



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

EVALUACIÓN DE TRES SANITIZANTES EN SU CAPACIDAD PARA ELIMINAR  
BACTERIAS PRODUCTORAS DE BIOPELÍCULAS PROCEDENTES DE UNA  
PLANTA PROCESADORA DE CÁRNICOS:

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
INGENIERA EN ALIMENTOS

PRESENTA:

CANO GONZÁLEZ MARÍA ELENA

ASESOR: DRA. CLARA INÉS ÁLVAREZ M.  
COASESOR: I.A ANA MARÍA DE LA CRUZ J.

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO  
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



ATN: L.A. ARACELI HERRERA BERNÁNDEZ  
Jefa del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos la: Tesis

Evaluación de tres sanitizantes en su capacidad para eliminar bacterias productoras de biopelículas procedentes de una planta procesadora de cárnicos

Que presenta el pasante: María Elena Cano González

Con número de cuenta: 306071706 para obtener el Título de: Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalí, Méx. a 11 de Abril de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Clara Inés Álvarez Manrique	
VOCAL	IBQ. Saturnino Maya Ramírez	
SECRETARIO	Dra. Carolina Moreno Ramos	
1er. SUPLENTE	IA. Ana María Soto Bautista	
2do. SUPLENTE	IA. Verónica Romero Arreola	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

1111A/pm

## AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por ser la institución que me brindo todos los conocimientos necesarios para lograr concluir con éxito mi carrera profesional, especialmente a la **FESC Cuautitlán** ya que fue donde inicie mi carrera universitaria.

A mi asesora la **Dra. Clara Inés Álvarez Manrique** a la cual le tengo una gran admiración, gracias por haber dirigido este proyecto enriqueciéndome cada día con sus conocimientos, le agradezco su paciencia, confianza y apoyo.

A mi coasesora la **I.A Ana María de la Cruz Javier** porque siempre me trasmitió que el esfuerzo constante conlleva a grandes logros y por la gran calidad humana que posee.

A la profesora **I.A Ana María Soto Bautista** por todos sus consejos y por las aportaciones que enriquecieron este proyecto.

Al **MVZ Andrés Cardona Leija** por brindarme las facilidades para hacer uso de las instalaciones del CEA, durante el desarrollo experimental de mi proyecto.

Al **Laboratorio de Microscopía Electrónica** especialmente a la profesora **M en C Sofía González Gallardo** por su disposición y tiempo, por su respaldo y apoyo durante la experimentación en lo referente a microscopía.

Al **Laboratorio de Microbiología**, por haberme proporcionado los materiales y equipos, para la realización de mi tesis.

A mis **padres Ma. Elena González y Francisco Cano** por estar siempre en los momentos que los he necesitado, les agradezco todo el esfuerzo que han hecho, por su amor y apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida, por consentirme y preocuparse por mí, gracias a todos sus sacrificios ha valido la pena. Los amo.

A mis hermanos **Paco, Miriam y Yazmín** por ser siempre un ejemplo para mí, por alentarme en mis decisiones y por todo su cariño. Gracias por enseñarme que con esfuerzo y constancia se pueden alcanzar los objetivos.

A mi **abuelita** por siempre confiar en mí.

A mis **amigos** especialmente **Ahtziri Sánchez S., Jessica Manríquez M. y Natanael Salvador Montiel T.** por acompañarme en todo momento, por hacerme la vida mucho más fácil y feliz todos estos años que hemos compartido y por vivir junto a mí este gran reto.

A **Christopher Calderón Escutia** por ser una persona muy especial en mi vida, por apoyarme en las buenas y en las malas, por tu comprensión y por ser mi ejemplo de constancia y perseverancia en la vida.

A todos los que aportaron de una u otra forma a la realización de este proyecto.

**GRACIAS!**

*Enseñarás a volar pero no volarán tu vuelo,  
enseñarás a soñar pero no soñarán tu sueño,  
enseñarás a vivir pero no vivirán tu vida,  
pero cada vez que vuelen, sueñen o vivan  
perdurará siempre la huella del  
camino enseñado.*

*Madre Teresa de Calcuta*

## ÍNDICE

### RESUMEN

INTRODUCCIÓN.....	1
1. GENERALIDADES.....	2
1.1 Sanitizantes.....	2
1.1.1 Definición.....	2
1.1.2 Características.....	2
1.1.3 Clasificación.....	2
1.1.3.1 Compuestos que liberan cloro.....	3
1.1.3.2 Compuesto de cuaternario de amonio.....	4
1.1.3.3 Yodóforos.....	5
1.1.3.4 Compuestos anfóteros.....	7
1.1.3.5 Agentes oxidantes productores de oxígeno.....	7
a) Ácido peracético.....	7
b) Peróxido de hidrógeno.....	8
1.1.4 Criterios de elección.....	9
1.1.5 Factores que alteran su efectividad.....	10
1.1.6 Resistencia de los microorganismos a los sanitizantes.....	13
1.2 Biopelículas formadas por microorganismos.....	14
1.2.1 Definición.....	14
1.2.2 Fases de desarrollo.....	15
1.2.3 Factores que influyen su desarrollo.....	17
1.2.4 Factores que afectan su desarrollo.....	18
1.2.5 Microorganismos con capacidad de formar biopelículas.....	19
1.3 Limpieza y sanitización en la Industria Cárnica.....	19
1.3.1 Higiene personal.....	20
1.3.2 Equipo e instalaciones.....	21
1.3.2.1 Características de diseño de los equipos.....	21
1.3.2.2 Características de diseño de las instalaciones.....	22
1.3.3 Tipo de suciedad.....	22
1.3.4 Energía mecánica aplicada en la limpieza y sanitización.....	23

1.3.4.1 Limpieza y sanitización manual.....	23
1.3.4.2 Limpieza y sanitización industrial mecanizada.....	24
2. CUADRO METODOLÓGICO.....	25
3. OBJETIVOS.....	27
4. METODOLOGÍA.....	28
2.3 Materiales y Métodos.....	28
2.3.1 Diagnóstico e identificación de puntos de riesgo en la planta.....	28
2.3.2 Muestreo.....	28
2.3.3 Aislamiento de bacterias en medios enriquecidos.....	32
2.3.4 Capacidad de formación de biopelículas “ <i>in vitro</i> ”.....	32
2.3.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana “ <i>in vitro</i> ” de los sanitizantes por el método de dilución en tubo.....	45
2.3.6 Confirmación de la actividad bactericida/bacteriostático de los sanitizantes en estudio.....	47
2.3.7 Detección de estructuras bacterianas relacionadas en la formación de biopelículas.....	47
2.3.7.1 Interacción de las cepas formadoras de biopelículas.....	49
3. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	50
3.1 Obtención de la muestra biológica.....	50
3.2 Selección de las bacterias formadoras de biopelículas.....	52
3.2.1 Identificación de las cepas.....	54
3.2.2 Eficacia biocida de los sanitizantes a las concentraciones que recomienda el fabricante.....	59
3.3 Detección de estructuras bacterianas por microscopía electrónica de transmisión.....	69
4. CONCLUSIONES.....	75
5. RECOMENDACIONES.....	75
ANEXOS.....	76
BIBLIOGRAFÍA.....	82



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fases de desarrollo	15
Figura 2. Identificación de puntos de riesgo en Cuchillos	29
Figura 3. Identificación de puntos de riesgo en la Mesa de corte	29
Figura 4. Identificación de puntos de riesgo Sierra de Banco	30
Figura 5. Identificación de puntos de riesgo en el molino	30
Figura 6. Identificación de puntos de riesgo en la Rebanadora	31
Figura 7. Identificación de puntos de riesgo en la cámara de refrigeración A	31
Figura 8. Identificación de puntos de riesgo en la cámara de refrigeración B	31
Figura 9. Esquema comparativo de las paredes celulares de las bacterias Gram positivas y negativas	33
Figura 10. Toma de muestra	35
Figura 11. Interpretación de resultados de la prueba oxidasa	35
Figura 12. Preparación de la muestra	36
Figura 13. Interpretación de resultados de la prueba catalasa	36
Figura 14. Interpretación de resultados de la prueba fermentación de hidratos de carbono	37
Figura 15. Interpretación de resultados de la prueba fermentación de O-F	39
Figura 16. Interpretación de resultados de la prueba de ureasa	40
Figura 17. Interpretación de resultados de la prueba reducción de nitratos	41
Figura 18. Interpretación de resultados de la prueba de rojo de metilo	42
Figura 19. Interpretación de resultados de la prueba VP	43
Figura 20. Interpretación de resultados de la prueba citrato	44
Figura 21. Interpretación de resultados de la prueba licuefacción de la gelatina	44
Figura 22. Estandarización de bacterias	45
Figura 23. Siembra en placa por gota	46
Figura 24. Método de dilución en tubo	47
Figura 25. Preparación de las membranas plásticas	48
Figura 26. Colocación de rejillas en muestra	48
Figura 27. Tinción en ácido fosfotúngstico	49
Figura 28. Plano de distribución de áreas en la planta	50
Figura 29. Evolución de la biopelícula	53

Figura 30. Cepa 1	55
Figura 31. Cepa 2	55
Figura 32. Cepa 3	55
Figura 33. Cepa 4	55
Figura 34. Cepa 5	55
Figura 35. Oxidasa positiva	56
Figura 36. Catalasa positiva	56
Figura 37. Resultado de la prueba de Glucosa	56
Figura 38. Resultado de la prueba de Manitol	56
Figura 39. Resultado de la prueba de Arabinosa	56
Figura 40. Resultado de la prueba de O-F	57
Figura 41. Resultado de la prueba de reducción de Nitratos	57
Figura 42. Resultado de la prueba de rojo de metilo	57
Figura 43. Resultado de la prueba de VP	57
Figura 44. Resultado de la prueba de Citrato	57
Figura 45. Resultado de la prueba de Licuefacción de la Gelatina	58
Figura 46. Resultado de la prueba de Urea	58
Figura 47. Fotografías pertenecen a una cepa clasificada como “baja formación de biopelícula”	69
Figura 48. Fotografías tomadas a una cepa clasificada como “moderada formación de biopelícula”	70
Figura 49. Fotografías tomadas a una cepa clasificada como “alta formación de biopelícula”	71
Figura 50. Fotografías de la formación de biopelículas de las cinco cepas en estudio	72
Figura 51. Apéndices bacterianos	73
Figura 52. Fotografías de la interacción entre una cepa con “alta” capacidad para formar biopelículas con dos cepas con “baja” capacidad para formar biopelículas	74

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de agua según su grado de dureza	12
Tabla 2. Características de la Suciedad	23
Tabla 3. Condiciones de uso de los sanitizantes a evaluar	46
Tabla 4. Detección de puntos con riesgo de tener microorganismos formadores de biopelículas en el área de corte	51
Tabla 5. Resultados de la coloración de GRAM	54
Tabla 6. Resultados de las pruebas bioquímicas para la identificación de las bacterias	55
Tabla 7. Identificación de las bacterias	58
Tabla 8. Efecto antibacteriano del sanitizante a base de hipoclorito de sodio	61
Tabla 9. Efecto antibacteriano de sanitizante a base de sales de amonio cuaternario	63
Tabla 10. Efecto antibacteriano del sanitizante a base de ácido peracético	65

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Clasificación visual de las cepas según el espesor de la biopelícula formada	54
Gráfica 2. Evaluación “in vitro” del sanitizante a base de hipoclorito de sodio	59
Gráfica 3. Evaluación “in vitro” del sanitizante a base de amonio cuaternario	61
Gráfica 4. Evaluación “in vitro” del sanitizante a base de ácido peracético	63
Gráfica 5. Comportamiento de los sanitizantes a base de hipoclorito de sodio, amonio cuaternario y ácido peracético frente a la inhibición del crecimiento de bacterias productoras de biopelículas	66
Gráfica 6. Análisis Estadístico ANOVA Hipoclorito de Sodio	67
Gráfica 7. Análisis Estadístico ANOVA Amonio Cuaternario	68
Gráfica 8. Análisis Estadístico ANOVA Ácido Peracético	68

## **LISTADO DE ABREVIATURAS**

SSF	Solución Salina Fisiológica
OF	Oxidación-Fermentación
RM/VP	Rojo de Metilo/Voges Proskauer
BHI	Infusión Cerebro Corazón
AFT	Ácido Fosfotúngstico

## **LISTADO DE MEDIOS DE CULTIVO**

Agar Casoy  
Caldo Infusión Cerebro Corazón  
Glucosa en base caldo rojo fenol  
Manitol  
Arabinosa  
Caldo RM/VP  
Citrato de Simmons  
Caldo Nutritivo Gelatina  
Caldo Urea  
Agar Biotriptasa

## RESUMEN

La industria de alimentos, en continua mejora y desarrollo, exige constantemente de mejores productos sanitizantes en sus áreas de producción, instalaciones, equipos y/o utensilios involucrados en el procesamiento de alimentos que ayudan a prevenir y reducir la contaminación microbiológica presente en las plantas elaboradoras de alimentos. Es por ello que se realizó un estudio in vitro de la actividad antibacteriana de tres sanitizantes utilizados en una planta procesadora de cárnicos en donde se tomaron muestras de superficies, equipos y utensilios del área de corte una vez finalizados los procesos de limpieza y sanitización.

La evaluación de los sanitizantes con principio activo a base de hipoclorito de sodio, amonio cuaternario y ácido peracético se llevó a cabo mediante la técnica de dilución en tubo a las condiciones que establece el fabricante (400 ppm, 800 ppm y 300 ppm) respectivamente, con un tiempo de exposición de 15 minutos sobre cinco cepas formadoras de biopelículas identificadas mediante la tinción de gram y pruebas bioquímicas por los géneros *Bacillus*, *Comamomas spp* y *Corynebacterium spp*.

En las condiciones evaluadas se obtuvo con el sanitizante a base de hipoclorito de sodio un porcentaje de inhibición del 13.1% para la cepa 1 (bacilo gram positivo esporulado), para las cepas 2 (bacilo gram positivo esporulado) y 3 (bacilo gram positivo esporulado) del 4.5%, para la cepa 4 (bacilo gram negativo) del 54.5% y para la cepa 5 (bacilo pleomórfico gram positivo) del 62.8%. En el caso de la evaluación con el sanitizante a base de amonio cuaternario se obtuvo un porcentaje de inhibición de 17.7% para la cepa 1, para la cepa 2 de 13.7%, para la cepa 3 de 33.4%, para las cepa 4 de 54.5% y para la cepa 5 del 62.8%. El sanitizante a base de ácido peracético mostró un porcentaje de inhibición de 25.6% para la cepa 1, en el caso de la cepa 2 fue de 18.3%, para las cepas 3 y 4 se obtuvo un porcentaje del 54.5% y para la cepa 5 del 62.8%.

Los resultados del presente estudio demostraron que los sanitizantes evaluados a la concentración y tiempo que establece el fabricante fueron efectivos frente a bacterias no esporuladas, ya que de acuerdo al porcentaje de inhibición presentaron el mismo comportamiento obteniéndose una reducción de 3 y 5 ciclos logarítmicos.

## INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas en la industria alimentaria está representado por la supervivencia de microorganismos patógenos o alterantes debido a una desinfección insuficiente de las superficies o de los instrumentos en contacto con los alimentos (Carpentier & Cert, 1993; Fuster, 2006).

Con frecuencia, los microorganismos se encuentran adheridos firmemente a las superficies del equipo por lo que son necesarios procedimientos meticulosos para desprenderlos; un claro ejemplo de estos son aquellos microorganismos formadores de biopelículas los cuales poseen las características de unirse firmemente a superficies, generando una matriz que los protege de los efectos estresantes del roce, flujo turbulento y de la actividad de sustancias químicas tales como detergentes y sanitizantes (Mortimore, 2004).

La formación de biopelículas es una estrategia adaptativa de los microorganismos, ya que el crecimiento en la biopelícula les ofrece cuatro ventajas importantes: (1) protege a los microorganismos de la acción de los agentes adversos, (2) incrementa la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento, (3) facilita el aprovechamiento del agua, reduciendo la posibilidad de deshidratación y (4) posibilita la transferencia de material genético (ADN). Todas estas circunstancias pueden incrementar sus capacidades de supervivencia (Costerton et al., 1999; Donlan, 2002). Esta formación de biopelículas se ve favorecida por un diseño higiénico inadecuado, un deficiente programa de limpieza y desinfección o por un mal mantenimiento de los materiales e instalaciones (Iranzo et al., 2012).

En el caso de la industria cárnica los restos de carne, grasa y aditivos utilizados en la elaboración de productos cárnicos que quedan adheridos a los equipos y/o utensilios dejan de ser productos alimenticios cuando, acabado el proceso, son restos de materias impuras y un medio rico en nutrientes para los microorganismos (Puig-Durán, 2002).

Este estudio permitirá comprobar la efectividad “*in vitro*” de tres sanitizantes comerciales con el fin de eliminar las bacterias presentes en las biopelículas que se puedan formar sobre equipos y/o utensilios del área de corte, lo cual dará pauta para que la planta tome acciones correctivas en la aplicación de los sanitizantes si así fuese necesario y con ello favorecer la calidad y seguridad de los alimentos que se comercializan actualmente.

## 1. GENERALIDADES

### 1.1 Sanitizantes

#### 1.1.1 Definición

Según FDA (*Food and Drugs Administration*) un sanitizante es un agente químico o físico el cual reduce los niveles de contaminación microbiana en una superficie inanimada, destruye en 10 ó 15 minutos todos los microorganismos patógenos, alterando lo menos posible el sustrato donde residen y abarcando todas las formas vegetativas de bacterias, hongos y virus (Marriott, 2003).

Por otra parte, EPA (*Environmental Protection Agency*) completa esta definición especificando que un sanitizante es un agente químico utilizado en superficies inanimadas cuyo objetivo es destruir o inactivar de forma irreversible mohos y bacterias, no necesariamente sus esporas (Luppens et al., 2002)

El EPA señala que los sanitizantes son utilizados para reducir una cuota bacteriana en un 99.99%, no necesariamente eliminar microorganismos de áreas inanimadas, a niveles que se consideren seguros por los códigos o regulaciones de salud pública y que tienen como fin disminuir o eliminar el número de microorganismos que se encuentran en áreas que pueden entrar en contacto con los alimentos (Marriott, 2003; Goldin, 2008).

#### 1.1.2 Características

Los sanitizantes que se deseen utilizar en las superficies que contactan con los alimentos deben cumplir, en condiciones ideales lo siguiente (Forsythe & Hayes, 2002; García, 1989):

- Destruir rápidamente los microorganismos, siendo igual de eficaces con las Bacterias Gram positivas que con las Gram negativas. Deben destruir la mayoría de las esporas fúngicas, siendo también conveniente la destrucción de las esporas bacterianas.
- Ser eficaz en cualquiera que sea la calidad del agua empleada.
- Ser eficaz en presencia de materia orgánica.
- No ser corrosivos.
- No ejercer una acción perjudicial sobre las superficies a tratar.
- Ser inodoras y no desprender olores desagradables.
- No debe ser tóxico a las dosis de empleo.
- Fácilmente soluble en el agua.
- Estables durante mucho tiempo en forma concentrada y durante un tiempo más breve en forma diluida.
- Económicamente competitivos y al emplearlos presentar una buena relación costo/efectividad.

#### 1.1.3 Clasificación

Los sanitizantes químicos disponibles para ser utilizados en el procesamiento de alimentos varían en su composición química y actividad, dependiendo de las condiciones donde van a

ser aplicados (Marriott, 2003). Los empleados en la industria alimentaria, se limitan a los siguientes grupos:

### **1.1.3.1 Compuestos que liberan cloro**

En general los compuestos que liberan cloro son sanitizantes potentes de espectro de actividad amplio. Son sensibles tanto las bacterias Gram positivas, como Gram negativas; además estos compuestos presentan cierta actividad frente a esporas bacterianas.

Muchos de los compuestos que liberan cloro son baratos, todos son fáciles de usar y no les afecta el agua dura. Sin embargo para prevenir los efectos de la corrosión deben enjuagarse muy bien y es imprescindible mantener un pH alto, lo que acarrea, como consecuencia, cierta pérdida de la actividad bactericida (Forsythe & Hayes, 2002). La efectividad del cloro como sanitizante es determinado en gran parte por el pH. El rango de pH recomendado para una solución sanitizante efectiva y segura es de 6.5 a 7.5. Las soluciones con valores de pH menores a 6.0 son más corrosivas; lo que disminuirá la vida del equipo tratado. Las soluciones con valores de pH menores a 5.0 comenzarán a generar niveles potencialmente dañinos de gas de cloro, y las soluciones con valores de pH mayores a 8.0 pierden rápidamente su efectividad como sanitizantes. Valores altos de pH pueden convertirse en un problema si el agua utilizada para la solución sanitizante es naturalmente alcalina ( $\text{pH} > 7$ ). Puede ser también un problema si los residuos de detergentes, que generalmente son alcalinos, se dejan en el equipo o superficies de contacto con alimentos sanitizados con cloro. Se debe asegurar que las superficies se enjuaguen muy bien antes de utilizar un sanitizante con cloro (McGlynn, 2007).

Los agentes químicos que liberan cloro son corrosivos para la mayoría de los metales, incluido el acero inoxidable, por lo que no se deben utilizar en superficies que sean propensas a oxidarse. A una baja concentración en condiciones alcalinas, a baja temperatura y poco tiempo de contacto, los peligros de corrosión se minimizan y la acción desinfectante permanece eficaz (Marriott, 2003). Además, las soluciones de cloro irritan la piel y los gases irritan en tracto respiratorio. Estas soluciones se deben utilizar con una ventilación adecuada y ropa protectora (McGlynn, 2007).

El cloro disponible del hipoclorito de sodio ( $\text{NaOCl}$ ) y otros agentes químicos que liberan cloro reaccionan rápidamente con la materia orgánica y se inactivan por esta; en condiciones de uso normal, el volumen de solución y la concentración son tales que la cantidad de suciedad presente en el equipo no afectan considerablemente la eficacia de la solución sanitizante.

