminate parsley. Journal of Food, Agriculture & Environment 11. 1295-1299p.

Garcinuño, R.M. (2009). Contaminación de los alimentos durante los procesos de origen y almacenamiento. España: Fundación Dialnet. Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4696799.pdf>

Gómez-López V.M., Lannoo A.S, Gil M., Allende A., (2014). Minimum free chlorine residual level required for the inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 and trihalomethane generation during dynamic washing of fresh-cut spinach. Food Control. Vol. 42.

González-Escobedo G, Marshall J.M, Gunn J.S. (2011) Chronic and acute infection of the gall bladder by *Salmonella Typhi*: Understanding the carrier state. Nat. Rev. Microbiol. 9- 14p.

Gould, L. H., Mody, R. K., Ong, K. L., Clogher, P., Cronquist, A. B., et al. (2013). Increased recognition of non-O157 Shiga toxin–producing *Escherichia coli* infections in the United States during 2000–2010: epidemiologic features and comparison with *E. coli* O157 infections. *Foodborne Pathog Dis* 10, 453-460.

Gualdi, L., Tagliabue, L., Bertagnoli, S., Ierano, T., De Castro, C., Landini, P. (2008). Cellulose modulates biofilm formation by counteracting curli-mediated colonization of solid surfaces in *Escherichia coli*. *Microbiology* 154, 2017–2024. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/018093-0>

Hardin, M. D., Acuff, G. R., Lucia, L. M., Oman, J. S., Savell, J. W. (1995). Comparison of methods for decontamination from beef carcass surfaces. *J Food Prot* 58, 368-374.

Hayes, P.R. (2002). Higiene de los alimentos, microbiología y HACCP. 2ª edición. Acribia, España. 359- 386p.

Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G. y Wright, A. V. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 3590- 3595p.

Holah, J.T., Kearney, I.R. (1992). Introduction to biofilms in the food industry, en Melo LF, Bott TR, Fletcher m, Capdeville B (Eds). *Biofilms-Science and Technology*. Kluwer. Academic Press, Dordrecht. He Limpioherlands; 35-41.

Hollman Birte, Mark Perkins. (2011) Biofilms and their role in pathogenesis. *British Society immunology*. Recuperado de: <https://immunology.org/bitesized-immunology/biofilms.pdf>

Hood S., Zottola E. (1997). Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *Int J Food Microbiol* 37:145–53

Hung C. S. y Henderson J. P. (2009). Emerging concepts of biofilms in infectious diseases. *Mo Med.* 292-296p.

Jefferson, K. K., Goldmann, D. A., Pier, G. B. (2005). Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 2467–2473.

Jefferson, K.K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm. *FEMS Microbiology Letter*; 236: 163-173.

Jiang, X. y Pace, J.L. (2006). Microbial biofilms. In: *Biofilms, infection, and antimicrobial therapy.* Pace JL, Rupp M, Finch RG, Eds. CRC Press, USA; 34: 234-240.

Johnson, J. R., Jelacic, S., Schoening, L. M., Clabots, C., Shaikh, N., et al. (2005). The IrgA homologue adhesin Iha is an *Escherichia coli* virulence factor in murine urinary tract infection. *Infect Immun* 73, 965-971p.

Joseph, B., Otta, S. K., Karunasagar, I., Karunasagar, I. (2001). Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *Inter J Food Microbiol* 64, 367-372p.

Karmali, M. A. (2004). Prospects for preventing serious systemic toxemic complications of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections using Shiga toxin receptor analogues. *J Infect Dis* 189, 355-9.

Langridge, G.C., Nair, S., Wain, J., 2009, Nontyphoidal *Salmonella* serovars cause different degrees of invasive disease globally. *J Infect Dis* 199, 602-603.

Lasa, I., Del Pozo, J.L. y Penadés, J.R. (2009). Biofilms bacterianos e infección. Disponible en: <http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol28/n2/colaba.html> [acceso: 13-10-2009].

Ledeboer, N A, Jones, B D. (2005). Exopolysaccharide sugars contribute to biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on HEp-2 cells and chicken intestinal epithelium. *J Bacteriol.* 3214- 3226p.

Lianou, A., Koutsoumanis, K P. (2012). Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. *Int J Food Microbiology*. 171- 178p.

Lindsay, D. y Von Holy, A. (2008). Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *Journal Hospital Infection*; 64: 313-325.

Lonade y Blaker. (1981). Técnicas sanitarias en el manejo de los alimentos. Editorial Pax-Mex.

Lujan, M. y Blas, G. (2007). *Salmonella*. En: microbiología veterinaria. 1ra ed. Editorial Intermedical. Buenos Aires, Argentina. 594p.

Maillard. J. (2002) Bacterial target sites for biocide action. *Journal of applied microbiology symposium supplement*. 16-27p.

Manual de Buenas Prácticas de higiene y sanidad. Capítulo 9. Desinfección. Secretaría de Salud. Subsecretaría de regulación y fomento sanitario. Dirección General de Calidad Sanitaria de Bienes y Servicios. ISBN: 968-811-132-5. México, D.F. 1999.<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/capitulo9.html>. Acceso 25 Feb 2020.

Marsh PD. (2004) Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res*; 38: 204- 211.

Maurer, I.M. (1969). A test for stability and long-term effectiveness in disinfectants. *Pharm. J*. 525-538.

Molina, J., Manjarrez, Ma. Y Tagy, J. (2010). Microbiología. Bacteriología y Virología. Méndez Editores S.A de C.V. México D.F. 4a edición.

Molina. R., Díaz. V. (2006) Sanitización en la industria enológica. Universidad Politécnica de Madrid. *Alfa editors*. 15(4): 8-16p.