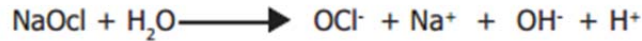
El hipoclorito de sodio se presenta en solución a una concentración de 5,25%. Para las desinfecciones, las diluciones en uso son entre 0,1% y 1%. Las ventajas de esta solución sobre los otros sanitizantes incluyen la baja toxicidad a concentraciones de uso, la facilidad de manejo y el costo relativamente bajo (Sánchez & Sáenz, 2005).

El hipoclorito de sodio es relativamente inestable a la temperatura y luz. Los derivados clorados, en forma de polvo, son más estables y sensibles a la humedad. El cloro gaseoso,



el hipoclorito de sodio y los derivados clorados dan ácido hipocloroso (HClO) en presencia de agua (Leveau, 2002). Esta reacción ocurre de la siguiente manera:

Primero el NaOCl se disocia y disuelve químicamente en el agua



Entonces, el ión hipoclorito ( $\text{OCl}^-$ ) reacciona con los iones de hidrógeno en el agua para formar ácido hipocloroso.



La acción sanitizante de las soluciones de hipoclorito se debe a su propiedad de difundir el ácido hipocloroso a través de las paredes celulares de las bacterias, con lo que se destruyen sus componentes vitales, es decir, se basa en el poder oxidante del ácido hipocloroso (forma activa) que entraña una destrucción de las proteínas estructurales y un bloqueo de la actividad enzimática. La fuerza desinfectante depende de la concentración de HOCl, por tanto, del valor de pH (Marriott, 2003).

Los generadores de ácido hipocloroso son muy buenos bactericidas y virucidas. La actividad fungicida es poco marcada. El potencial de actividad es muy dependiente de la proporción de materia orgánica. Los derivados clorados son principalmente utilizados en tratamiento de superficies y circuitos de tuberías, después de la limpieza (Leveau, 2002).

Incompatibilidad de compuestos que liberan cloro:

- Los derivados del cloro no deben ser mezclados con un compuesto ácido.
- La asociación con los compuestos catiónicos, sales de amonio y productos que liberan oxígeno activo deben ser evitados.
- La presencia de detergentes alcalinos provoca una disminución de la actividad.
- Reacciona violentamente con ácidos, metales pesados, éter, amoniaco y compuestos nitrogenados (Leveau, 2002; Moreno, 2010).

### 1.1.3.2 Compuesto de cuaternario de amonio

Los compuestos de amonio cuaternario, conocidos como QACs (*Quaternary Ammonium Compounds*) son esencialmente sales de amonio con algunos o con todos los átomos de ión ( $\text{NH}_4^+$ ) sustituido por grupos alquilo o arilo. Los QACs más utilizados son el bromuro de cetiltrimetilamonio y el cloruro de laurildimetilbenzil-amonio (Medina & Valencia, 2008).

Estos sanitizantes son muy activos frente a bacterias Gram positivas, siendo menos eficaces frente a las Gram negativas. Las superficies después de sanitizadas con QACs, presentan una película bacteriostática debido a la absorción del sanitizantes en la superficie, esta película evita el crecimiento de las bacterias residuales y además mantienen su actividad en un amplio rango de pH, si bien donde son más activos es en condiciones alcalinas débiles (Aldana & Sarassa, 1999; Marriott, 2003).

Los QACs mantienen su actividad en un intervalo de pH de 5-10; por encima de 10 y por debajo de 4, disminuye notablemente su eficacia. De acuerdo con la flora a combatir y las condiciones de empleo, las concentraciones eficaces oscilan entre 100mg/l (bacterias gram positivas y levaduras) y 10.000 mg/l (bacterias Gram negativas y mohos) (Esain, 2000). Habitualmente se utilizan a concentraciones entre 50 y 500 ppm, a temperaturas mayores de 40°C y con tiempos de contacto que varían entre 1 y 30 minutos. Se ven poco afectados por la presencia de restos orgánicos, no son corrosivos ni irritan la piel, por esto pueden manipularse con bastante seguridad (Forsythe & Hayes, 2002), tienen buena capacidad de penetración y actúan como agentes humectantes con propiedades detergentes adicionales, por esto son considerados como surfactantes sintéticos (Marriott, 2003), se ven poco afectados por la presencia de restos orgánicos. Tienen buena capacidad de penetración, lo que los hace útiles en superficies porosas. Son agentes humectantes y puesto que son surfactantes catiónicos, poseen cierto poder detergente por lo que no pueden emplearse junto con los surfactantes aniónicos, ni tampoco con algunos detergentes activos de superficie no iónicos (Sánchez & Sáenz, 2005).

El mecanismo de la acción de los QACs se basa en que son sustancias que lesionan la membrana celular debido a que desorganizan la disposición de las proteínas y fosfolípidos, por lo que se liberan metabolitos desde la célula, interfiriendo con el metabolismo energético y el transporte activo. Los QACs no matan esporas bacterianas, inhiben su crecimiento (Marriott, 2003).

Incompatibilidad de los compuestos de amonio cuaternario:

- Incompatible con jabones o detergentes aniónicos
  - Metales pesados.
  - Baja tolerancia al agua dura.
  - Actividad limitada a baja temperatura.
  - La presencia de detergentes catiónicos.
  - No debe mezclarse con peróxidos y con yoduros.
  - Oxidantes y reductores fuertes.
  - Alcalinos clorados.
  - Polifosfatos.
  - Ácidos y alcalinos fuertes.
- (Medina, 2005; Moreno, 2010).

### 1.1.3.3 Yodóforos

En los últimos años se ha desarrollado una variedad de productos que permiten tener gran cantidad de yodo activo. La forma activa del yodo como sanitizante es la especie molecular I<sub>2</sub>. Un yodóforo es una combinación de yodo y una sustancia solubilizante, formando así un complejo que libera lentamente yodo orgánico (Sánchez & Sáenz, 2005).

Estos complejos tienen amplio espectro de actividad sobre una variedad de microorganismos que incluyen bacterias, virus, protozoos, hongos, levaduras y esporas (Rocha et al., 2006). Los informes publicados sobre la eficacia antimicrobiana *in vitro* de los yodóforos, demuestran que estos son bactericidas, virucidas y micobactericidas, es

necesario tiempos prolongados de contacto para destruir determinados hongos y esporas de bacterias (Jiménez, 2012).

Al disolver un yodóforo en agua, sea ésta potable o no, es importante considerar la dureza total que contiene el agua, ya que la dureza sobre ciertos niveles de concentración produce un aumento de pH de la solución de trabajo. Esto significa que se inactiva parte del yodo activo ( $I_2$ ) que contiene el producto.

Las condiciones ácidas aumentan su actividad bactericida. Las soluciones diluidas de yodóforos exhiben máxima actividad y estabilidad en soluciones ácidas a niveles de pH de 3 a 5,5. Así por ejemplo, el poder sanitizante de un yodóforo en solución a pH 9 (alcalino) es inferior a un 75% al poder sanitizante que tiene el mismo yodóforo en solución pH 5 (ácido). Por lo tanto, es importante que un yodóforo contenga niveles adecuados de ácidos (ya sean éstos de naturaleza orgánica o inorgánica) para neutralizar la acción negativa de la dureza del agua. Tales combinaciones de ácidos son complejas, pero permiten que el producto diluido en distintas calidades de agua, realmente cumpla su función desinfectante en la forma deseada, y no sea un producto corrosivo para los materiales frente a los cuales se emplean (Valdebenito, 2010). La materia orgánica inactiva el yodo de las soluciones yodóforas provocando además el desvanecimiento del color ámbar (Medina & Valencia, 2008). Los yodóforos son caros y consecuentemente no se utilizan mucho; no son corrosivos, ni irritantes, ni tóxicos y tienen un ligero olor, hay que enjuagar bien después de su empleo. Algunos materiales plásticos absorben el yodo y se colorean al exponerlos a estos compuestos, por lo que deben evitarse los contactos prolongados con los yodóforos para prevenir la posible tinción de los alimentos; son estables en forma concentrada, si bien después de largos períodos de almacenamiento a temperaturas altas es posible una cierta pérdida de actividad (Forsythe & Hayes, 2002).

El mecanismo de acción del yodo se basa en la capacidad de penetrar rápidamente en las paredes de la célula de los microorganismos, por lo que se cree que sus efectos letales se deben a la ruptura de la estructura de la proteína, del ácido nucléico y a la interrupción de su síntesis (Jiménez, 2012).

También es importante considerar que un yodóforo, por sí solo no garantiza una buena desinfección si previamente no se ha realizado un buen proceso de limpieza, utilizando un detergente adecuado, para retirar toda la suciedad visible/materia orgánica sobre las superficies a sanitizar (Valdebenito, 2010).

**Incompatibilidad de los yodóforos:**

No mezclarse con las siguientes sustancias: amoníaco, acetileno, acetaldehído, aluminio en polvo, metales activos, cloro líquido, alcalinos, hidróxido de amonio, antimonio, fluor, litio, magnesio, fósforo, potasio carburos de cesio, circonio, rubidio o litio, óxido de cesio, mercurio, trifloruro o acetiluro de cobre, hidruro de sodio, azida de plata, pentafluoruro de bromo (Moreno, 2010).

#### **1.1.3.4 Compuestos anfóteros**

Este tipo de sustancias se caracterizan porque poseen tanto carga positiva como negativa en la misma molécula. Poseen una estructura molecular con uno o más grupos funcionales que pueden ionizarse en disolución acuosa confiriendo al compuesto el carácter de tensoactivo aniónico o catiónico, según las condiciones del medio. El pH es el principal inductor de que se comporten como aniónicos (en condiciones de alcalinidad) o catiónicos (en condiciones de acidez) (Rodríguez, 2009).

Generalmente se utilizan poco y no son bactericidas especialmente potentes aunque pueden mezclarse con los amonios cuaternarios para mejorar su potencia. Estos compuestos son poco afectados por la materia orgánica o por la dureza del agua, no son corrosivos, no son tóxicos e incluso diluidos son inodoros y estables durante mucho tiempo, sin embargo suelen formar espuma. Debido a su alto precio y limitada actividad, los sanitizantes anfóteros no se utilizan mucho en la industria alimentaria (Hayes, 2002).

Incompatibilidad de los compuestos anfóteros:

- Ácidos, ciertos compuestos orgánicos.
- Reacciona con aluminio, estaño, zinc, bronce y latón.  
(Moreno, 2010)

#### **1.1.3.5 Agentes oxidantes productores de oxígeno**

##### **Ácido peracético**

El ácido peracético es un eficaz sanitizante que consiste en una combinación de peróxido de hidrógeno y ácido acético.

El ácido peracético es un antiséptico de tipo oxidante. Considerado un biocida más potente que el peróxido de hidrógeno, tiene la ventaja que destruye todo tipo de microorganismos, incluidos las esporas, no le afecta la materia orgánica y las aguas duras, por lo que se le ha definido como “amigable al ambiente” (Baldry & French, 1989; Baldry et al., 1991) cuyos productos de degradación son ácido acético, peróxido de hidrógeno, agua y oxígeno. Por lo tanto, no afecta al medio ambiente y se descompone en poco tiempo. Además, por requerir bajas concentraciones su costo es moderado. El ácido peracético no mancha y si se almacena concentrado resulta estable durante largo tiempo (Kyanko et al., 2010).

Su uso como agente oxidante para el proceso de desinfección en agua surge debido a su marcado poder oxidante y su amplio espectro biocida aún en presencia de materia orgánica (Rossi et al., 2007), cuya eficacia ha sido comprobada ante bacterias (Falsanisi et al., 2006), hongos, virus y esporas (Kitis, 2004). Su acción sanitizante no se ve afectada por los sólidos suspendidos, presenta una muy baja dependencia del pH, tiempos de contacto cortos y efectividad en tratamiento de efluentes primarios y secundarios (Rossi et al., 2007).

Las soluciones de ácido peracético son incoloras, de olor picante y lacrimógeno; es un oxidante potente, muy reactivo y causa quemaduras. El pH del ácido peracético es generalmente cercano a 1, por lo tanto es muy ácido; la estabilidad se mantiene respetando

las reglas estrictas (temperatura de almacenamiento baja y ausencia de metales pesados en los compuestos base durante la fabricación).

Su acción biocida se debe a la desnaturalización de proteínas, rompe los enlaces intramoleculares de los enzimas y compuestos de la membrana por ruptura oxidativa y provoca cambios de permeabilidad de la pared celular (Leveau, 2002).

Incompatibilidad del ácido peracético:

- No debe mezclarse con: álcalis, metales pesados, sales metálicas, ácidos fuertes y bases fuertes.
- Incompatible con compuestos de amonio cuaternario. (Belloso, et al., 2010)

### **Peróxido de hidrógeno (agua oxigenada)**

El peróxido de hidrógeno pertenece al grupo de los sanitizantes oxidantes, conocido comúnmente como agua oxigenada, dióxido de hidrógeno o hidroperóxido, su fórmula química es ( $H_2O_2$ ). Este producto se puede considerar como el sanitizante más natural. Se le encuentra espontáneamente en productos como la leche y la miel e igualmente en los tejidos vivos donde es el resultado del metabolismo celular (Leveau, 2002).

El peróxido de hidrógeno, por liberar oxígeno microbicida en el agua, es un principio activo que puede utilizarse sin dejar ningún tipo de residuo. Por lo mismo puede emplearse en la conservación de alimentos (Wildbrett, 2000).

El peróxido de hidrógeno es un biocida ampliamente empleado para desinfección, esterilización y antisepsia. Comercialmente se encuentra en concentraciones comprendidas entre el 3% y 90%. Considerado biodegradable, ya que se degrada rápidamente en oxígeno y agua. Posee un amplio rango de actividad y eficacia.

Esta eficacia disminuye cuando se desea eliminar esporas. En estos casos, la actividad esporicida se verifica cuando la concentración mínima de uso se encuentra comprendida entre el 10% y 30%, siendo generalmente necesario un incremento en el tiempo de contacto, superior siempre a 5 minutos (Galán, 2003). Es activo frente a bacterias y virus, según la concentración y condiciones de utilización. Estudios *in vitro* de soluciones de peróxido de hidrógeno al 3% han mostrado amplio espectro de eficacia, con mayor actividad frente a bacterias gram positivas (Sánchez & Sáenz, 2005).

Debido su buen comportamiento en la producción de residuos, el peróxido de hidrógeno está indicado especialmente para ser utilizado en operaciones próximas a los alimentos, como son la esterilización de envases y la sanitización de instalaciones al iniciarse los turnos de trabajo. Actuando sobre superficies limpias, las concentraciones habituales de empleo son, expresadas en  $H_2O_2$  (Wildbrett, 2000):

- 1.000-10.000 mg/L, para una desinfección en frío.
- 100-1.000 mg/L, para una desinfección en caliente.

- 30-300 mg/L, para una esterilización en caliente de superficies (material de envasado).

Incompatibilidad del peróxido de hidrógeno:

Sustancias a evitar: fierro, metales pesados, fierro galvanizado, cobre, madera, papel, agentes reductores, iones metálicos, materiales oxidables, ácidos fórmico, crómico y clorosulfónico (Moreno, 2010).

#### **1.1.4 Criterios de elección del sanitizante**

Las características particulares de cada sanitizante químico deben conocerse y comprenderse bien, lo que permitirá elegir el sanitizante más apropiado para una aplicación deseada (Marriott, 2003). Con lo que respecta a la elección del sanitizante adecuado para ser utilizado en la industria de los alimentos se debe incluir ciertos factores a considerar (Rámirez, 2006):

- *El margen microbicida del sanitizante.* No todos los sanitizantes matan a la totalidad de los microorganismos. Es necesario saber qué microorganismos pueden estar presentes y si un determinado sanitizante es capaz de matarlos.
- *La capacidad de un sanitizante para evitar la inactivación por materia orgánica:* La mayoría de los sanitizantes son inactivados, en distintos grados, por materia orgánica tal como la suciedad y restos de alimentos, debido a esto se pueden utilizar concentraciones mayores, tiempos prolongados, considerar una limpieza previa para eliminar el exceso de materia orgánica o una combinación de estos factores. Algunos detergentes en combinación con sanitizantes se inactivan entre sí, por lo que no deben ser mezclados a menos que se conozca su compatibilidad. Otras causas de la inactivación de un sanitizante pueden deberse a las aguas duras, el contacto con diversos plásticos, células y fibras no celulósicas.
- *Los sanitizantes deben ser capaces de alcanzar y establecer contacto con los microorganismos.* Esto no sucederá si dichos microorganismos se encuentran protegidos por capas de suciedad, por ello es necesario la limpieza previa a la sanitización. Se afirma que algunos sanitizantes tienen propiedades detergentes, hay casos en que la capacidad de los sanitizantes puede ser inactivada al penetrar las capas de materia orgánica.
- *Además de los aspectos microbiológicos, deben ser considerados factores tales como toxicidad, manchas y corrosión.* Para sanitizantes que no tiene un empleo específico en zonas donde se manipulan alimentos se les debe estudiar su toxicidad y capacidad para manchar. Si existe alguna sospecha de que un sanitizante tenga estos efectos, debe ser excluido. Determinados sanitizantes pueden iniciar y acelerar la corrosión de algunos aceros. Esto puede suponer un error costoso.
- *Naturaleza de la superficie a tratar.* Las superficies en contacto con los alimentos deben ser atóxicas e inabsorbentes, no porosas y no corrosivas. De los materiales

utilizados, el acero inoxidable es el más conveniente para las superficies que entran en contacto con los alimentos, como son los equipos. Si se llega a utilizar un material abrasivo para su limpieza éste puede provocar que la superficie queda rayada, con lo cual facilitará la corrosión. El empleo de productos cáusticos producirá picado de la superficie, pudiendo ocasionar también corrosión y por lo tanto la limpieza y desinfección del equipo resultarán difíciles de aplicar. La importancia de los fenómenos de adhesión a las superficies y a la formación de biopelículas puede proporcionar un alto grado de protección a las superficies frente a la mayoría de sanitizantes químicos habitualmente empleados. La eliminación de colonias adheridas a superficies lisas y pulidas puede realizarse mediante limpieza profunda, y la desinfección posterior podrá destruir los microorganismos que puedan estar presentes. En cambio, las superficies rugosas, agrietadas y oxidadas, ofrecen un ambiente óptimo para la formación de estas biopelículas que posteriormente serán más difíciles de eliminar.

- *Métodos de aplicación.* Cabe decir que la elección de un sanitizante químico tiene mucho que ver con la técnica o método de aplicación con el que se va a realizar. Por regla general en las sanitizaciones manuales se aplican productos no agresivos para el manipulador, utilizándose a concentraciones bajas y que sean eficaces a baja temperatura. Por otra parte, en el caso de la sanitización automática se admiten productos agresivos aunque no corrosivos para la superficie a tratar, utilizables a alta presión y en concentraciones elevadas.

### 1.1.5 Factores que alteran la efectividad de sanitizante

Los factores que alteran la efectividad de un sanitizante son:

- **Tipo de microorganismos:** Las formas más resistentes son las esporas bacterianas y fúngicas. Les siguen los cocos Gram positivos, los bacilos Gram positivos, y los bacilos Gram negativos (excepto *Pseudomonas* que son especialmente resistentes a los amonios cuaternarios). Los virus grandes con cobertura lipídica son más sensibles que los sin cobertura (Fuster, 2006).
- **Número de microorganismos:** Si la carga microbiana es elevada, se necesita una cantidad superior de sanitizante o un tiempo superior de exposición para conseguir un determinado nivel de desinfección. De ahí la necesidad de limpiar, previamente a la aplicación del sanitizante, pues se reducirá la carga microbiana y se eliminará materia orgánica, que no sólo protege a los microorganismos sino que también puede inactivar al sanitizante (Herruzo, 2000).

En cada intervalo de tiempo se destruye una fracción igual de población microbiana, por tanto, una población mayor necesitará más tiempo para su eliminación que una más pequeña (Leveau, 2002).

- **Tiempo de actuación:** Generalmente al aumentar el tiempo de contacto, aumenta la tasa de letalidad. El tiempo de contacto es uno de los factores críticos para asegurar la desinfección. El tiempo indicado para destruir a los microorganismos debe

especificarse en la etiqueta de los sanitizantes. Este es el tiempo durante el cual el sanitizante debe permanecer en contacto con el microorganismo para poder eliminarlo (Ninemeier, 2000).

- **Concentración del producto:** Cuanto más alta sea la concentración de un agente más rápidamente son destruidos los microorganismos. Sin embargo, la eficiencia de un agente no está normalmente relacionada directamente con su concentración; así, un aumento pequeño de su concentración puede ocasionar un incremento exponencial de su eficiencia, pero, por encima de este punto, puede que los aumentos en su eficiencia no incrementen en lo absoluto la velocidad de destrucción. A veces un agente es más eficaz a concentraciones bajas, tomando como ejemplo el etanol al 70% es más eficaz que al 95% pues su actividad aumenta en presencia de agua (Leveau, 2002).
- **Materia orgánica:** Interfiere la acción del sanitizante, debido a que la materia orgánica inactiva ciertos sanitizantes. Por ello hay que limpiar previamente a la desinfección. Además, de una forma no reactiva, la materia orgánica e inorgánica forman una barrera protectora, de tal manera, que los microorganismos son protegidos de sus efectos (Fuster, 2006).

La existencia de materia orgánica en el material a tratar afecta negativamente la potencia de los sanitizantes de tipo oxidante y de tipo desnaturalizante de proteínas, hasta el punto que pueden llegar a hacerlos inactivos en cuanto a su poder sanitizante y/o esterilizante (Leveau, 2002).

Por lo tanto, las sustancias orgánicas pueden influir por (Negroni, 2009):

- Formación de una cubierta protectora sobre el microorganismo que impida la acción del desinfectante.
  - Formación de compuestos no microbicidas o inerte o poco activo (alteración del principio activo por reacciones de precipitación, reducción, etc.).
  - Adsorción del desinfectante a otro elemento que le haga perder su eficacia.
- **Otras sustancias:** Jabones y detergentes, corcho, algodón, goma, agua dura etc. Pueden reaccionar con el sanitizante neutralizándolo (Fuster, 2006).
  - **Superficie de actuación:** La principal limitación de los sistemas de limpieza reside en los problemas de acceso a zonas con ranuras, grietas, puntos ciegos, manchas de corrosión. Las irregularidades de las superficies permitirán el alojamiento de microorganismos y de materia orgánica y, por lo tanto tendrán que limpiarse a fondo, se deberá guardar un cierto equilibrio entre la intensidad de la limpieza y el mantenimiento de los instrumentos (Fuster, 2006).
  - **Temperatura:** Los sanitizantes actúan mejor con temperatura igual o superior a la ambiental. Normalmente, al aumentar la temperatura aumenta la potencia de los sanitizantes. Para muchos agentes la subida de 10°C supone duplicar la tasa de



muerte (Leveau, 2002). Una temperatura elevada disminuye generalmente la tensión superficial, aumenta el pH, reduce la viscosidad y origina otros cambios que pueden contribuir a la acción bactericida (Marriott, 2003).

- **pH:** Los sanitizantes se formulan dentro de un amplio rango de valores de pH para que sean más efectivos. Algunos sanitizantes actúan mejor con un pH alcalino mayor que 7 mientras que otros lo hacen en condiciones ácidas menor que 7 (Ninemeier, 2000). La concentración de iones hidrógeno influye sobre la acción bactericida afectando tanto al organismo como al agente químico. Cuando se suspenden en un medio de cultivo de pH 7, las bacterias están negativamente cargadas y tendrá atracción por los sanitizantes con carga positiva. Un aumento del pH incrementa la carga y pueden alterar la concentración efectiva del agente químico a nivel de la superficie de la célula. En general, la forma no ionizada de un agente disociable pasa a través de la membrana celular más fácilmente que las formas iónicas relativamente inactivas (Puig-Durán, 2002).
- **Agua de limpieza:** El agua utilizada en los procesos de limpieza tiene que ser potable, y ha de presentar el grado de dureza como principal característica de calidad para su uso como producto de limpieza, definido como la concentración de calcio y magnesio expresado como carbonato cálcico en miligramos por litro de agua.

La clasificación de la dureza del agua se puede realizar conforme a los siguientes parámetros, que se presentan en la tabla 1:

Tabla 1. Clasificación de agua según su grado de dureza

Grado de dureza del Agua	Concentración de calcio y magnesio en mg/l
Blanda	0-51.3
Moderada	51.3-119.7
Dura	119.7-179.5
Muy Dura	>179.5

*Fuente: (Roux, 2006)*

Para el proceso de limpieza y desinfección, se requiere preferentemente agua blanda, debido a que la dureza elevada interfiere en la solubilidad y actividad de los detergentes y agentes desinfectantes, se pueden formar películas insolubles mediante reacción con los detergentes y jabones, también se pueden generar deposiciones de calcio en las superficies a higienizar. Si las características de dureza del agua no son las adecuadas, éstas se pueden acondicionar mediante tratamientos que eliminen los iones de magnesio y calcio (Roux, 2006).

### 1.1.6 Resistencia de los microorganismos a los sanitizantes

Cuando el sanitizante no es capaz de eliminar una cantidad de bacterias esperada, probablemente sea consecuencia de las malas condiciones de uso del sanitizante (concentración inadecuada, temperatura, tiempo de contacto), o bien porque se produce una mala limpieza dejando restos de suciedad en las superficies que posteriormente se sanitizarán (Holah, 1995).

El proceso de resistencia de los microorganismos a la acción del sanitizante depende de una adhesión de los mismos a las superficies, creando una tensión superficial que facilita el depósito de los microorganismos. Tras la formación de este sustrato, los microorganismos que crecen en él poseen una mayor resistencia a las sustancias antimicrobianas y al calor (Carpentier & Cert, 1993).

Los microorganismos patógenos son más resistentes y sobreviven al proceso de desinfección, contaminan los alimentos y representan una amenaza para la industria alimentaria y el consumidor (Bloomfield et al., 1991; Langsrud et al., 2003). La resistencia combinada a los sanitizantes y otros tipos de agentes antibacterianos pueden convertirse en un problema para la industria en el futuro. Una definición práctica de resistencia sería igual a supervivencia. No obstante en términos adecuados a las sustancias antibacterianas, se considera que si un microorganismo sobrevive o crece en concentraciones de sanitizante más altas que otro microorganismo se considera que el primero tiene mayor resistencia. Y si una cepa que pertenece a una especie determinada sobrevive a concentraciones de un sanitizante que mata a la mayoría de las otras cepas de la misma especie se definen como más resistentes (Langsrud et al., 2003). Por tal motivo surgen dos definiciones de resistencia (Meyer, 2006):

- *La resistencia intrínseca (tolerancia):* es aquella que se desarrolla en forma natural de las especies microbianas. Los microorganismos son generalmente considerados como “resistentes”, cuando son capaces de sobrevivir a más del doble de concentración de un producto recomendado por el proveedor.
- *La resistencia adquirida:* se utiliza cuando ciertas cepas de una especie microbiana difieren significativamente en la susceptibilidad a los biocidas.

Se ha demostrado que las bacterias aisladas de una solución sanitizante o de un equipo de desinfección pueden perder su resistencia rápidamente en condiciones de laboratorio y pueden no sobrevivir a los ensayos de eficacia sanitizante (Gibson et al., 1999). Una explicación de este fenómeno se debe a que en condiciones naturales los microorganismos se desarrollan en superficies, mientras que las bacterias de ensayos proceden de cultivos en medios nutritivos. Otro motivo descrito por varios autores, es que los microorganismos adheridos a las superficies son más resistentes a un amplio espectro de sustancias antibacterianas, incluso los sanitizantes. Debido a que, tras la adhesión, los microorganismos empiezan a sintetizar una matriz de exopolisacáridos que les protege de los sanitizantes (Chmielewski & Frank, 2003). Otros factores que también pueden contribuir a la resistencia de las células son la menor tasa de multiplicación, la disponibilidad limitada de nutrientes y el incremento de producción de enzimas que degradan los sanitizantes (Boulangé-Peterman, 1996).

Es necesario estudiar el tipo de sanitizante a utilizar, ya que cada uno tiene espectro de acción y características diferentes.

## **1.2 Biopelículas formadas por microorganismos**

### **1.2.1 Definición**

En los últimos años ha ido creciendo la percepción de que las bacterias se encuentran principalmente formando parte de depósitos biológicos denominados biopelículas (Fuster, 2004). Las bacterias existen en la Naturaleza bajo dos formas o estados: a) bacterias planctónicas, de libre flotación (en una forma unicelular), y b) bacterias formando biopelículas, en colonias de microorganismos sésiles.

La mayoría de las células se pueden adaptar porque se adhieren a superficies con presencia de sustratos, que generalmente están contenidos dentro de una matriz orgánica polimérica de origen microbiano.

Una biopelícula se considera como una matriz biológicamente activa formada por células de una o varias especies y sustancias extracelulares en asociación con una superficie sólida, incluyendo superficies minerales, tejidos vivos o muertos de animales o plantas, polímeros sintéticos, cerámicas y aleaciones de metales (Costerton et al., 1999).

La matriz es muy hidratada debido a que incorpora grandes cantidades de agua dentro de su estructura, llegando este elemento a representar hasta el 97% de ésta. Además de agua y gérmenes, la matriz está formada por exopolisacáridos, los que constituyen su componente fundamental, producidos por los propios microorganismos integrantes. El conjunto de polisacáridos, ácidos nucleicos y proteínas se conocen bajo el nombre de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) (Nazar, 2007). Las EPS pueden contener polisacáridos, proteínas, fosfolípidos, ácidos nucleicos, ácidos teicoicos y otras sustancias poliméricas hidratadas con un porcentaje de agua entre 85 y 95%. Las EPS protegen a los microorganismos que hacen parte de la biopelícula contra agentes antimicrobianos, previenen el acceso de biocidas, de secuestrantes metálicos, toxinas, evitan la deshidratación, refuerzan la resistencia de la biopelícula al estrés ambiental y permiten a los microorganismos capturar los nutrientes (Navia et al., 2010). En la matriz también puede hallarse materiales no bacterianos, tales como cristales de sales minerales, partículas de corrosión y/o de sedimento, o componentes sanguíneos, según sea el medioambiente en el cual se desarrolla la biopelícula (Nazar, 2007).

Dependiendo del tipo de células involucradas en la biopelícula, las microcolonias pueden estar compuestas por 10-25% de células y 75-90% de matriz EPS. Los requisitos para el crecimiento de la biopelícula son la presencia de microorganismos y el sustrato; si alguno de estos no se encuentra disponible, la biopelícula no podrá formarse. La sinergia existente dentro de la comunidad de la biopelícula, es el factor que permite que ésta soporte condiciones adversas y pueda sobrevivir (Garrett et al., 2008). La extraordinaria capacidad de propagación de los microorganismos explica que las biopelículas se formen en los lugares más insospechados.

Para la industria cárnica la formación de biopelículas en los equipos o superficies que entren en contacto con el alimento puede traer como consecuencia la contaminación del producto final. La contaminación de la carne en el ambiente de proceso puede ocurrir en cualquier estado, desde el sacrificio hasta el embalaje. Se ha reportado que las células de la biopelícula, podrían interactuar con proteínas (fibronectina, laminina y colágeno) de la carne y adherirse exitosamente a su superficie (Navia et al., 2010). Se sabe además, que un microorganismo en una biopelícula es 100 a 1000 veces más resistentes a los sanitizantes que en las formas libres o planctónicas (Betancourth et al., 2004).

### 1.2.2 Fases de desarrollo

*Acondicionamiento.*- La biopelícula bacteriana empieza a formarse cuando alguna célula individual se adhiere inicialmente a una superficie. La capacidad de adhesión de los microorganismos a un sustrato depende de factores ambientales como la temperatura y el pH, y de factores genéticos que codifican las funciones motrices, la sensibilidad ambiental, las adhesinas y otras proteínas (Costerton, et al., 1995; Chmielewski & Frank, 2003; Navia et al., 2010). Como se observa en la figura 1 una biopelícula se forma (siguiendo las flechas a partir de la esquina superior izquierda) cuando las bacterias planctónicas que nadan libremente en suspensión se adsorben sobre una superficie biótica o inerte (una asociación, al principio reversible, que luego se torna irreversible). La adsorción desencadena los primeros cambios fisiológicos que conducen al estilo biológico de película (Harrison et al., 2006).

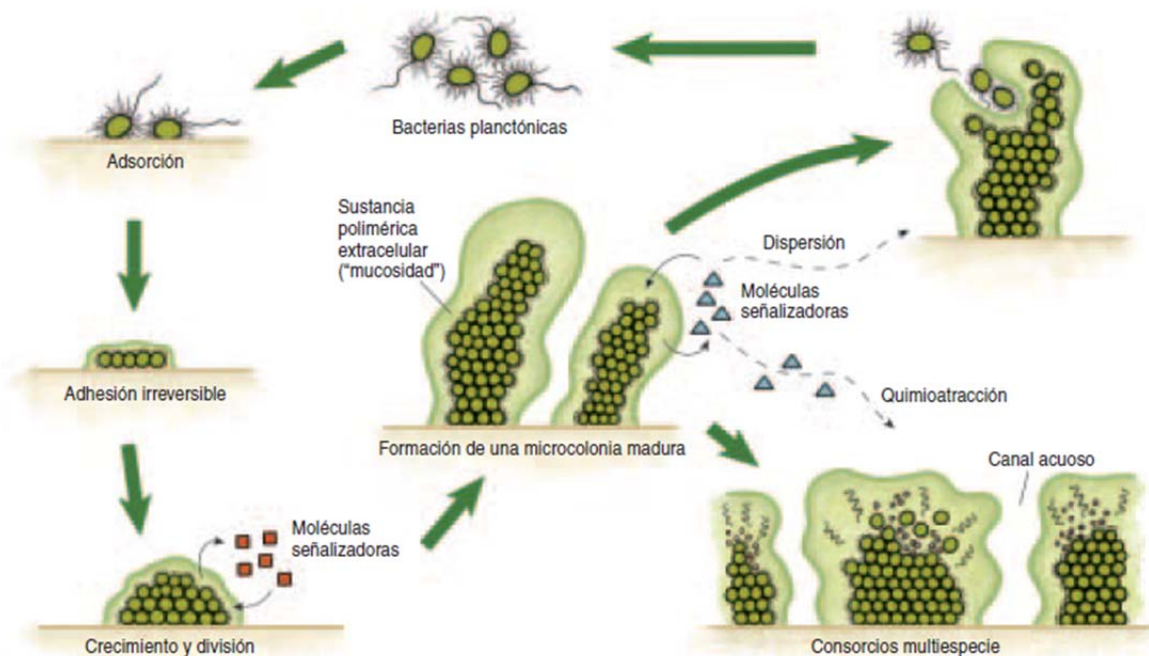


Figura 1. Fases de desarrollo

*Adsorción y fijación:* El proceso de adhesión se da en dos fases; una primera fase reversible, seguida de una segunda fase irreversible.

- La primera fase reversible, es una unión débil de la bacteria con el sustrato. En ella actúan fuerzas de Van der Waals y fuerzas electrostáticas e interacciones hidrófobas. Durante la unión reversible, las bacterias siguen mostrando movimientos brownianos y se pueden eliminar de manera sencilla con una suave limpieza (Mittelman, 1998; Chmielewski & Frank, 2003; Navia et al., 2010; Iranzo, et al., 2012).
- La segunda fase, irreversible, es dependiente del tiempo, resulta del anclaje de los apéndices celulares y/o de la producción de polímeros extracelulares. Los microorganismos en suspensión se agregan y ocurre la adhesión de células iguales o diferentes (co-agregación) a la superficie condicionada, este proceso es favorecido por varios componentes bacterianos como los pili y flagelos, y polímeros superficiales como el lipopolisacárido en bacterias gram negativas y el ácido micólico en las gram positivas, que participan en este proceso venciendo las fuerzas de repulsión (Castrillón et al., 2010).

En esta fase las bacterias sintetizan la matriz de exopolisacáridos para establecer un contacto físico entre las células y la superficie. Una vez que se logra la adhesión irreversible, las células bacterianas se multiplican dando lugar a microcolonias y posteriormente la biopelícula. De modo que se produce la expresión de genes específicos, se producen cambios y alteraciones en su morfología y cambian su tasa de crecimiento (Chmielewski & Frank, 2003). Teniendo en cuenta este proceso, la matriz de exopolisacáridos es uno de los componentes principales que interviene en el mecanismo de adhesión de los microorganismos. Para la unión irreversible entre la célula y la superficie es necesario un tiempo de contacto mínimo. Si bien, en general, el espacio temporal para el desarrollo de una biopelícula es corto y varía en función de la temperatura, disponibilidad de nutrientes y presencia de antibióticos. En este sentido, varios estudios indican que las uniones irreversibles llevan de 20 minutos a 4 horas a una temperatura de entre 4 y 20°C (Navia, et al., 2010; Iranzo, 2012; Stopforth, et al., 2002).

*Evolución y maduración de la biopelícula:* La secuencia de unión de diferentes especies bacterianas influye en la composición de la biopelícula resultante. La población inicial que se une puede cambiar las propiedades de la superficie y así, las que vienen después se pueden adherir vía asociación célula a célula. En algunos casos, la unión de unas segundas especies puede incrementar la estabilidad de la población de la biopelícula (McEldowney & Fletcher, 1988; Navia, et al., 2010).

Si las condiciones son adecuadas para un crecimiento suficiente de la biopelícula, por naturaleza, desarrollará una estructura organizada. A este proceso se le llama maduración. Una biopelícula madura puede consistir en una simple capa de células, en un polímero extracelular poroso o en múltiples capas de microcolonias sueltas o embebidas por las sustancias poliméricas extracelulares (Navia et al., 2010).

Finalmente cuando la biopelícula ha alcanzado la madurez las células planctónicas pueden abandonar la biopelícula para establecer nuevas biopelículas y se inicia un nuevo ciclo de formación de biopelículas. Determinadas señales procedentes del grupo pueden reclutar nuevas especies microbianas para que se unan al consorcio (Harrison et al., 2006). La densidad estructural de la matriz se incrementa en el núcleo mientras que las capas superiores permanecen porosas (Bishop, 1997). Las bacterias con un metabolismo más activo permanecen en la superficie de las capas de la matriz de la biopelícula, cerca de los canales de agua cuyo número se reduce con la edad de la biopelícula; en una biopelícula joven se han detectado cerca de un 80% de células viables, y tan solo un 50% en una biopelícula madura (Carpentier & Cert, 1993; Sharma, 2002).

### **1.2.3 Factores que influyen su desarrollo**

#### **▪ Propiedades de las superficies de contacto**

En la industria cárnica es muy común la presencia de biopelículas en conducciones, equipos y materiales ya que pueden formarse en cualquier tipo de superficie, incluyendo plástico, cristal, madera, metal y sobre los alimentos (Téllez, 2010).

El tipo de sustrato influye en las características de unión. El acero inoxidable se usa frecuentemente como material para la cocina y las instalaciones industriales porque es resistente a los golpes, a la corrosión, dura mucho tiempo y es de sencilla fabricación, además de ser estable, inerte y de fácil limpieza (Fuster, 2006).

Un aspecto importante a tener cuenta es el pulido del material o superficie a tratar ya que es indispensable para conseguir una buena resistencia a la corrosión y facilidad de limpieza. No hay ninguna composición de acero inoxidable que resista todos los ataques corrosivos, de tal forma que dependiendo del tipo de acero de los equipos se verá facilitando un tipo u otro de corrosión. Se pueden distinguir diversos tipos de corrosión que pueden afectar al acero inoxidable: corrosión general, intergranular, galvánica, por fisuras bajo presiones mecánicas y corrosión por picaduras. En esta última, la formación de cráteres localizados en algunos puntos resulta favorecida por suciedades o depósitos minerales adheridos a la superficie metálica y por acción del cloro, oxígeno, iones cloruro e iones hidrógeno. Por lo tanto hay que evitar el contacto prolongado (más de media hora) con soluciones que contengan más de 200mg de cloro residual por litro, ácido clorhídrico y con soluciones ácidas o alcalinas de cloruros de sodio o calcio. Los aceros inoxidables resisten bien la sosa y los detergentes alcalinos, lo que unido al pulido de su superficie permite un buen mantenimiento y ayuda a luchar contra la corrosión (Rodríguez, 2011).

Los defectos de las superficies pueden actuar como puntos de retención de microorganismos y materia orgánica. 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 a los microorganismos, lo que hace que las bacterias supervivientes puedan volver a multiplicarse y formar biopelículas (Fuster, 2006).

#### **▪ Tiempo de contacto**

Un mayor tiempo en contacto (exposición) entre las células y el sustrato permite que se establezca un mayor número de uniones haciendo la adhesión más rápidamente 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 formación de la biopelícula (Pérez et al., 2008).

- **Características de la superficie celular**

Las características de la superficie celular como los flagelos, pili, proteínas de adhesión y cápsulas ejercen también su influencia. Los pili y flagelos actúan como un velcro para anclar las bacterias a las superficies y también actúan como quimiorreceptores, dirigiendo a la bacteria hacia a 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.

- **Disponibilidad de nutrientes**

La disponibilidad de nutrientes ejerce una influencia mayor sobre la estructura y composición de la biopelícula.

- **Composición y diversidad microbiana**

Las biopelículas compuestas por varias especies son más gruesas y estables frente al estrés ambiental que las que están compuestas por una sola especie. Esto se atribuye a la secreción combinada de las distintas sustancias poliméricas extracelulares resultantes de los diferentes microorganismos (Chmielewsky & Frank, 2003).

- **Disponibilidad de agua**

La disponibilidad de agua es un factor crucial para la viabilidad de la biopelícula. Una humedad relativa en torno al 90-100% posibilita el desarrollo de ésta, por ello la mayoría de las biopelículas se encuentran en ambientes acuosos como pueden ser los sistemas de conducción o tuberías de las industrias alimentarias (Pérez et al., 2008). Sin embargo, también se ha encontrado que valores en torno al 70-80% pueden ser suficientes para permitir el desarrollo del biopelícula (Keskinen et al., 2008).

#### **1.2.4 Factores que afectan su desarrollo**

Algunos de los factores que afectan al desarrollo de la biopelícula, incluido las propiedades de la superficie y de la interfase, son (Chmielewski & Frank, 2003; Salgar, 2004):

- La disponibilidad de nutrientes.
- La composición de la comunidad microbiana.
- La disponibilidad de agua.
- La interacción interespecífica.
- El transporte celular.
- Textura del material de soporte
- Tipo de microorganismo que lo compone
- Naturaleza de la fase líquida

### 1.2.5 Microorganismos con capacidad de formar biopelículas

Muchas bacterias principalmente Gram negativas, tienen la habilidad de formar biopelículas, incluyendo algunos patógenos como (Salgar, 2004; Rodríguez et al., 2010):

- *Pseudomona*
- *Escherichiacoli* (algunas variedades son patógenos)
- *Acinetobacter*
- *Flavobacterium*
- *Salmonella* (patógeno)
- *Listeria monocytogenes* (patógeno)
- *Enterobacter*
- *Alcaligenes*
- *Staphylococcus* (algunos pueden ser patógenos)
- *Bacillus* (algunos pueden ser patógenos)

Y en menor proporción mohos, levaduras y algas.