Moreno, B., García, M. (1999). Reflexiones sobre los procedimientos y medios utilizados para garantizar la seguridad o inocuidad de los alimentos. *Alimentaria*. 300p.

Mortimore, S., Wallace, C. (2004). HACCP. Acribia. Zaragoza España

Muñoz LF. (2005). Velocidad de desprendimiento de las biopelículas en tuberías de distribución de agua potable. Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.

Muro A, Castillo F, González F, y Barrera A. (2012). Biopelículas multi-especie: asociarse para sobrevivir. Investigación y Ciencia: de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. 49-56p.

Naidu, A. (2000). Natural food antimicrobial systems. CRC Press. Florida. USA.

Negi, P.S. (2012). Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. International Journal of Food Microbiology 156. 7-17p.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2014), Panorama de la seguridad alimentaria y nutricional en América Latina y el Caribe. Roma. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/a-i4018s>.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2013). Curso Principios de inocuidad alimentaria. Modulo: Higiene de los alimentos y buenas practicas.

Organización Panamericana de la Salud (PAHO). (2014) Manual de capacitación para manipuladores de alimentos. Washington EEUU. Recuperado de: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/manual-manipuladores-alimentos-2014>

Pasteran, F., Corso, A. y Galas, M. (2003). Manual de procedimientos *Salmonella*. Parte II. Sensibilidad de los antimicrobianos. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Global Salm- Surv. Buenos Aires, Argentina.

Pedersen, K. (1990). "Biofilm Development on Stainless Steel and PVC Surfaces in Drinking Water" Water Research; 24: 239-243.

Pederson. (1990). Biofilms. Science 224p.

Pérez, R. D.; Domínguez, V. I. y Sosa, E. 2002. Evaluación del método de siembra en placa traza de la dilución, en el control de calidad de bancos de mutantes de

Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., Carrasco, E., García, R.M. y Zurera, G. (2008). Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review. Trends in Food Science & Technology; 19: 131-144.

Piera-Serra, G. (2003). Estudio de biofilms: Formación y consecuencia. Recuperado de: www.seguretatintegral.cat/noucat/recerca/linies/biorisc/alimentaria/biofilm.pdf.

Pino P., Jorge L. (2010). Ensayo de Artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. Rev Protec Veg. 22 (1): 34-43.

Podolak, R., Enache, E., Stone W., Black D. G., Elliott P. H. (2010). Sources and risk factors for contamination, survival, persistence, and heat resistance of *Salmonella* in low-moisture foods. J.Food Prot. 1919–1936p.

Rodriguez, J., Mayavales, M.C. (2001). Desarrollo y puesta a punto de un nuevo método sencillo y efectivo de limpieza y desinfección en la industria alimentaria. Alimentaria; 32319-24.

Romeo, T. (2008). Bacterial biofilms: *Escherichia coli* biofilms. Berlin:Springer. 249-289p.

Römling, U. (2007). Cellulose biosynthesis in Enterobacteriaceae. Springer Verlag, Dordrecht. 107- 122p.

Rusell, A. (1982). Principles and practice of disinfections preservation and sterilization. Blackwell. USA.

Secretaria de Salud. (1993). Manual de Buenas Practicas de Higiene y Salud. México, D.F.

Silwa, J. (2005). Identificación de bacterias en el agua biofilms. Reunión general de la sociedad americana para la microbiología. Atlanta, Georgia.

Speranza, B., Corbo, M.R y Sinigaglia, M. (2011). Effects of Nutritional and Environmental. Conditions on Salmonella sp. Biofilm Formation. Journal of Food Science; 76: 13-14.

Stepanovic, S., Circovic. I., Ranin. L., Svabic-Vlahovic, M. (2004). Biofilm formation by Salmonella spp. and Listeria monocytogenes on plastic surface. Appl. Microbiol. 38:428-432.

Vanegas, L., Correa, C., Morales, M., Martínez, L., Rúgeles, G., Jiménez, I. (2009). Antibiotic resistance of bacteria isolated from biofilms in a food processing plant. Rev. MVZ Córdoba.

Vanhaecke P., Persoone G. (1984) The ARC-Test: a standardized short-term routine toxicity tes with Artemianaupilli. Metodology and evaluation Ecotoxicological Testing for the marine environ. 143-157p.

Verran J., Boyd R., Hall K., West R. (2001). Microbiological and chemical analyses of stainless steel and ceramics subjected to repeated soiling and cleaning treatments. J Food Prot 64:1377–87.

Widner, A., Frei, R. (1990). Correlation between in vivo and in vitro efficacy of antimicrobial agents against foreign body infections. Journal Infect. Dis. 162: 96-102

Wildbrett, G. (2000). Limpieza y desinfección en la industria alimentaria. Acribia. España Zaragoza.

Wirtanen, G., Husmark, U. y Matillasandholm, T. (1996). Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with Bacillus biofilms after rising and cleaning procedures in closed food processing systems. J Food Protect. 727p.

Witkowska, A.M., Hickey, D.K., Alonso-Gomez, M., Wilkinson, M. (2013). Evaluation of antimicrobial activities of commercial herb and spice extracts against selected food-borne bacteria. Journal of Food Research 2, 37p.

Zelver, N. (2004). Control y análisis del desarrollo del biofilm en lo referente a los alimentos y equipo de transformación de los alimentos. Centro para la ingeniería del Biofilm. Universidad de Montana. Bozeman.

**ANEXOS: DESCRIPCIÓN DE TÉCNICAS, SOLUCIONES, ABREVIATURAS,
ETC.... (OPCIONAL)**