### 1.3 Limpieza y sanitización en la Industria Cárnica

El riesgo de proliferación microbiológica de productos cárnicos, tanto en el producto como en superficies en contacto con él, se considera elevado, dadas sus características biológicas y funcionales, entre las que debe destacarse su elevado poder nutricional y su alta actividad de agua.

En la carne, pueden aislarse *Lactobacillus*, *micrococáceas*, *enterobacterias*, *Leuconostoc*, algunas especies de los géneros *Clostridium*, *Pediococcus*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *enterococos*, etc., y mohos y levaduras. En cuanto a microorganismos patógenos, se ha detectado *Clostridium*, *Listeria monocytogenesis*, *Staphylococusaureus*, *Salmonella spp.* *Yersinaenterocolitica*, *Escherichiacoli O157:H7* y *Campylobacterjejuni*.

Existen diferentes fuentes de contaminación de la carne durante la preparación de la canal que dependerá en gran medida del estado higiénico de los equipos, utensilios, el agua y el personal involucrados en su manipulación. Debido al elevado riesgo de contaminación microbiológica de los productos cárnicos, cobran especial relevancia las operaciones de higiene industrial, tanto en relación con el personal manipulador como respecto a las instalaciones, en las que se incluyen los procesos de limpieza y sanitización.

Uno de los principales objetivos de la higienización es el de minimizar el riesgo de contaminación de productos cárnicos a determinados niveles que permitan asegurar una calidad microbiológica aceptable, conforme a los requisitos higiénicos sanitarios, mediante:

- La limpieza de instalaciones y equipos para eliminar el máximo posible los restos de materia orgánica e inorgánica de superficies, incluida la contaminación cruzada por alérgenos.



- La sanitización de las instalaciones y equipos, para eliminar el máximo posible de los microorganismos contaminantes.
- La higiene del personal, para evitar la contaminación durante la manipulación del producto.  
(Roux, 2006).

Las operaciones de limpieza y sanitización incluyen generalmente, las siguientes actividades encadenadas en el tiempo (Basurto & Martínez, 2006):

- Limpieza en seco, mediante retirada de los restos de suciedad no adheridos a las superficies, utilizando escobas y cepillos para facilitar su arrastre si es necesario. En esta etapa es aconsejable no utilizar agua a presión para el arrastre, debido al riesgo de contaminación cruzada al desplazarse la suciedad de un punto a otro de la instalación, y al incremento considerable de la carga orgánica de las aguas residuales generadas.
- Preenjuague con agua caliente a presión, con objeto de eliminar la suciedad a unos niveles previamente establecidos (por ejemplo, no apreciar visualmente restos de suciedad). Generalmente en los procesos cárnicos es aconsejable aplicar una presión media (20-60 bar), con el fin de no producir nebulizaciones y evitar contaminaciones cruzadas, y utilizar agua caliente (40-60°C) para facilitar la eliminación de grasas y no desnaturalizar las proteínas.
- Aplicación de detergentes alcalinos espumógenos sobre las superficies a limpiar, con un tiempo de contacto medio de 15 minutos.
- Enjuague con agua caliente a presión media, con objeto de solubilizar la suciedad y eliminar los restos de detergente de las superficies.
- Aplicación de sanitizante en las superficies, generalmente mediante pulverización, con un tiempo de contacto determinado, en función del tipo de agente desinfectante.
- Enjuague con agua a presión media, antes de iniciar el proceso productivo, con objeto de eliminar los restos de producto desinfectante.

### **1.3.1 Higiene del personal**

El personal manipulador de alimentos supone un riesgo potencial de contaminación del producto, debido, por un lado, a la posibilidad de transmisión de microorganismos que como portador puede transferir al producto, y, por otro, como vector de contaminación cruzada durante la manipulación del producto.

Con objeto de minimizar el riesgo de contaminación, los manipuladores de alimentos han de acreditar, mediante certificación médica, que no poseen enfermedades infecciosas que se pueden transferir al alimento, y deben estar cualificados mediante formación en temas relacionados con la higiene industrial de su lugar de trabajo (Roux, 2006). Así como portar

ropa adecuada y equipo de protección indicado de acuerdo a la actividad específica del trabajador (SAGARPA, 2012).

### **1.3.2 Equipo e instalaciones**

Los equipos, utensilios e instalaciones utilizadas en el procesado de la carne, deben limpiarse y desinfectarse sistemáticamente, conforme a un programa definido, y con una periodicidad evaluada en función de la concentración máxima admisible de materia orgánica y microorganismos de sus superficies (Roux, 2006). Además los equipos e instalaciones aprobados para el sacrificio, preparación y despiece de canales y elaboración de carnes deben ser cuidadosamente limpiados y desinfectados varias veces durante y al final de la jornada de trabajo, para prevenir la contaminación por patógenos y por otros microorganismos asociados a la alteración de los alimentos (Belletti et al., 2010).

Como premisas del proceso de limpieza y desinfección, para evitar la contaminación de producto debido a la contaminación cruzada, se tienen que considerar los siguientes elementos:

- El diseño higiénico de equipos e instalaciones.
- El tipo de suciedad o residuos relacionados con el proceso productivo
- La energía mecánica de limpieza aplicada.

#### **1.3.2.1 Características de diseño de los equipos**

En cuanto al diseño higiénico de los equipos, debe destacarse que (Roux, 2006; SAGARPA, 2012):

- Los equipos de proceso tienen que poder desmontarse y se ha de tener fácil acceso para su limpieza y supervisión.
- Deben presentar una composición compatible con las características del producto y los agentes químicos de limpieza y desinfección (acero inoxidable, elastómeros, teflón, etc.)
- Tener un acabado con superficies lisas y baja rugosidad.
- No se deben utilizar utensilios de madera por el alto grado de contaminación que estos representan.
- Las planchas o cubiertas empleadas en las mesas de corte o deshuese deberán ser de una pieza de plástico, acero inoxidable o cualquier otro material que sea impermeable, de dimensiones cortas para facilitar su limpieza.
- Los lavabos se conectan directamente con el drenaje.
- Las mangueras para limpieza deben ser de superficie lisa para facilitar su limpieza y evitar la proliferación de gérmenes.

### 1.3.2.2 Características de diseño de las instalaciones

El diseño de las instalaciones debe contar con las siguientes premisas (Roux, 2006; SAGARPA, 2012; Gómez, 2004):

- Tener paredes, suelos y techos impermeables con uniones higiénicas.
- Las puertas deben ser de metal galvanizado. Los marcos de las puertas deben estar revestidos de material inoxidable, sin fisuras que alojen suciedad o detritos.
- Cada área de procesamiento o zona de trabajo debe contar con por lo menos un lavabo, con las características mencionadas anteriormente.
- En las áreas de proceso tener indicadores de temperatura visibles.
- No deben colocarse artefactos, conexiones eléctricas o cañerías sobre las áreas de trabajo, pues las goteras o el agua de condensación podría contaminar los alimentos, materia prima, materiales de rotulado y empaque o el equipo en general.
- Si hay necesidad de colocar tomacorrientes, estos deben estar con sus protectores correspondientes.
- Los edificios que componen la planta deberán tener las características adecuadas de construcción, para facilitar su operación y mantenimiento higiénico.

### 1.3.3 Tipo de suciedad

El tipo de suciedad a eliminar varía de acuerdo con la composición del alimento y la naturaleza del proceso a que ha sido sometido. Los restos alimenticios de la superficie a limpiar pueden ser partículas secas y residuos desecados o cocidos, pegajosos, grasosos o viscosos. En la industria cárnica restos de carne, grasa y aditivos utilizados que quedan adheridos a las máquinas se convierten en un medio óptimo de cultivo para el desarrollo de microorganismos.

De acuerdo con el tipo de suciedad pueden distinguirse en dos grupos:

- Suciedades hidrosolubles, que se eliminan mecánicamente después de su reblandecimiento con agua fría.
- Suciedades insolubles en agua, que se pueden disolver saponificadas y/o dispersas, con agua caliente y productos químicos auxiliares y se eliminan mecánicamente.

Estos dos grupos se presentan en unidades de producción de plantas cárnicas específicamente en áreas de corte y sacrificio, áreas de embutidos cocidos, escaldados y madurados, fundición de grasas, etc. (López, 2010).

En la tabla 2 se describe las características de los tipos de suciedad (López, 2010):

- Los azúcares son fáciles de remover, a menos que haya ocurrido una caramelización. Son solubles en agua tibia o caliente. Dado que los alimentos con almidón generalmente se encuentran combinados con grasa, proteínas y sales minerales, los detergentes que eliminan esta suciedad, remueven fácilmente los carbohidratos.

- Polimerización: las grasas al ser insolubles en agua no son de fácil remoción, se requiere preferiblemente de una sustancia alcalina.
- Desnaturalización: las proteínas son de solubilidad variable, más solubles en medio alcalino, los medios ácidos pueden precipitarlos, para su limpieza son ideales los detergentes alcalinos con capacidad dispersante. El grado de desnaturalización o coagulación de la proteína depende de la temperatura y del pH del medio en el que se encuentra, se depositan solas o en combinación con grasas y minerales. Entre las proteínas de frecuente limpieza en la industria cárnica se encuentra la hemoglobina, la cual se remueve fácilmente con agua a temperatura ambiente; es aconsejable no mantener temperaturas altas para evitar formación de coágulos. Encontramos, además, la miocina, actina, lisina que son las causantes frecuentes de formación de biopelículas.
- Solubilidad de las sales; la mayoría son más solubles en medio ácido. Los detergentes para este tipo de suciedad deben ser ácidos y con poder dispersante.

Tabla 2. Características de la Suciedad

Componente	Solubilidad	Limpieza	Cambios al calentar
Azúcar	Hidrosoluble	Fácil	Caramelización
Grasa	Insoluble en agua Soluble en álcali	Difícil	Polimerización
Proteína	Insoluble en agua Soluble en álcali Poco soluble en ácido	Muy difícil	Desnaturalización
Sales	Hidrosolubilidad variable La mayoría ácidos solubles	Fácil a difícil	Insignificante

*Fuente: (Hayes, 2002)*

### 1.3.4 Energía mecánica aplicada en la limpieza y sanitización

#### 1.3.4.1 Limpieza y sanitización manual

En el proceso de limpieza y sanitización realizado de forma manual, deben destacarse el cepillado y el proceso por inmersión o remojo. La limpieza con cepillado manual es a veces necesaria para equipos desmontados, como cortadoras. Con el cepillado se obtiene una fuerza mecánica considerable, que se utiliza aplicando una solución de detergente entre 35-40°C. Los cepillos deben ser de material impermeable, generalmente plástico, y a su vez tienen que limpiarse y desinfectarse periódicamente, siendo éste uno de los factores que limitan su utilización industrial.

El proceso de inmersión o remojo consiste en dejar el material dentro de soluciones de detergentes o desinfectantes, durante un tiempo establecido.

### 1.3.4.2 Limpieza y sanitización industrial mecanizada

En cuanto a la limpieza y sanitización realizada de forma industrial, deben destacarse los equipos de aplicación y dosificaciones de agua, detergentes y sanitizantes, que se pueden dividir en:

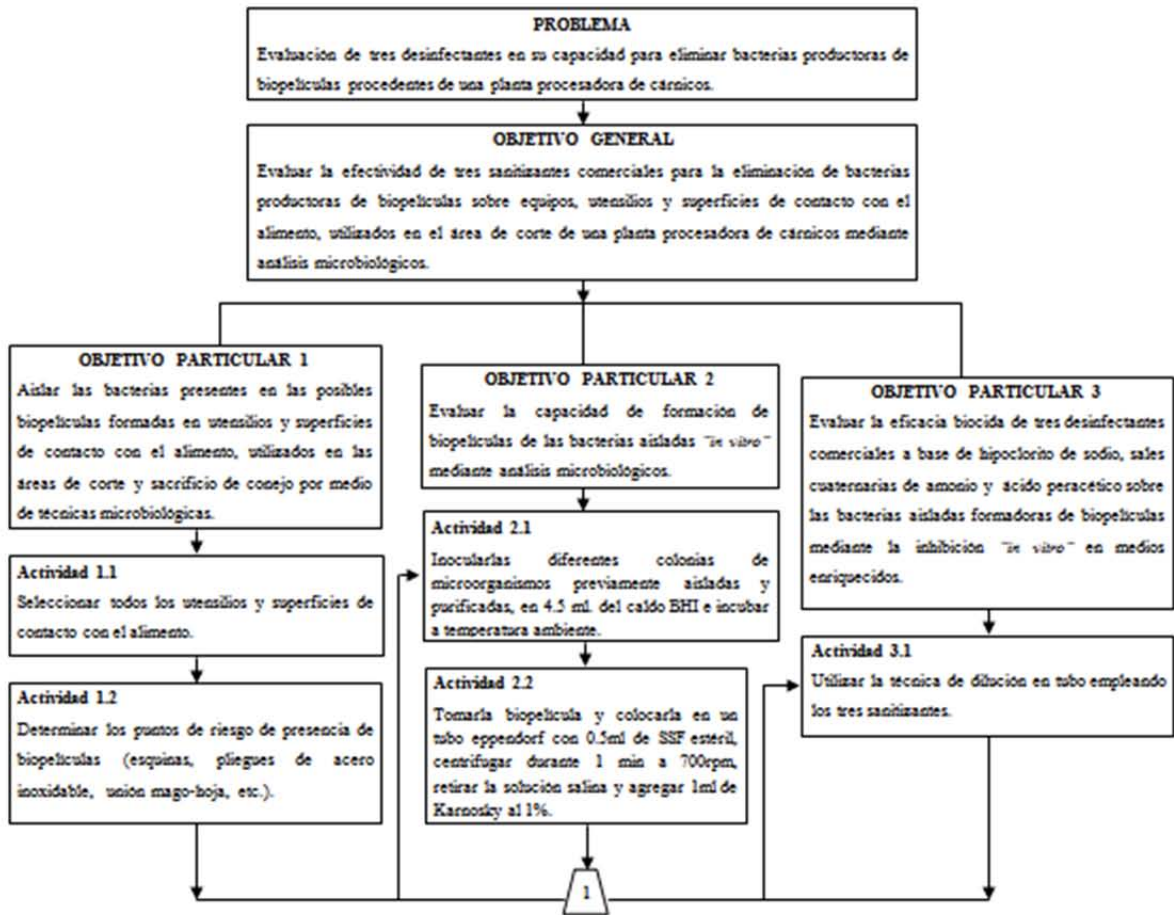
*Equipos de proyección de agua y espuma a alta presión (120-150 bar).* Este sistema se utiliza en zonas muy sucias o de difícil accesibilidad. Se caracteriza por ser un sistema de limpieza rápido pero que presenta muchos inconvenientes, ya que (Roux, 2006):

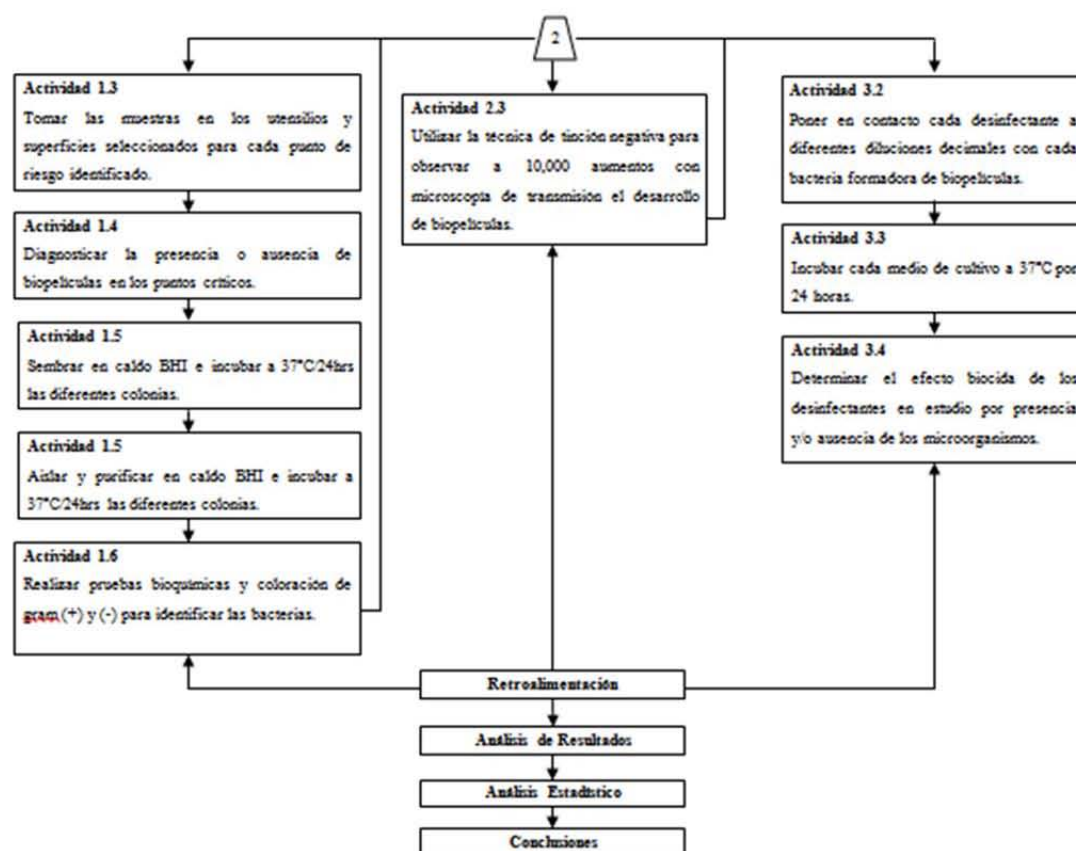
- Se producen nebulizaciones, lo que supone un riesgo elevado de inutilización, averías en cuadros eléctricos, y de contaminación microbiológica cruzada;
- Se consume gran cantidad de agua y energía;
- Es molesto de manejar, debido a que el chorro generado es demasiado potente (produce una fuerza elevada de retroceso), y ruidoso para el personal.

*Equipos de proyección de espuma a media presión (20-60 bar).* En este sistema, el detergente se proyecta sobre las superficies en forma de espuma densa, dosificándose de forma continua, con un tiempo de actuación de 15-20 minutos. Este sistema es muy utilizado en el sector cárnico por sus numerosas ventajas (Roux, 2006):

- No se producen nebulizaciones, por lo que el riesgo de contaminación microbiológica cruzada es reducido.
- Se economiza el consumo de agua, de productos de limpieza (utilización óptima debido al contacto prolongado entre la espuma, la suciedad, etc.) y de energía.
- Es fácil y cómodo de utilizar.

## 2. CUADRO METODOLÓGICO





### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo General

Evaluar la efectividad de tres sanitizantes comerciales para la eliminación de bacterias productoras de biopelículas sobre equipos, utensilios y superficies de contacto con el alimento, utilizados en el área de corte de una planta procesadora de cárnicos mediante análisis microbiológicos.

#### 3.2 Objetivo Particular 1

Aislar las bacterias presentes en las posibles biopelículas formadas en equipos, utensilios y superficies de contacto con el alimento, utilizados en el área de corte de una planta procesadora de cárnicos por medio de técnicas microbiológicas.

#### 3.3 Objetivo Particular 2

Evaluar la capacidad de formación de biopelículas de las bacterias aisladas “*in vitro*” mediante análisis microbiológicos.

#### 3.4 Objetivo Particular 3

Evaluar la eficacia biocida de tres sanitizantes comerciales a base de hipoclorito de sodio, sales cuaternarias de amonio y ácido peracético, a la concentración y tiempo sugerido por el proveedor, sobre las bacterias aisladas formadoras de biopelículas mediante la inhibición “*in vitro*” en medios enriquecidos.



## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Materiales y Métodos

#### 4.1.1 Diagnóstico e identificación de puntos de riesgo en la planta

La planta procesadora de cárnicos cuenta con las siguientes áreas:

1. Espacios de desembarque
2. Corrales de recepción y descanso
3. Cámaras de refrigeración
4. Cámara de congelación
5. Área de sacrificio
- 6. Área de corte**
7. Área de embutidos y madurados
8. Zona de pesado y etiquetado
9. Oficina
10. Baños y vestidores.

El área donde se realizó el estudio fue en la de corte ya que es en esta área donde hay mayor manipulación de la carne durante su procesamiento, por lo que hay mayor probabilidad de contaminación. Se llevó a cabo la identificación de los puntos de mayor riesgo en los equipos, utensilios y superficies de contacto con el alimento, de los cuales fueron seleccionados los siguientes:

- Cuchillos
- Mesa de corte
- Sierra de banco.
- Molino de carne
- Rebanadora

En las cámaras de refrigeración del área de corte

- Esquinas
- Paredes
- Columnas
- Soporte
- Puertas

#### 4.1.2 Muestreo

Se realizaron tres muestreos (uno por semana) en el área de corte, se tomaron las muestras al finalizar el proceso y después de la limpieza y sanitización de rutina en los puntos señalados en las figuras (2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8) teniendo en cuenta el desgaste y difícil acceso a la limpieza siendo estos un riesgo microbiológico para los equipos, utensilios y superficies de contacto con el alimento. Las muestras se tomaron con hisopos de algodón estériles mediante frotación en “zig-zag” y “circular” según lo requiriera el área muestreada, tras el

hisopado las muestras se introdujeron en tubos de vidrio con 0.5 mL de solución salina fisiológica estéril y fueron llevadas al Laboratorio de Bacteriología en una hielera con medio de enfriamiento y se refrigeraron inmediatamente a 8°C hasta su procesamiento.



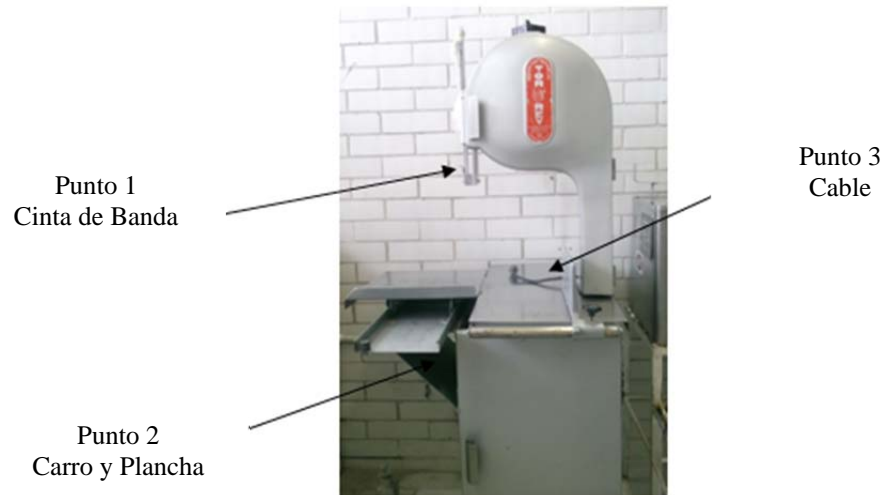
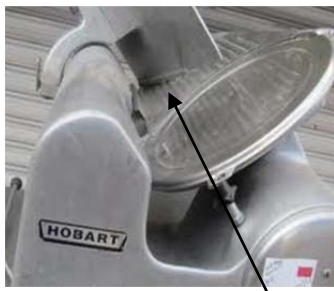


Figura 4. Identificación de puntos de riesgo Sierra de Banco



Figura 5. Identificación de puntos de riesgo en el molino



Punto 1  
Plancha



Punto 2  
Cuchilla



Punto 3  
Transportador/carro

Figura 6. Identificación de puntos de riesgo en la Rebanadora



Punto 1  
Pared



Punto 2  
Columna



Punto 3  
Esquina



Punto 4  
Puerta



Punto 5  
Pared

Figura 7. Identificación de puntos de riesgo en la cámara de refrigeración Aa 4°C



Punto 1  
Esquina



Punto 3  
Puerta



Punto 2  
Pared

Punto 4  
Soporte

Punto 5  
Columna

Figura 8. Identificación de puntos de riesgo en la cámara de refrigeración B a 4°C

### 4.1.3 Aislamiento de bacterias en medios enriquecidos

Posteriormente las muestras tomadas se sembraron por el método de siembra en placa por estría (Stanier, 1985), en Agar Casoy y se incubaron a 37°C/24 horas. Concluido el periodo de incubación se procedió al aislamiento de cada especie observada según su morfología de crecimiento en las placas hasta determinar que se contaba con cultivos puros (un solo tipo de especie bacteriana). Las muestras fueron identificadas por el lugar de procedencia.

#### *Procedimiento*

1. Frente al mechero Fisher se colocaron las placas petri en posición invertida sobre la mesa de trabajo.
2. Con ayuda de unas pinzas estériles se sujetó el hisopo con muestra y se frotó sobre la placa con medio de cultivo.
3. Se esterilizó el filamento del asa de siembra con la flama del mechero hasta que estuviera al rojo vivo.
4. Se enfrió el asa en la orilla de la placa petri con el medio de cultivo y con cuidado de no romper el agar se realizaron las estrías.
5. Se esterilizó el asa nuevamente y se volvió a enfriar de la misma forma. Se rozó una vez con el asa de siembra las estrías sembradas la primera vez y sobre una posición virgen de agar, se realizó la segunda serie de estrías.
6. Se repitió exactamente la operación descrita en el punto anterior pero rozando al empezar la segunda serie de estrías hasta completar tres o cuatro.
7. Se llevó a la incubadora y se dejaron en posición invertida a 37°C/24 horas.
8. Terminado el periodo de incubación se identificó en el cuenta colonias los diferentes tipos de colonias aisladas.
9. Se tomó la colonia seleccionada con el asa de siembra estéril, procurando no tocar ninguna otra parte de la placa petri para evitar contaminación.
10. En una nueva placa petri con Agar Casoy se sembró la colonia realizando un “zig-zag” para purificar la colonia (misma especie bacteriana).
11. Se realizó el paso anterior con todas las colonias aisladas.
12. Se incubaron a 37°C/24 horas

### 4.1.4 Capacidad de formación de biopelículas “*in vitro*”

Asépticamente se inoculó una colonia de cada microorganismo purificado con un asa de siembra estéril, en tubos con 4.5 mL de caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI), se incubaron en reposo a temperatura ambiente durante 15 días para fomentar la formación de la biopelícula (Rodríguez, 2011). Las biopelículas que se visualizaron se clasificaron según su espesor y densidad como alta, moderada, baja y negativa. Después de transcurridos los 15 días, se eligieron cinco cepas que formaran un anillo denso adherido al vidrio (alta

formación de biopelículas) y se realizó la identificación de estas cepas mediante la tinción de gram y las siguientes pruebas bioquímicas:

- **Tinción GRAM**

*Fundamento*

Permite de acuerdo con la estructura y composición de la pared celular bacteriana, agrupar las bacterias en dos grupos gram positivas y gram negativas. Las bacterias gram positivas que presentan una gruesa capa de peptidoglicano como estructura fundamental por sobre la membrana citoplasmática, y las gram negativas, que encima de ésta, presentan una delgada capa de peptidoglicano, a la que se superpone una capa de lipopolisacáridos-lipoproteína, denominada membrana externa (figura 9). La diferencia entre ambos grupos es de enorme importancia taxonómica, ya que se observa en la resistencia a la decoloración. Esto se debe a que la membrana externa de las gram negativas es soluble en solventes orgánicos, como lo es la mezcla de alcohol/acetona. La capa de peptidoglicano que posee es más delgada que la gram positiva y al decolorar la parte lipídica es eliminada facilitando la pérdida del complejo cristal-lugol y por lo tanto perdiendo el color azul violáceo tomando el colorante de contraste que es añadido posteriormente. Las bacterias gram positivas al poseer una pared celular más resistente y con mayor proporción de peptidoglicano son susceptibles a la acción del solvente orgánico, sino que se deshidratan por el alcohol. Esto provoca que se cierren los poros de la pared, impidiendo que el complejo lugol-cristal violeta se escape y manteniendo la coloración azul-violácea (Herrera, 2007).

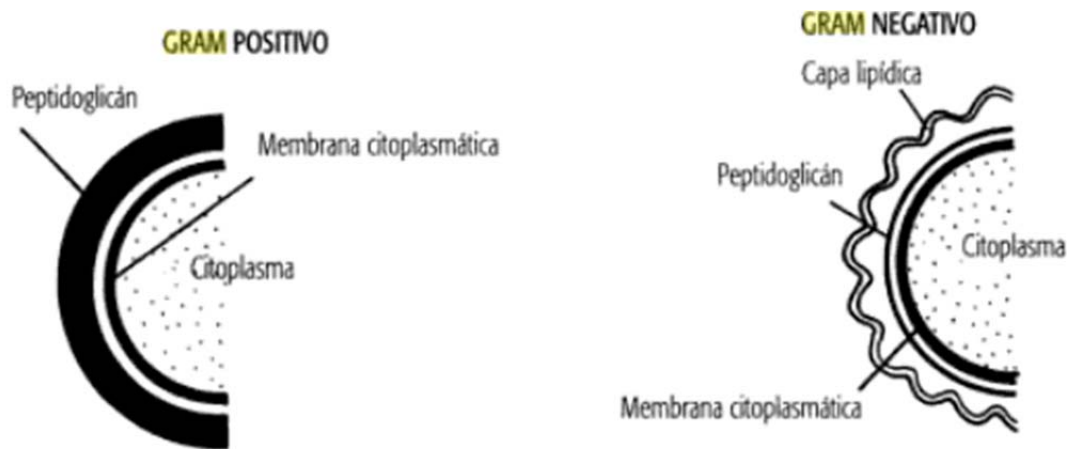


Figura 9. Esquema comparativo de las paredes celulares de las bacterias Gram positivas y negativas

## *Muestras*

Se colocó frente al mechero una gota de SSF estéril sobre un portaobjetos. Se tomó con un asa estéril una muestra de la colonia problema y se extendió sobre el portaobjetos. Después se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente la muestra se fijó por calor pasando 3 veces lentamente por la parte superior de la llama del mechero y por el lado inferior del portaobjetos (la parte del frotis queda arriba). Por último se dejó enfriar a temperatura ambiente.

## *Procedimiento para tinción Gram*

1. Una vez fijada la muestra en la placa (portaobjetos), se cubrió con Cristal Violeta (Violeta de Genciana) durante 1 minuto.
2. Se lavó con agua corriente. Se retiró el exceso de agua.
3. Se cubrió la placa con Lugol (solución yodo/yoduro) durante 1 minuto y se decantó.
4. Se decoloró la placa con Alcohol Acetona (solución decolorante) por 15 ó 30 segundos.
5. Se lavó con agua corriente. Se retiró el exceso de agua.
6. Por último se cubrió la placa con Safranina durante 1 minuto.
7. Se lavó con agua corriente. Se retiró el exceso de agua y se dejó secar a temperatura ambiente.
8. Se observó al microscopio a 100X con aceite de inmersión.

Interpretación de resultados:

Gram (+) = color azul violeta

Gram (-) = color rosa y rojo

### ▪ **Prueba de la Oxidasa**

#### *Fundamento*

Determinar la presencia de la enzima oxidasa. La prueba de la oxidasa se basa en la producción bacteriana de esta enzima. Dicha reacción se debe a la presencia de un sistema citocromo-oxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que actúa a su vez como aceptor de electrones en la etapa terminal del sistema de transferencia de electrones, por lo tanto, el sistema citocromo-oxidasa se halla en microorganismos aerobios.

La prueba oxidasa determina la presencia de citocromo-oxidasa. El reactivo de oxidasa de Kovac (tetrametil-p-hidroclorofenilendiamina al 1%) se torna en un compuesto azul por la presencia de microorganismos que contienen citocromo c oxidasa como parte de su cadena respiratoria (MacFaddin, 2004).

### *Procedimiento*

Prueba en caja petri. En un trozo de papel filtro colocado dentro de una caja de Petri impregnado con el reactivo se colocó asépticamente la cepa en estudio utilizando un palillo estéril.



Figura 10. Toma de muestra

### *Interpretación de resultados*

Prueba positiva: está indicada por la aparición de un color azul sobre el papel reactivo en un lapso no mayor a 10 segundos.

Prueba negativa: no hay cambio de color sobre el papel o bien esté ocurre después de 10 segundos.

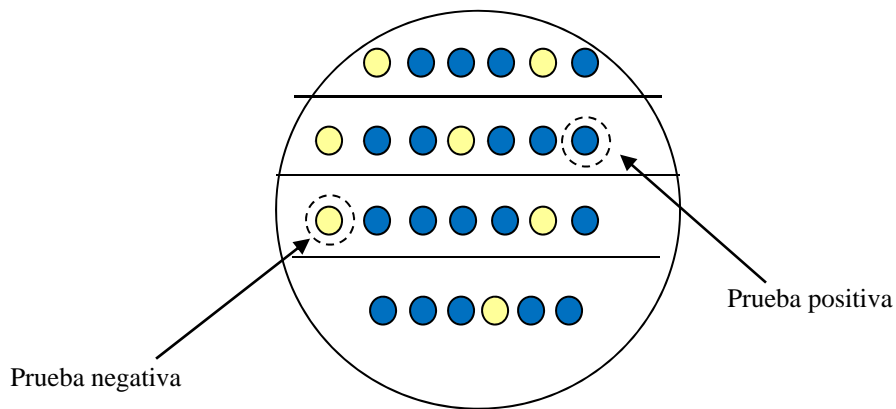


Figura 11. Interpretación de resultados de la prueba oxidasa



## ▪ Prueba de la Catalasa

### *Fundamento*

Determina la presencia de la enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. La enzima catalasa cataliza la liberación de agua y oxígeno a partir de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{catalasa} = \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ); su presencia se determina por análisis directo de un cultivo bacteriano (MacFaddin, 2004).

### *Procedimiento*

La prueba se realizó a temperatura ambiente. Se agregó una gota de peróxido de hidrógeno al 3% sobre una placa petri. Con una aguja de inoculación se recogió asépticamente una muestra de la cepa en estudio y se colocó sobre la gota de peróxido de hidrógeno.



Figura 12. Preparación de la muestra

### *Interpretación de resultados*

Positivo: La producción rápida de burbujas ( $\text{O}_2$ ) cuando el cultivo bacteriano se mezcla con una solución de peróxido de hidrógeno se interpreta como una prueba catalasa positiva.

Negativo: no hay formación de burbujas ( $\text{O}_2$ ) se interpreta como una prueba catalasa negativa.

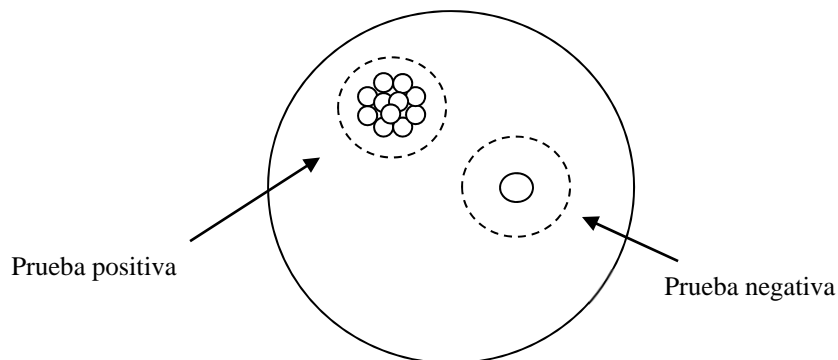


Figura 13. Interpretación de resultados de la prueba catalasa

## ▪ Prueba de Fermentación de Hidratos de Carbono

### *Fundamento*

La prueba se basa en la capacidad de un microorganismo de fermentar (degradar) un carbohidrato específico incorporado a un medio básico produciendo ácido con formación visible de gas, como consecuencia de la fermentación llevada a cabo por la bacteria (MacFaddin, 2004).

### *Procedimiento*

Se preparó el medio de cultivo con glucosa al 1% en base caldo rojo fenol. En un tubo de vidrio con tapa de rosca se colocó el medio de cultivo preparado con un tubo de Durham (campana de fermentación) en posición invertida procurando no generar burbujas dentro de la campana, se esterilizó a 116-118°C durante 15 minutos, posteriormente se inoculó aseptícamente con un asa la cepa problema, se agitó y se incubó a 37°C durante 24 horas. Se siguió el mismo procedimiento para los azúcares manitol y arabinosa.

### *Interpretación de resultados*

Positivo (+): Producción de ácido. El medio se vuelve color amarillo debido al vire del indicador rojo fenol a pH mínimo de 6.8

Tardío: El medio se vuelve color anaranjado. Si es inseguro, comparar con un tubo no inoculado y reincubar.

Negativo (-): Alcalino. El medio se vuelve rosa o rojizo. El rojo fenol en medio alcalino tiene un pH de 8.4

Producción de gas (O<sub>2</sub>): Formación de burbuja en el tubo de Durham (campana de fermentación).

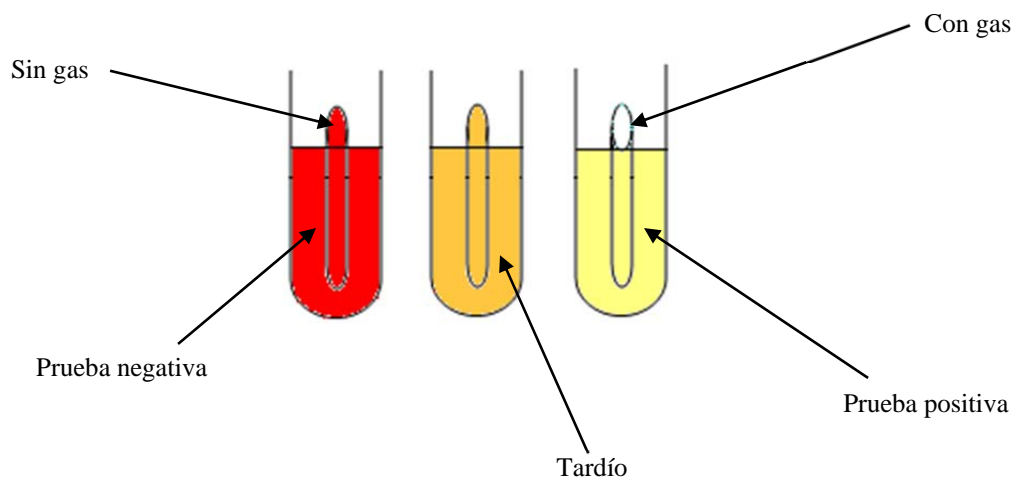


Figura 14. Interpretación de resultados de la prueba fermentación de hidratos de carbono

## ▪ Prueba de Oxidación-fermentación (O-F)

### *Fundamento*

Las bacterias utilizan los carbohidratos por dos procesos; oxidación y fermentación. Algunas bacterias son capaces de metabolizar un carbohidrato (manifestada por la producción de ácido) solo en condiciones aeróbicas; otras producen ácido tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. La fermentación es un proceso anaeróbico y los fermentadores bacterianos de un carbohidrato son por lo general anaerobios facultativos.

La diferencia principal entre el metabolismo fermentativo y el oxidativo de un carbohidrato depende de los requerimientos de oxígeno atmosférico y de la fosforilación inicial. La fermentación es un proceso anaeróbico que requiere la fosforilación inicial de la glucosa previamente a su degradación, mientras que la oxidación en ausencia de compuestos inorgánicos como nitrato y sulfato es un proceso estrictamente aeróbico que comprende la oxidación directa de una molécula de glucosa no fosforilada inicialmente. La fermentación produce una acidez más elevada que el proceso metabólico oxidativo (MacFaddin, 2004).

### *Procedimiento*

Se inoculó un par de tubos OF para la cepa en estudio. Con una aguja de inoculación se picó ambos tubos hasta 0.6mm antes de llegar al fondo de éstos. Un tubo se cubrió con 1 cm de parafina fundida estéril para excluir el oxígeno existente.

### *Interpretación de resultados*

En cada tubo se detecta: Utilización de carbohidratos, producción de gas y movilidad.

#### Reacciones de hidratos de carbono

Ácido: A

Ácido y gas: AG

Sin cambio o reacción alcalina: SC o (-)

#### Determinaciones OF

Fermentativa: F

Oxidativa: O

No oxidativa no fermentativa: NR

#### Movilidad

Con movilidad: (+) crecimiento que se aleja de la línea de punción

Sin movilidad: (-) crecimiento limitado a la línea de punción

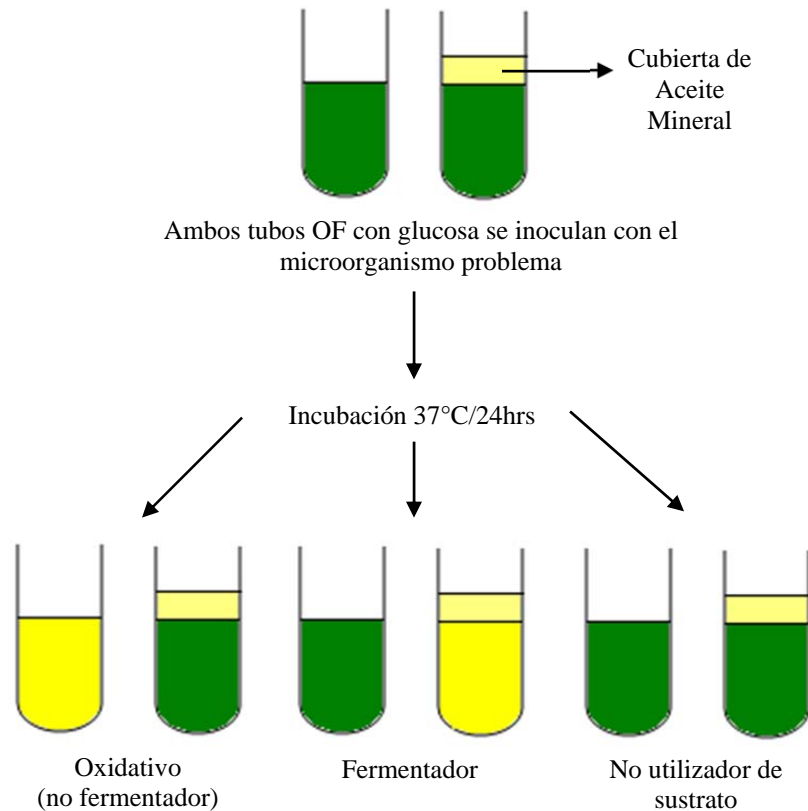


Figura 15. Interpretación de resultados de la prueba fermentación de O-F

### ▪ Prueba de ureasa

#### *Fundamento*

Determinar la capacidad de un microorganismo de hidrolizar la urea en dos moléculas de amoníaco por la acción de la enzima ureasa, con la resultante alcalinidad. El medio de cultivo usado en esta prueba contiene una solución de úrea al 40% y rojo fenol como indicador de pH. Si el microorganismo en estudio posee la enzima ureasa, éste hidroliza la urea con la consecuente formación de amonio, lo cual alcaliniza el medio. Por lo tanto, una coloración fucsia es indicativo de un resultado positivo (MacFaddin, 2004).

#### *Procedimiento*

Se inoculó el caldo urea con la cepa en estudio. Se incubó a 35°C durante 24 horas.

#### *Interpretación de resultados*

Positivo: Cambio de color de rosa a fucsia

Negativo: No hay cambio de color.

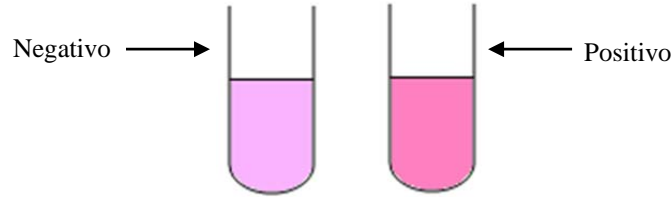


Figura 16. Interpretación de resultados de la prueba de ureasa

#### ▪ Prueba de reducción de nitratos

##### *Fundamento*

Determinar la capacidad de un microorganismo de reducir los nitratos a nitritos o gas nitrógeno libre (MacFaddin, 2004).

##### *Procedimiento*

Se inoculó con un asa en el medio de cultivo la cepa problema y se incubó a 37°C durante 72 horas. Finalizada la incubación se añadió al medio 10 gotas del reactivo A y luego 10 gotas de reactivo B.

##### *Interpretación de resultados*

Positivo: color rojo a los 30 segundos de añadir los reactivos indican la presencia de nitritos y representa una prueba positiva para la reducción de los nitratos.

Negativo: La ausencia del color tras el agregado de los reactivos puede indicar que los nitratos no han sido reducidos, o que lo han hecho a productos diferentes de los nitritos, como amoníaco, nitrógeno molecular, (desnitrificación), óxido nítrico (NO) u óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) e hidroxilamina.

##### **Reducción con zinc**

Dado que los reactivos detectan solo nitritos es necesario añadir una pequeña cantidad de polvo de zinc a todas las reacciones que no cambiaron de color. Tras agregar el polvo de zinc, indica la presencia de nitratos residuales.

Positivo: Ausencia de desarrollo de color.

Negativo: Color rojo oscuro en 5-10 min

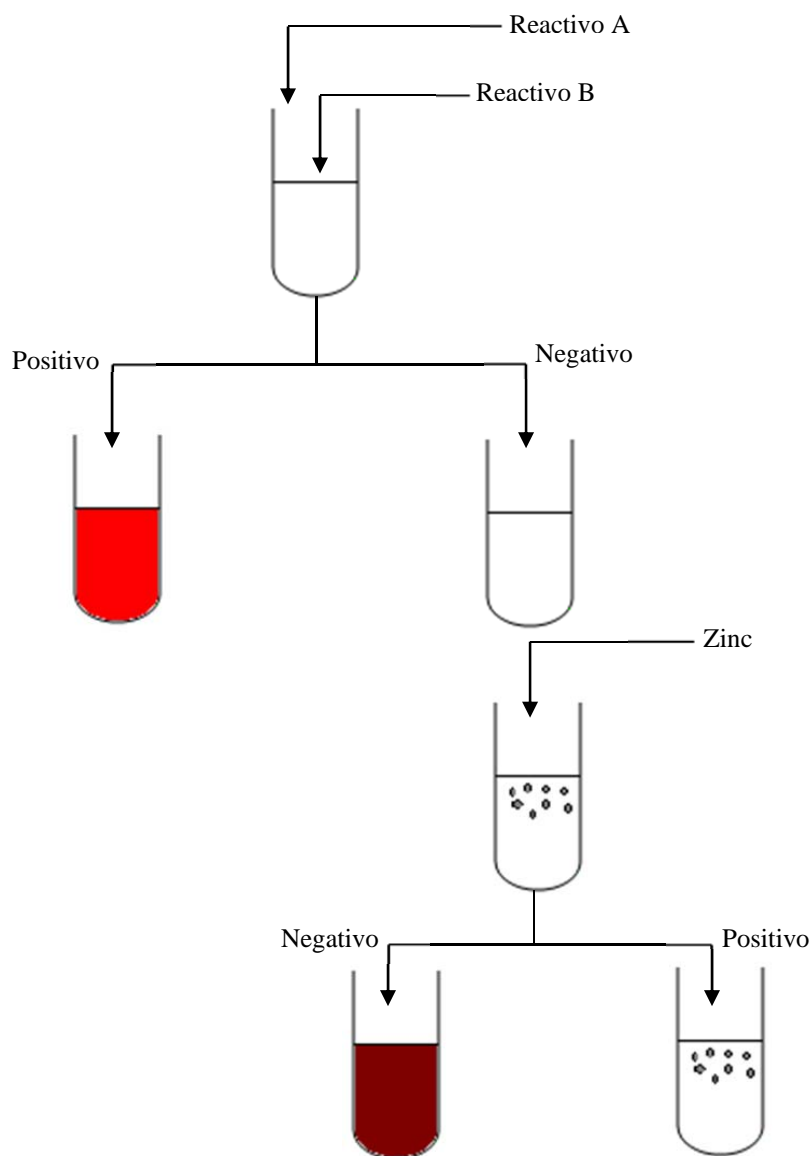


Figura 17. Interpretación de resultados de la prueba reducción de nitratos

- **Prueba de rojo de metilo**

*Fundamento*

Es una prueba cuantitativa basada en el uso del indicador de pH, el rojo de metilo, para determinar la concentración del ión hidrógeno cuando un microorganismo fermenta la glucosa. El rojo de metilo es un indicador de pH con un intervalo entre 6 (amarillo) y 4.4 (rojo). El pH al cual el rojo de metilo detecta ácido es considerablemente menor que el de

otros indicadores en los medios de cultivo. Por lo tanto es necesario que el microorganismo produzca cantidades grandes de ácido a partir del carbohidrato empleado como sustrato.

Debido a que son muchas las especies detectables con el indicador rojo de metilo durante las fases iniciales de la incubación solo se considera rojo de metilo positivo aquellos organismos que son capaces de mantener ese pH bajo durante una incubación prolongada (48 a 72 horas), contrarrestando el sistema estabilizador de pH del medio (MacFaddin, 2004).

#### *Procedimiento*

Se inoculó el caldo RM/VP con la cepa en estudio. Se incubó el caldo a 35°C durante 72 horas. Finalizado este tiempo, se añadió directamente al caldo 5 gotas del reactivo rojo de metilo.

#### *Interpretación de resultados*

Positiva: El desarrollo de un color rojo estable en la superficie del medio indica que la producción de ácido es suficiente como para bajar el pH a 4.4.

Negativa: El desarrollo de un color amarillo-naranja.



Figura 18. Interpretación de resultados de la prueba de rojo de metilo

#### ▪ **Prueba Voges-Proskauer**

El ácido pirúvico formado durante la degradación fermentativa de la glucosa es metabolizado por diferentes vías, dependiendo de los sistemas enzimáticos presentes en las bacterias. Una de dichas vías lleva a la producción de acetoína (acetilmetilcarbinol) un subproducto de reacción neutra.

En presencia de oxígeno atmosférico y de hidróxido de potasio al 40%, la acetoína se convierte en diacetilo y el alfa-naftol actúa como catalizador para revelar un complejo de color rojo (MacFaddin, 2004).

#### *Procedimiento*

Se inoculó un tubo de caldo RM/VP con la cepa en estudio. Se incubó 24 horas a 35°C. Posteriormente, se añadió 6 gotas de alfa-naftol al 5% y 4 gotas de KOH al 40% en ese

orden. Se agitó el tubo cuidadosamente para exponer el medio al oxígeno atmosférico y se dejó reposar durante 10 min.

#### *Interpretación de resultados*

Positivo: Desarrollo de un color rosa-rojo a máximo 15 minutos de añadir los reactivos, indicando la presencia de diacetilo. La prueba no debe leerse después de una hora.

Negativo: No hay cambio de color. Los cultivos negativos pueden producir un color cobrizo después de una hora, y se pueden interpretar como un falso positivo.

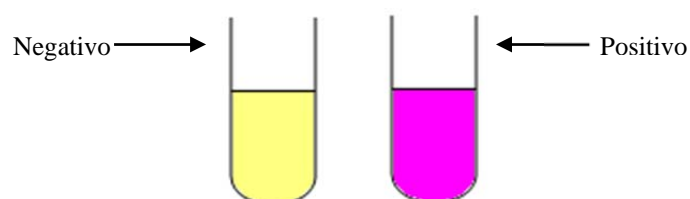


Figura 19. Interpretación de resultados de la prueba VP

#### ▪ **Prueba Citrato**

##### *Fundamento*

Esta prueba sirve para determinar si un organismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono y compuestos amoniacales como única fuente de nitrógeno en su metabolismo, provocando una alcalinización del medio.

En el medio de cultivo, el fosfato monoamónico es la única fuente de nitrógeno y el citrato de sodio es la única fuente de carbono. Ambos componentes son necesarios para el desarrollo bacteriano. El medio de cultivo es diferencial en base a que los microorganismos capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono, usan sales de amonio como única fuente de nitrógeno, con la consiguiente producción de alcalinidad (MacFaddin, 2004).

##### *Procedimiento*

Se inoculó un tubo de citrato de Simmons con la cepa en estudio. Con una aguja de inoculación se picó el tubo hasta 0.6mm antes de llegar al fondo de éstos y se realizó estrías en el pico de flauta. Se incubó a 37°C durante 24 horas.

##### *Interpretación de resultados*

Positivo: crecimiento con un intenso color azul en el pico de flauta.

Negativo: ausencia de crecimiento y ningún cambio de color (verde)



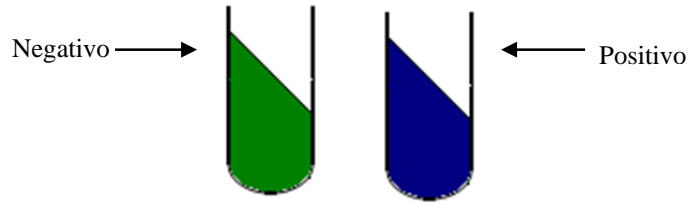


Figura 20. Interpretación de resultados de la prueba citrato

▪ **Prueba Licuefacción de la gelatina**

*Fundamento*

Determina la capacidad de un microorganismo de producir enzimas de tipo proteolítico (gelatinasas) que licúan/hidrolizan la gelatina o muestran cambios característicos debido a los productos de degradación.

La gelatina, una proteína derivada del colágeno animal, se incorpora a diferentes medios de cultivo para determinar la capacidad de un microorganismo de producir enzimas proteolíticas (proteinasas), detectadas por digestión o licuefacción de la gelatina. Las enzimas capaces de producir gelatinólisis se denominan gelatinasas (MacFaddin, 2004).

*Procedimiento*

Se inoculó un tubo de caldo nutritivo gelatina al 12% con la cepa en estudio haciendo una punción en el medio hasta una profundidad de 1.5 cm. Se incubó a 35°C durante 24 horas. Posteriormente se dejó en refrigeración durante 2 horas.

*Interpretación de resultados*

Positivo: licuefacción parcial o total del tubo sembrado

Negativo: solidificación completa

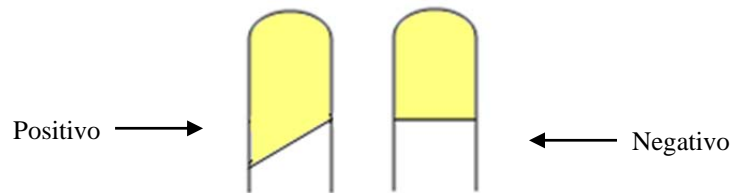


Figura 21. Interpretación de resultados de la prueba licuefacción de la gelatina

#### 4.1.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana “*in vitro*” de los sanitizantes por el método de Dilución en tubo.

Una vez identificadas las cinco cepas seleccionadas se realizó la estandarización de cada bacteria a analizar a una concentración de  $10^6$ ufc (Forero & Piedrahita, 2008; Cerutti et al., 2000).

##### *Procedimiento*

1. Se colocó 4.5 mL de SSF estéril en un tubo y se esterilizó a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.
2. Posteriormente, se inoculó aseptícamente una colonia de la cepa en estudio y se agitó durante 2 min, empleando un vortex hasta su completa homogeneización notando turbidez en el tubo.
3. Se realizaron diluciones decimales colocándose 1 mL de la mezcla anterior en un tubo que contenía 4.5 mL de SSF ( $10^{-1}$ ), se agitó durante 30 segundos.
4. De la mezcla anterior, se tomó 1 mL y se colocó en otro tubo con 4.5 mL de SSF ( $10^{-2}$ ) y así sucesivamente hasta  $10^{-6}$  (figura 22).
5. Se dividió en cuatro cuadrantes una placa con medio de cultivo (Agar Casoy) y se sembraron  $25\ \mu\text{L}$  por duplicado mediante la técnica de la gota (Miles & Misra, 1938) las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  (figura 23).
6. Se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}/24\text{hrs}$  y se tomó lectura.

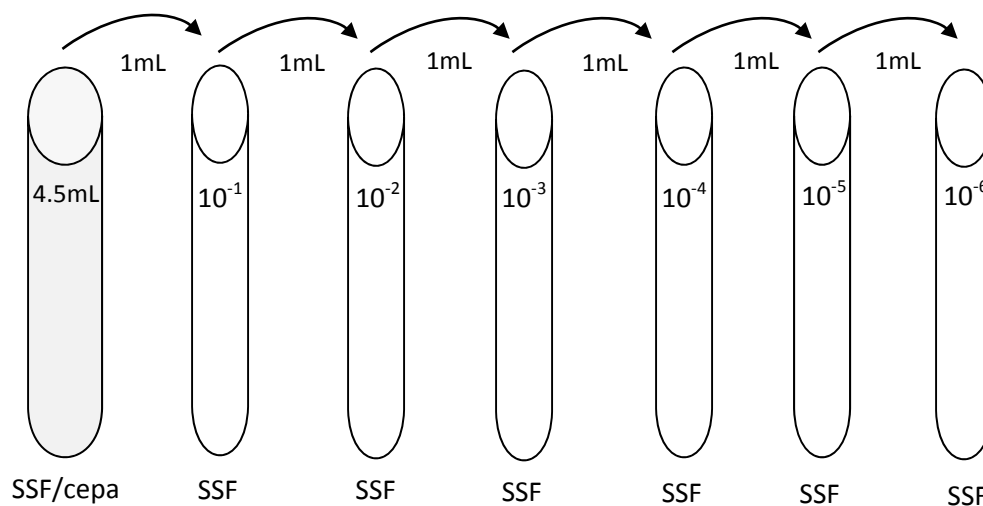


Figura 22. Estandarización de bacterias

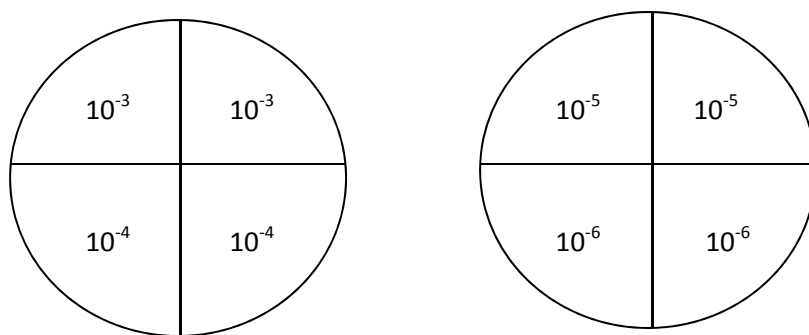


Figura 23. Siembra en placa por gota

Las soluciones de los sanitizantes evaluados con principios activos a base de hipoclorito de sodio, sales de amonio cuaternario y ácido peracético se prepararon según las instrucciones del fabricante con agua destilada estéril como diluyente (Tabla 3).

Tabla 3. Condiciones de uso de los sanitizantes a evaluar

Sanitizante	Concentración	Neutralizante
A base de hipoclorito de sodio	400ppm	Tiosulfato de sodio al 0.1%,
A base de sales de amonio cuaternario	800ppm	Polisorbato 80 y Lecitina al 0.1%,
A base de ácido peracético	300ppm	Agua peptonada al 0.1%

*EUROCHEM, International Corporation de México, S.A. de C.V. Ficha técnica de los sanitizantes, 2012 (ANEXO 1).NOM-BB-040-SCFI-1999.*

#### Procedimiento

1. Se adicionó 1 mL (1000  $\mu$ L) de la bacteria en estudio previamente estandarizada a  $10^6$ ufc en 9 mL del sanitizante a base de hipoclorito de sodio diluido a una concentración de 400ppm y se puso en contacto durante 15 min.
2. Después se agregó 1 mL de la mezcla anterior en un tubo que contenía 9 mL de neutralizante Tiosulfato de sodio al 0.1% se agitó y se dejó reposar durante 15 min.
3. Se realizaron las diluciones decimales hasta  $10^{-6}$ , siguiendo el procedimiento en la figura 24 con tubos que contenían 4.5 mL de SSF estéril.
4. Se dividió una placa con medio de cultivo (Agar Biotriptasa) en cuatro cuadrantes y se sembraron 20  $\mu$ L en cada uno las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  (ver figura 23) para el análisis microbiológico y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}/24$  horas.
5. Se realizó el mismo procedimiento para los sanitizantes a base de sales de amonio cuaternario y ácido peracético.

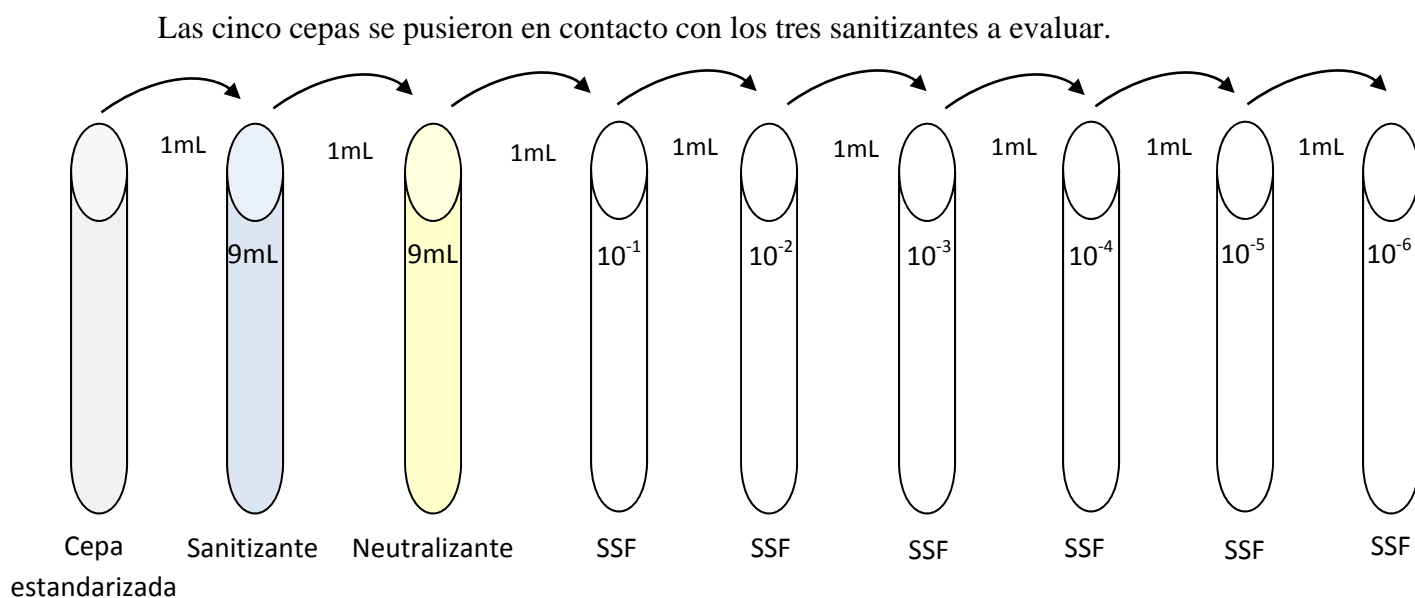


Figura 24. Método de dilución en tubo

#### 4.1.6 Confirmación de la actividad bactericida/bacteriostático de los sanitizantes en estudio

Se llevó a cabo mediante la inoculación aséptica de las diluciones donde no hubo crecimiento de la bacteria en estudio en tubos que contenían 4.5 mL de caldo BHI, se adicionó 1 mL de la dilución correspondiente y se incubaron a 30°C durante 15 días manteniéndose en reposo. La lectura se realizó por presencia o ausencia del microorganismo y por formación de biopelícula en los tubos (Rodríguez, 2011).

#### 4.1.7 Detección de estructuras bacterianas relacionadas en la formación biopelículas

Se eligieron nueve cepas (3 con alta capacidad de formar biopelícula, 3 con moderada capacidad de formar biopelículas y 3 con baja capacidad de formar biopelículas) utilizando la técnica de tinción negativa con ácido fosfotúngstico a través del microscopio electrónico de transmisión para observar las agrupaciones de las bacterias unidas por sus cápsulas, glicocalix o exopolisacáridos que pudieran producir.

##### *Procedimiento*

- Preparación de las muestras de origen biológico

Para eliminar cualquier residuo proteico del medio de cultivo las cepas seleccionadas fueron lavadas del medio de cultivo con solución salina fisiológica estéril. Se colocaron 0.5 mL de SSF en tubos eppendorf estériles y con un asa estéril se colocó la biopelícula formada por la cepa en estudio. Se centrifugó a 7000rpm durante 1min. La solución salina fue retirada con cuidado de no tocar el fondo de la punta. Se adicionó 1 mL del reactivo Karnosky al 1% para fijar las bacterias formadoras de biopelículas (González et al., 2003).

- Preparación de las rejillas con membrana en solución Formvar

Las rejillas se lavaron con acetona y se secaron previamente. Se preparó una solución 0.1% en cloroformo. Se colocó en un vaso de precipitado 50 mL de solución Formvar al 0.1%, se sumergió un cubreobjetos limpio, unos segundos después se sacó lentamente y uniformemente dejándolo secar por un momento; después con la ayuda de las pinzas de uña se cortaron las cuatro orillas del cubreobjetos y se sumergió poco a poco en un vaso de precipitados que contenía agua destilada para separar la membrana. Con la ayuda de unas pinzas se colocaron sobre la membrana las rejillas de cobre. Luego un papel filtro que tenía uno de sus extremos doblados hacia arriba, se puso en contacto con las rejillas y se esperó a que se humedeciera completamente, se sacó con cuidado el papel con las rejillas adheridas y se colocaron en una caja de petri para que se secan (González et al., 2003).

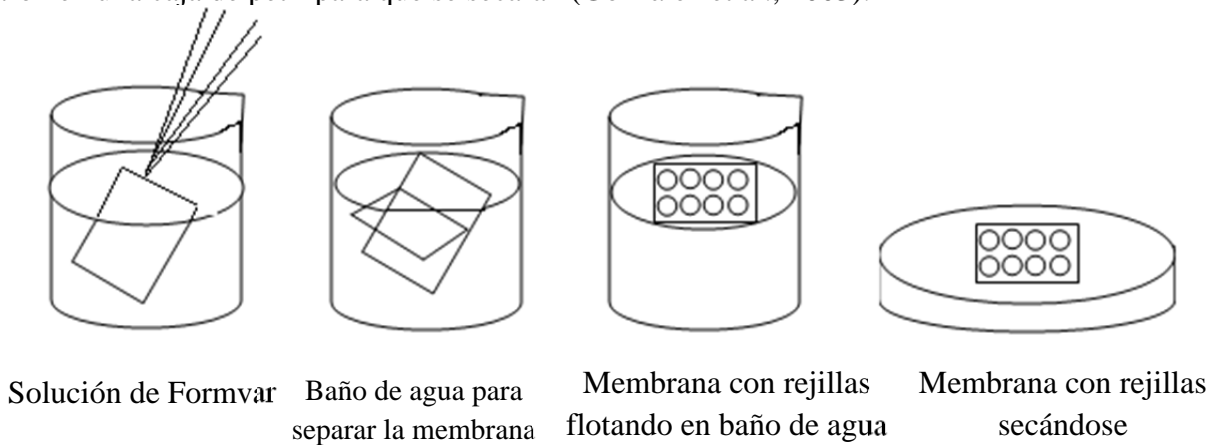


Figura 25. Preparación de las membranas plásticas

- Microscopia electrónica de transmisión: técnica de tinción negativa

Se tomó una gota de suspensión bacteriana y se depositó sobre papel parafilm, se colocaron dos rejillas con membrana para que se adsorbiera a la muestra durante un tiempo de 20min como se muestra en la figura 26.



Figura 26. Colocación de rejillas en muestra

Posteriormente se tomaron las rejillas y el exceso se absorbió con papel filtro. Se lavaron en una gota de agua destilada durante 2 minutos. Se tiñeron en una gota de ácido fosfotúngstico (AFT solución al 1% con pH de 7.2) durante 2 minutos como se observa en la figura 27 y se secaron en la estufa a 37°C.

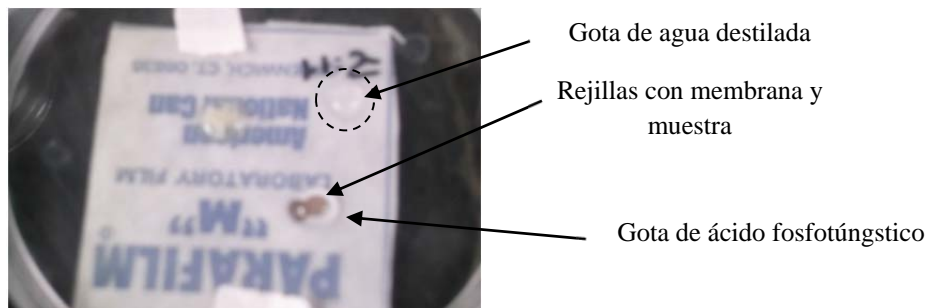


Figura 27. Tinción en ácido fosfotúngstico

Las muestras fueron observadas a 10000 aumentos con un microscopio de transmisión y fotografiadas.

#### **4.1.7.1 Interacción de las cepas formadoras de biopelículas**

Se inoculó una colonia de cada una de las cinco mejores cepas en un tubo con 4.5 mL de caldo BHI y se incubó a 35°C/24 horas durante 5 días para fomentar la formación de un anillo denso adherido a la superficie del tubo. Se realizó el procedimiento de la técnica tinción negativa descrita en el apartado 4.1.7 para observar la interacción y comportamiento de las bacterias formadoras de biopelículas.

## 5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 5.1 Obtención de la muestra biológica

La planta procesadora de cárnicos cuenta con secciones o áreas para cada etapa del proceso en la transformación de la carne. El área negra es la zona de sacrificio, la cual tiene acceso al corral de ayuno, descanso y pesado, cámaras de refrigeración y puerta de acceso al personal, además está separada del área de corte y elaboración de productos; el área gris es la zona de corte, donde se realizan los cortes y despieces de las canales para obtener piezas de tamaño comercial, el área cuenta con sistema de refrigeración (10°C), rieles para facilitar el transporte de las canales, dos mesas de trabajo con tablas de Naylamid, una sierra de banco, un molino, una rebanadora, cuchillos, acceso directo a las cámaras de refrigeración con sistema de enfriamiento (4°C) y entrada al personal. El área blanca es la zona de preparación de los productos cárnicos que está conectada con una cámara de refrigeración independiente, con una zona de curado, secado/madurado y un área de envasado. También cuenta con un área administrativa adjunta al área de sacrificio (ver figura 28).

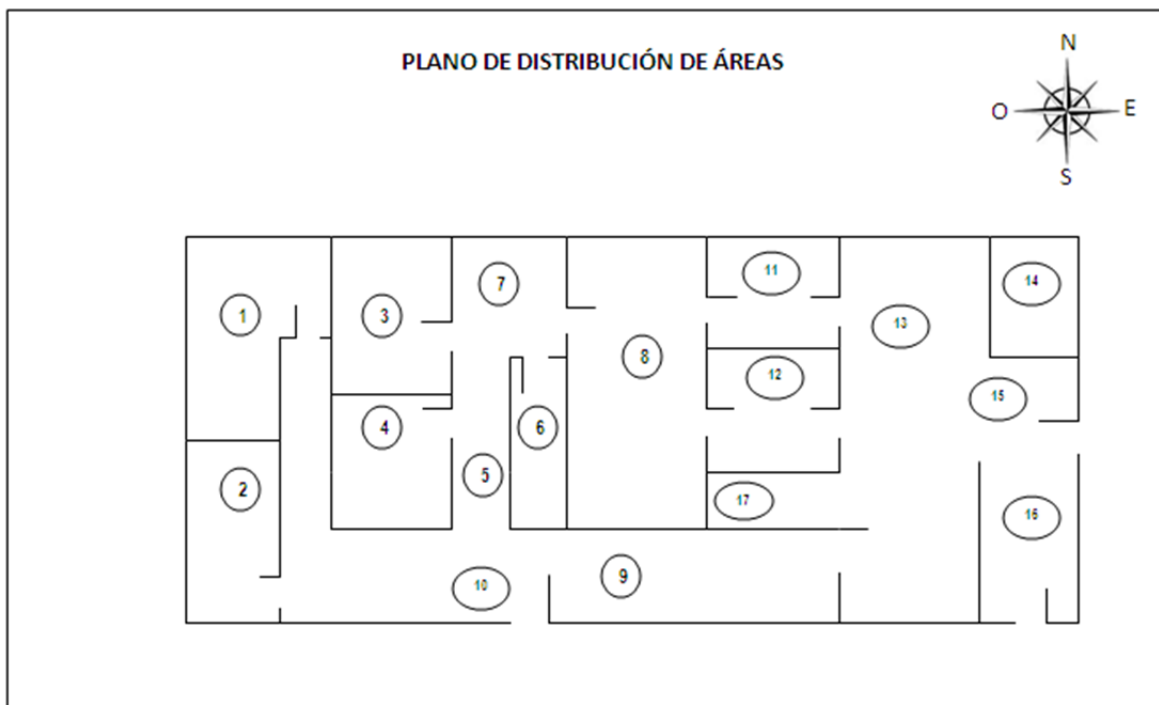


Figura 28. Plano de distribución de áreas en la planta

1. Baño y vestidores de hombres
2. Baño y vestidores de mujeres
3. Área blanca o de embutidos
4. Cámara de refrigeración de embutidos
5. Área de envasado al vacío
6. Cámara de congelación

7. Curado, secado y madurado
- 8. Área gris o de corte**
9. Pasillo
10. Entrada principal
11. Cámara de refrigeración A
12. Cámara de refrigeración B
13. Área negra o de sacrificio
14. Pesado del animal
15. Descanso del animal y entrada al corral de ayuno
16. Área de sacrificio de especies pequeñas

El área gris o zona de corte se encontró en un estado deficiente de limpieza y sanitización ya que se apreciaba a simple vista restos de suciedad en los equipos y utensilios mencionados anteriormente, aún cuando previamente a la toma de muestra se había realizado la limpieza y sanitización del área. De los tres muestreos realizados semanalmente se encontró contaminación en la mayoría de los puntos de riesgo identificados (ver tabla 4).

Tabla 4. Detección de puntos con riesgo de tener microorganismos formadores de biopelículas en el área de corte

Equipo	Presencia de Microorganismo
<b>Cuchillos</b>	
Punto 1	Positivo
Punto 2	Positivo
Punto 3	Positivo
<b>Mesa de corte</b>	
Punto 1	Positivo
Punto 2	Negativo
Punto 3	Positivo
<b>Sierra de banco</b>	
Punto 1	Positivo
Punto 2	Positivo
Punto 3	Positivo
<b>Molino de carne</b>	
Punto 1	Positivo
Punto 2	Positivo
Punto 3	Positivo
<b>Rebanadora</b>	
Punto 1	Negativo
Punto 2	Positivo
Punto 3	Positivo
<b>Cámara de Refrigeración A</b>	
Punto 1	Negativo
Punto 2	Positivo
Punto 3	Positivo



Punto 4	Positivo
Punto 5	Positivo
<b>Cámara de Refrigeración B</b>	
Punto 1	Positivo
Punto 2	Negativo
Punto 3	Positivo
Punto 4	Positivo
Punto 5	Negativo

Usualmente, las contaminaciones superficiales tienen su origen en operaciones de limpieza insuficiente o inadecuada en puntos concretos de las instalaciones (Orihuel et al., 2010). Varios autores coinciden en que la principal limitación de la limpieza reside en los problemas de acceso a zonas con ranuras, grietas, puntos ciegos, manchas de corrosión, etc., estas irregularidades de las superficies permiten el alojamiento de microorganismos y de materia orgánica (Leveau, 2002).

Las juntas metal/metal suelen ser lo suficientemente fuertes para prevenir la acumulación de residuos de productos, pero pueden permitir la entrada de microorganismos que pueden quedar protegidos de este modo frente a los programas de higienización. El crecimiento de biopelículas en los entornos de procesamiento de alimentos proporciona una mayor oportunidad para la contaminación microbiana del producto procesado (Holah, 1995).

## 5.2 Selección de las bacterias formadoras de biopelículas

La clasificación y selección dependió del espesor del anillo de la biopelícula formada en el tubo con caldo BHI transcurrido el tiempo de incubación, este parámetro se consideró de gran importancia porque a mayor espesor de biopelícula, mayor cantidad de microorganismo y mejor fijación (Zottola & Sasahara, 1994).

En la figura 29 se observa la evolución del crecimiento de las biopelículas con respecto al tiempo de incubación a) 24 hrs, b) 48 hrs, c) 72 hrs y d) 15 días a temperatura ambiente; transcurrido el periodo de incubación límite se obtuvieron 33 cepas que formaban biopelículas y se eligieron las 5 mejores cepas que formaron el anillo más denso. Los estudios indican que la capacidad de formar biopelículas no parece restringirse a un grupo específico de microorganismos y, que en la actualidad, se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas la mayoría de las bacterias, independientemente de la especie, pueden existir dentro de biopelículas adheridas a superficies en una interfase sólido/líquida (Nazar, 2007). La presencia de fimbrias, flagelos y la producción de exopolisacáridos (EPS), influyen en la capacidad de las células microbianas para adherirse a las superficies y consecuentemente adherir a más bacterias. Se sabe que las células inmóviles no recolonizan las áreas de un sustrato como lo hacen las células móviles, resultando más lenta la formación de una biopelícula por las células inmóviles. Hongos o bacterias sin movilidad propia que se hayan adherido a la biopelícula son capaces de aprovechar materiales residuales de los primeros habitantes y de producir sus propios residuos que a su vez serán aprovechados por otros microorganismos. En la gráfica 1 se observa los resultados obtenidos de la clasificación visual de las cepas según el espesor de la biopelícula

obteniéndose que 5 cepas tuvieron alta formación de biopelículas (29%), 18 (51%) moderada formación de biopelículas, 10 (14%) baja formación de biopelículas y 2 (6%) no formaron biopelículas (negativa). Las diferencias en la formación de biopelículas pueden depender del tipo de superficie al cual se adhieren (Molinar et al., 2007). 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 (Fuster, 2006). La formación de una biopelícula depende de las características del sustrato al cual se une y a otros aspectos del medio ambiente como temperatura, pH y cantidad de nutrientes que juegan un papel importante en la adhesión bacteriana al sustrato. Su importancia se debe a que permite incrementar las posibilidades de supervivencia de los microorganismos en el medio ambiente.

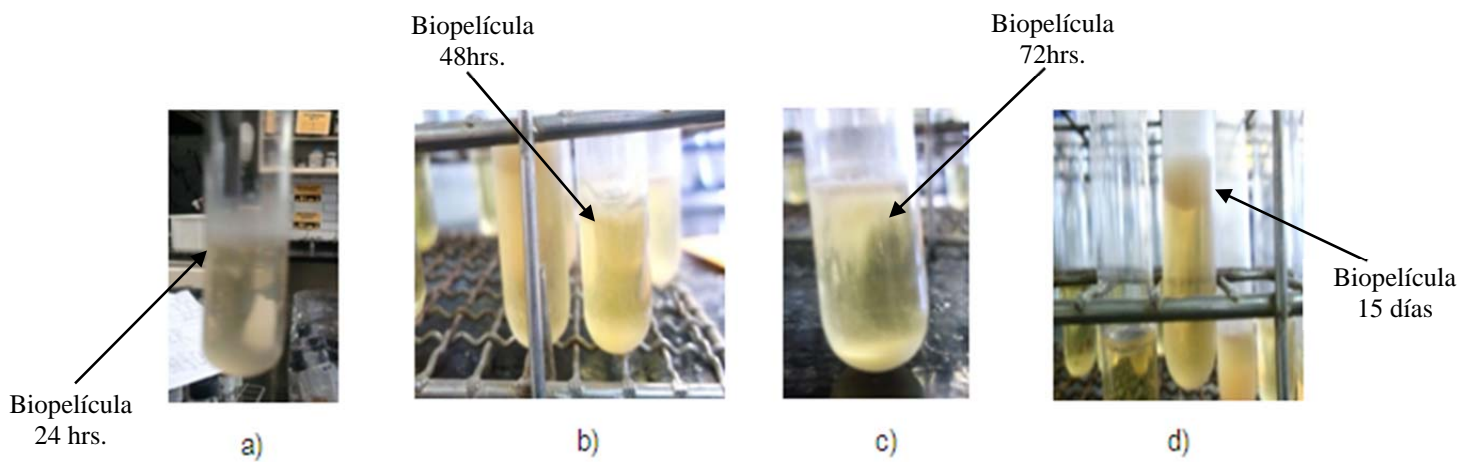
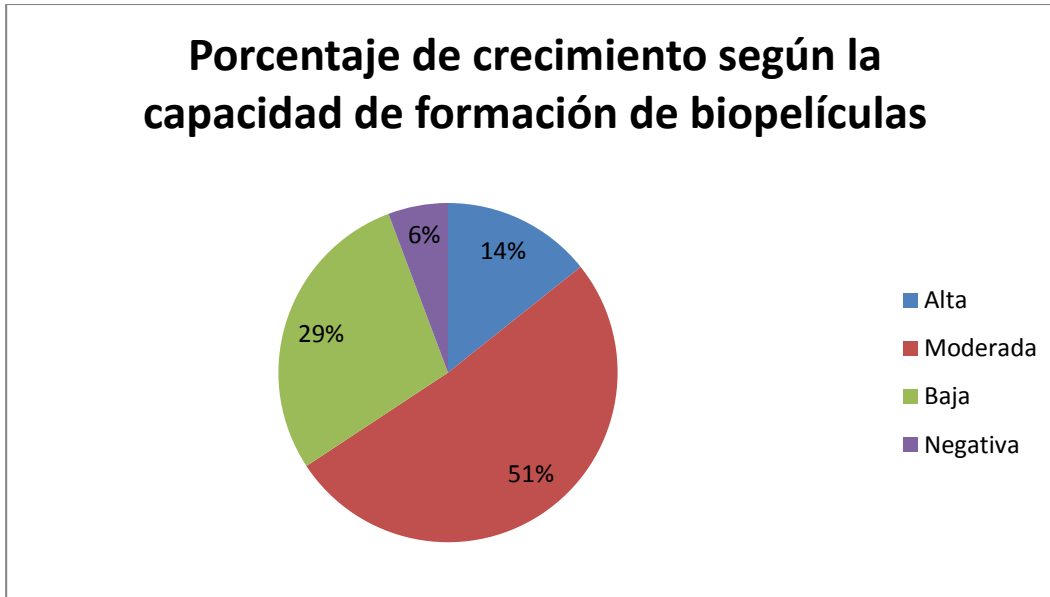


Figura 29. Evolución de una biopelícula con respecto al tiempo de incubación

Las adhesiones se dan rápidamente, Mittelman en 1998 encontró que para la unión irreversible entre la célula y la superficie es necesario un tiempo de contacto mínimo, a menudo entre 5 a 30 segundos. Si bien, en general, el espacio temporal para el desarrollo de una biopelícula es corto y varía en función de la temperatura, tiempo y disponibilidad de nutrientes por esta razón Stopforth y cols en 2002 sugieren que debe haber un número límite de células adheridas a la superficie.



Gráfica 1. Clasificación visual de las cepas según el espesor de la biopelícula formada

### 5.2.1 Identificación de las cepas

En las tablas 5 y 6 se muestran los resultados obtenidos de la coloración gram y las pruebas bioquímicas que se realizaron a las cinco cepas clasificadas con alta formación de biopelículas.

Tabla 5. Resultados de la coloración de GRAM

Coloración GRAM	
Cepa 1	bacilo gram positivo esporulado (forma espora)
Cepa 2	bacilo gram positivo esporulado (forma espora)
Cepa 3	bacilo gram positivo esporulado (forma espora)
Cepa 4	bacilo gram negativo
Cepa 5	bacilo pleomórfico (más de una forma) gram positivo

Las figuras 30, 31, 32, 33 y 34 representan la visualización al microscopio de las cinco cepas en estudio después de la coloración gram, donde se observan la morfología y estructuras de las bacterias así como también la formación de la espora en tres de las bacterias gram positivas.

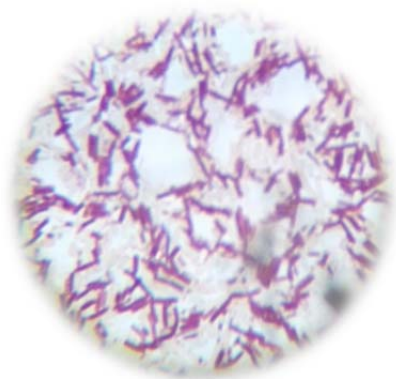


Figura 30. Ceba 1

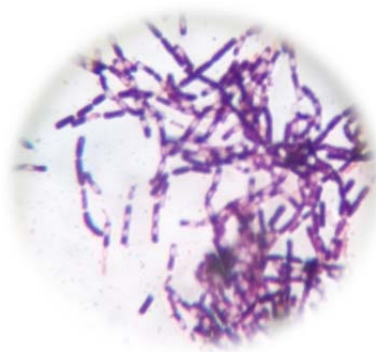


Figura 31. Ceba 2



Figura 32. Ceba 3

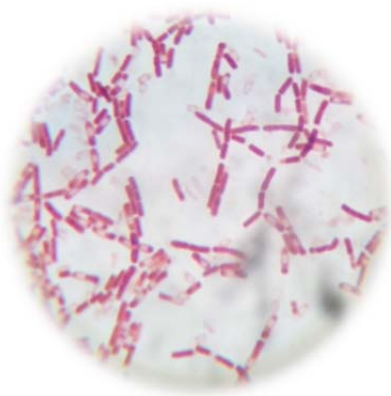


Figura 33. Ceba 4

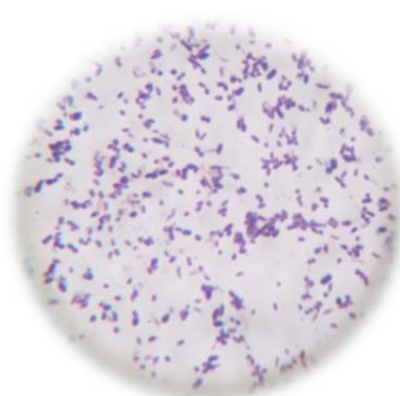


Figura 34. Ceba 5

Tabla 6. Resultados de las pruebas bioquímicas para la identificación de las bacterias

Prueba	Ceba 1	Ceba 2	Ceba 3	Ceba 4	Ceba 5
Oxidasa	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+
Glucosa	+	+	+	-	+
Manitol	+	+	+	-	-
Arabinosa	+	+	-	-	-
O-F	O/F	O/F	O/F	O	NR
Nitratos	+	+	+	-	+
Rojo de metilo	-	-	+	-	-
VP	-	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-	+
Gelatina	+	+	-	-	-
Urea	-	-	-	-	-

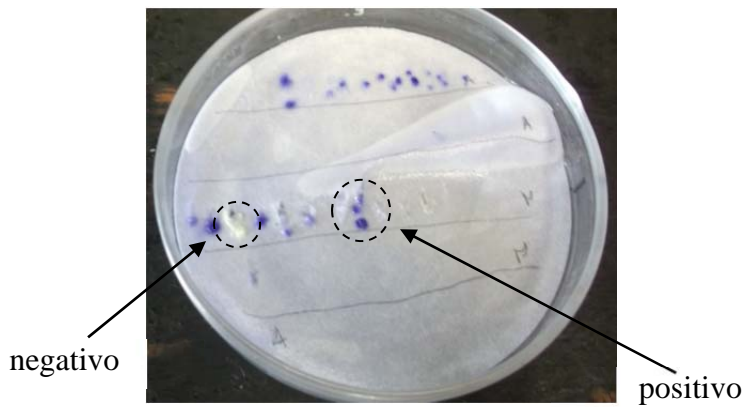


Figura 35. Resultados de la prueba Oxidasa

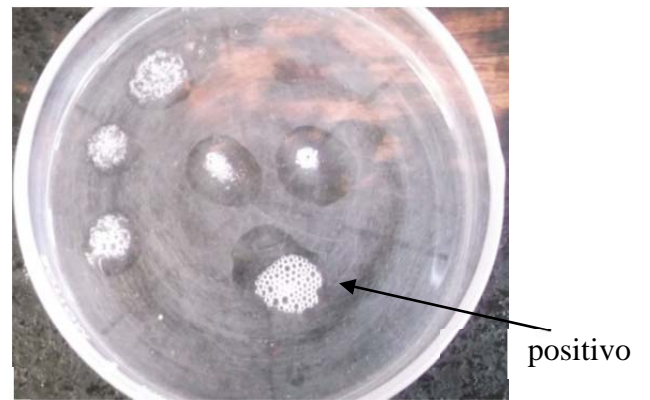


Figura 36. Resultados de la prueba Catalasa

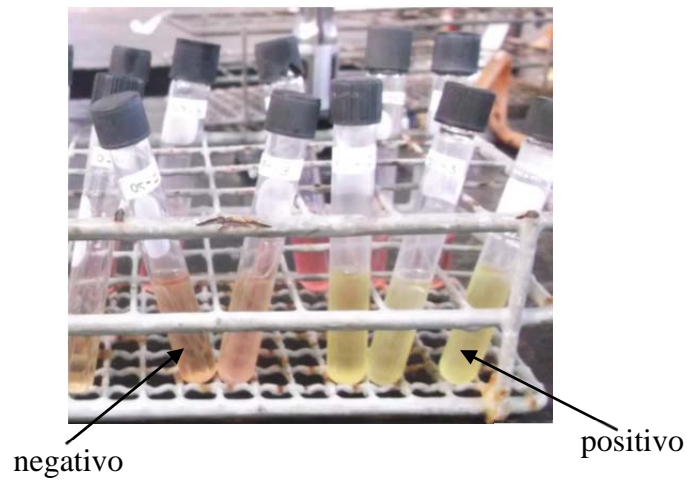


Figura 37. Resultado de la prueba de Glucosa

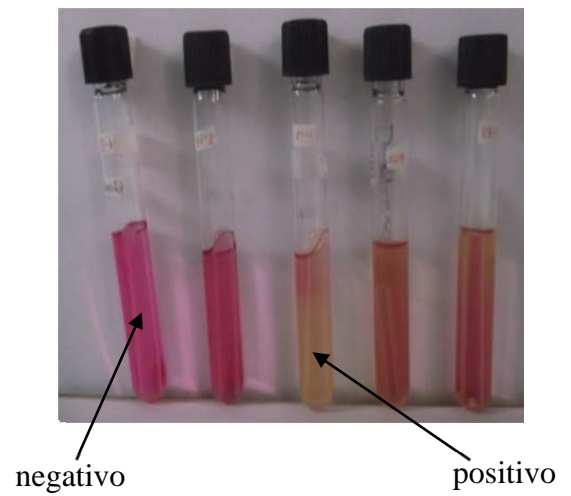


Figura 38. Resultado de la prueba de Manitol

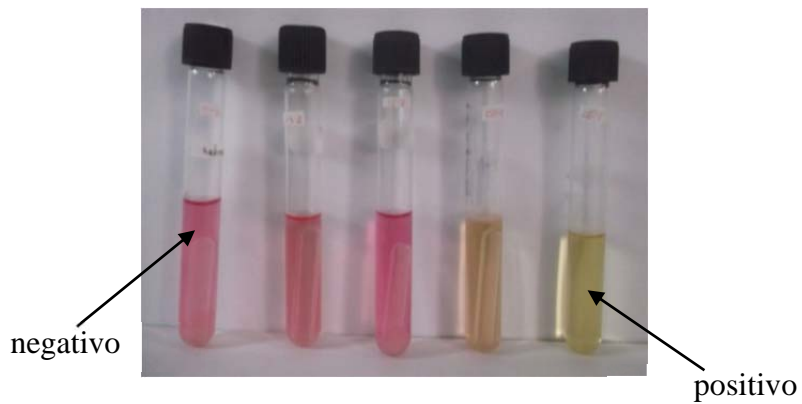


Figura 39. Resultado de la prueba de Arabinosa

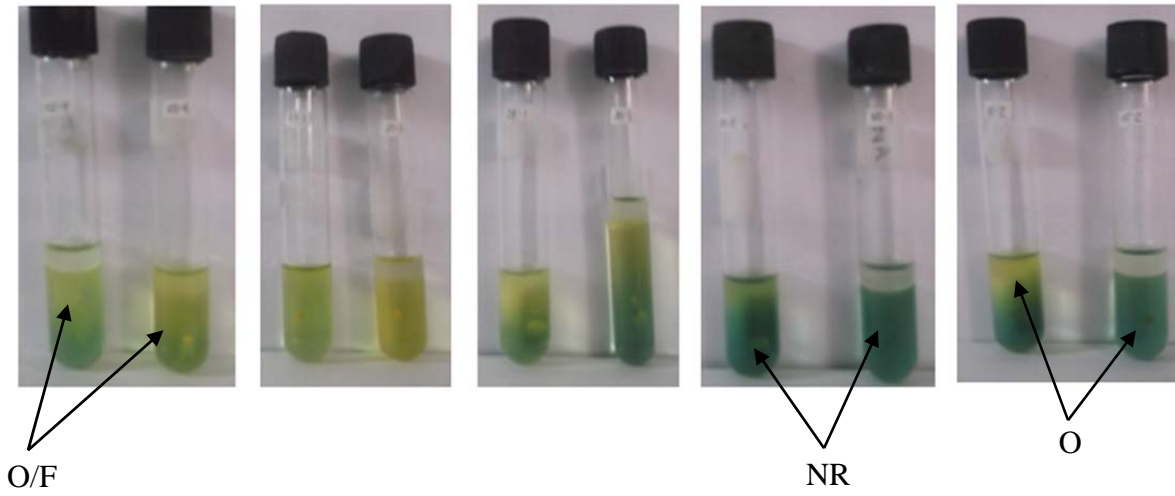


Figura 40. Resultado de la prueba de O-F

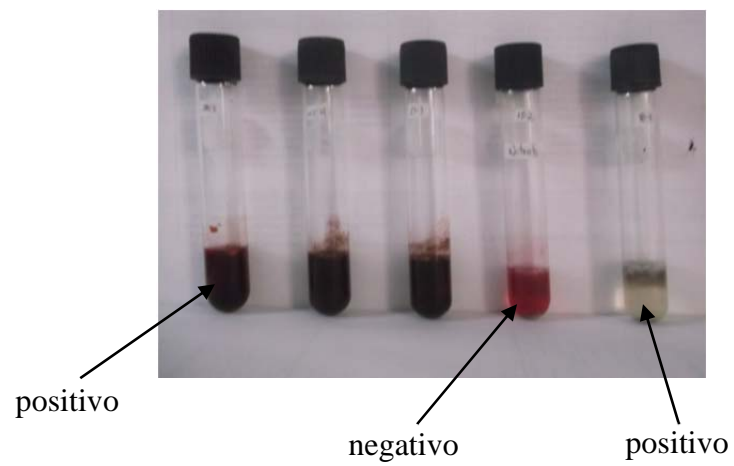


Figura 41. Resultado de la prueba de reducción de Nitratos

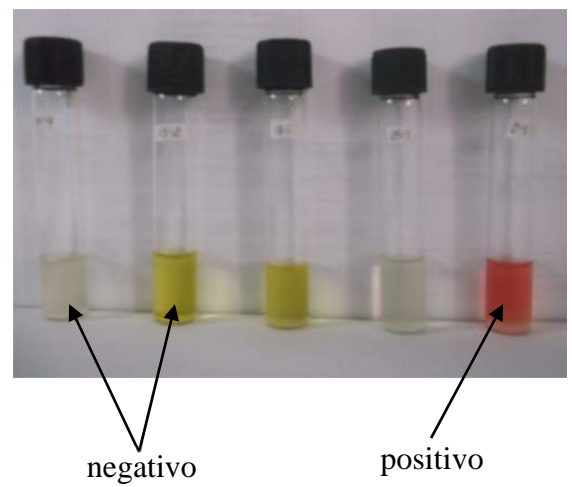


Figura 42. Resultado de la prueba de rojo de metilo

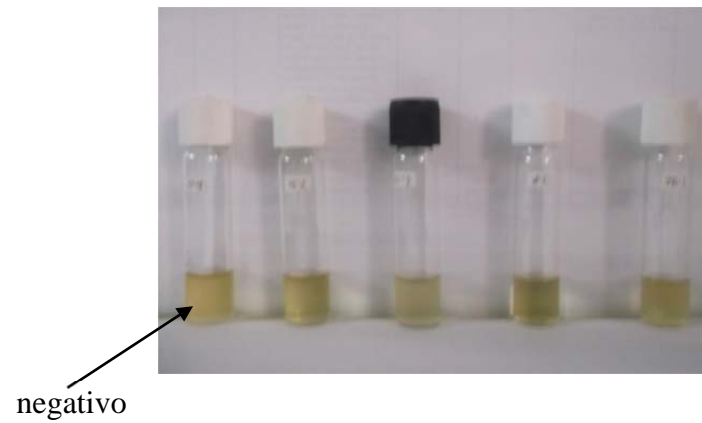


Figura 43. Resultado de la prueba de VP



Figura 44. Resultado de la prueba de Citrato

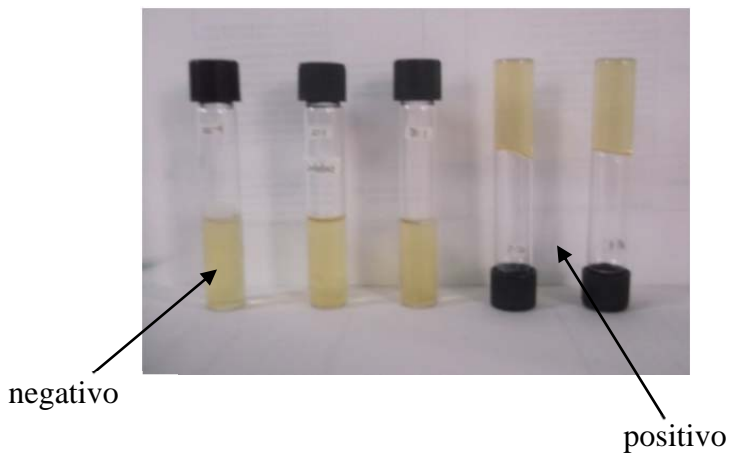


Figura 45. Resultado de la prueba de Licuefacción de la Gelatina

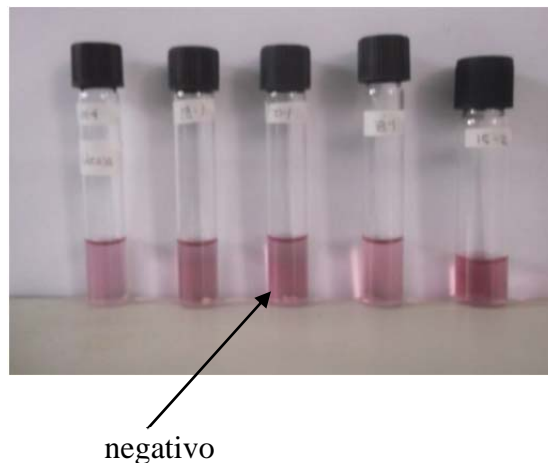


Figura 46. Resultado de la prueba de Urea

De acuerdo a los resultados obtenidos de cada una de las pruebas bioquímicas (figuras 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 y 46) y como se puede observar en la tabla 5 el género identificado para las cepas 1, 2 y 3 corresponde al género *Bacillus*; las bacterias pertenecientes a este género están ampliamente distribuidas en la naturaleza y se encuentran en el ambiente, suelo, tierra, agua, productos alimenticios, en la mucosa y como parte de la flora intestinal normal de algunos mamíferos, incluyendo al hombre (Castillo et. al., 2004), la cepa 4 fue identificada por el género *Comamonas* descrito como miembro de la familia *Comamonadaceae*, de la clase beta-proteobacteria, que habita en suelos, aguas y humanos, se caracteriza por ser una bacteria gram negativa estrictamente aeróbica, altamente móvil, no fermentativa y no esporulada, la cepa 5 corresponde al género *Corynebacterium* son bacterias gram positivas no esporuladas, carecen de motilidad, son bacilos rectos o ligeramente curvados de longitud diversa que se encuentran en el suelo, el agua, animales, humano, etc (Chacón et al., 2009). Como se mencionó anteriormente, la planta cuenta con un área administrativa adjunta al área de sacrificio y el acceso a estas áreas se realiza por la misma puerta, se observó que el personal que atraviesa a la oficina no cuenta con equipo de protección y ropa adecuada para atravesar la zona de sacrificio por lo que se puede suscitar un alto grado de riesgo por contaminación cruzada y acarreo de suciedad en todas las áreas de la planta.

Tabla 7. Identificación de las bacterias

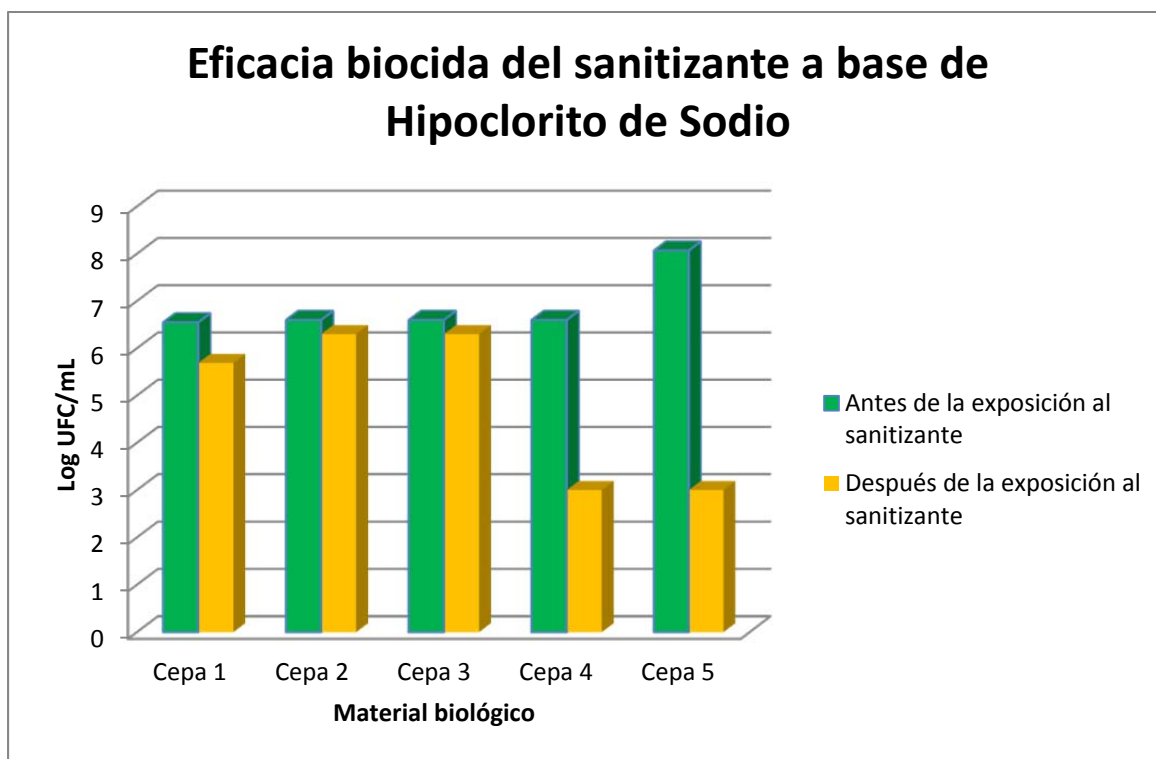
Identificación	
Cepa 1	<i>Bacilluscirculans</i>
Cepa 2	<i>Bacilluscirculans</i>
Cepa 3	<i>Bacilluscoagulans</i>
Cepa 4	<i>Comamonas spp.</i>
Cepa 5	<i>Corynebacterium spp.</i>

Macfaddin, 2004

## 5.2.2 Eficacia biocida del los sanitizantes a las concentraciones que recomienda el fabricante

### Sanitizante a base de hipoclorito de sodio:

En la Tabla 8 se muestran los resultados de la evaluación con el sanitizante a base de hipoclorito de sodio a una concentración de 400ppm con una exposición de 15 minutos a temperatura ambiente, demostraron que para la cepa 1 hubo una reducción de 0.86 ciclos logarítmicos, para las cepas 2 y 3 de 0.3 ciclos logarítmicos, para la cepa 4 de 3.6 ciclos logarítmicos y para las cepa 5 la reducción fue de 5.07 ciclos logarítmicos. En un estudio realizado por Beraca en 2008 sobre la resistencia entre las formas esporuladas contra la forma vegetativa bacteriana, notó que la resistencia de las esporas se debe al cambio en la configuración molecular de las proteínas protegidas por el grupo sulfhídrico de enzimas esenciales, en la gráfica 2 se observa que el sanitizante tuvo un efecto biocida sobre las bacterias en su forma vegetativa y no actuó contra las bacterias en su forma esporulada como lo indica la ficha técnica.



Gráfica 2. Evaluación “*in vitro*” del sanitizante a base de hipoclorito de sodio

Estos resultados también son comparables con un estudio realizado por Hernández & Rengel en 2002, en donde evaluó la efectividad biocida del hipoclorito de sodio contra *Bacillus cereus* a una concentración menor (100 ppm) durante 15 minutos a diferentes temperaturas, logrando inhibir el crecimiento del microorganismo solo a 45°C con lo que se observó que al aumentar la temperatura favorece la actividad antibacteriana del hipoclorito



de sodio a bajas concentraciones. Wei et al. en 2003 afirman que la cloración puede inactivar el mecanismo de germinación de las esporas, debido probablemente a la ruptura de la envoltura de las mismas y sus capas subyacentes, lo que origina un incremento de la permeabilidad de estas estructuras, con el consecuente aumento de la susceptibilidad a ser destruidas; sin embargo, si se toman en cuenta los resultados obtenidos por Lee & Frank en 1991 quienes comprobaron que las células adheridas a superficies son más resistentes que las células suspendidas en un cultivo, se puede suponer entonces que la adherencia del cultivo al acero inoxidable dificulta la acción del cloro sobre este tipo de microorganismo y más aún en el caso de los microorganismos del género *Bacillus* ya que la mayoría posee esporas.

Las esporas bacterianas de los géneros *Bacillus* han sido ampliamente estudiadas y son invariablemente los más resistentes de todos los tipos de bacterias a los antisépticos y sanitizantes. La resistencia a los antisépticos y sanitizantes se desarrolla durante la esporulación (McDonnell & Russell, 1999).

Se realizó el cálculo de los porcentajes de inhibición según (Cerutti et al., 2000):

$$\frac{\text{UFC/ml inicial} - \text{UFC/ml final}}{\text{UFC/ml final}} \times 100$$

Obteniéndose para la cepa 1 un porcentaje de inhibición del 13.1%, para las cepas 2 y 3 del 4.5%, para la cepa 4 del 54.5% y para la cepa 5 del 62.8%. En la tabla 8 también se muestran los resultados de la reactivación de las cepas después de la neutralización del hipoclorito de sodio para confirmar el poder biocida del sanitizante, donde se pudo observar crecimiento positivo de microorganismos para las cepas 1, 2, y 3 y crecimiento negativo de microorganismos para las cepas 4 y 5. Los sanitizantes pueden ejercer efectos bacteriostáticos y bactericidas, aunque el mecanismo de acción es diferente. Con la actividad bacteriostática generalmente se presenta una cierta lesión metabólica que es reversible sobre retiro o la neutralización del sanitizante (Denyer, 1995) mientras que en los resultados de la acción bactericida el daño es irreparable e irreversible en una estructura o en una función celular vital. La acción biocida se puede dar a través de las interacciones fisicoquímicas con las estructuras microbianas, reacciones específicas con moléculas biológicas o alteración de algunos procesos metabólicos o energéticos. De acuerdo a esto se puede concluir que el hipoclorito de sodio se comporta a las condiciones de uso previamente dichas como bactericida a la exposición con bacterias no esporuladas hasta la dilución  $10^3$  ufc debido a que la acción bactericida del hipoclorito de sodio se debe al ácido hipocloroso (HCIO) y al cloro gaseoso ( $\text{Cl}_2$ ) que se forman cuando el hipoclorito es diluido en agua. El HCIO penetra fácilmente en la célula bacteriana a través de la membrana citoplasmática, actúa sobre proteínas y ácidos nucleicos de los microorganismos; oxida grupos sulfhídricos (-SH), ataca grupos aminos, índoles y al hidroxifenol de la tirosina; se comporta como bacteriostático para las bacterias esporuladas hasta la dilución  $10^5$  ufc las cuales son más resistentes a los sanitizantes que el propio microorganismo debido a las múltiples capas de la espóra, las cuales necesitarían presencia de calor para que el sanitizante pudiera penetrar.

Tabla 8. Efecto antibacteriano del sanitizante a base de hipoclorito de sodio

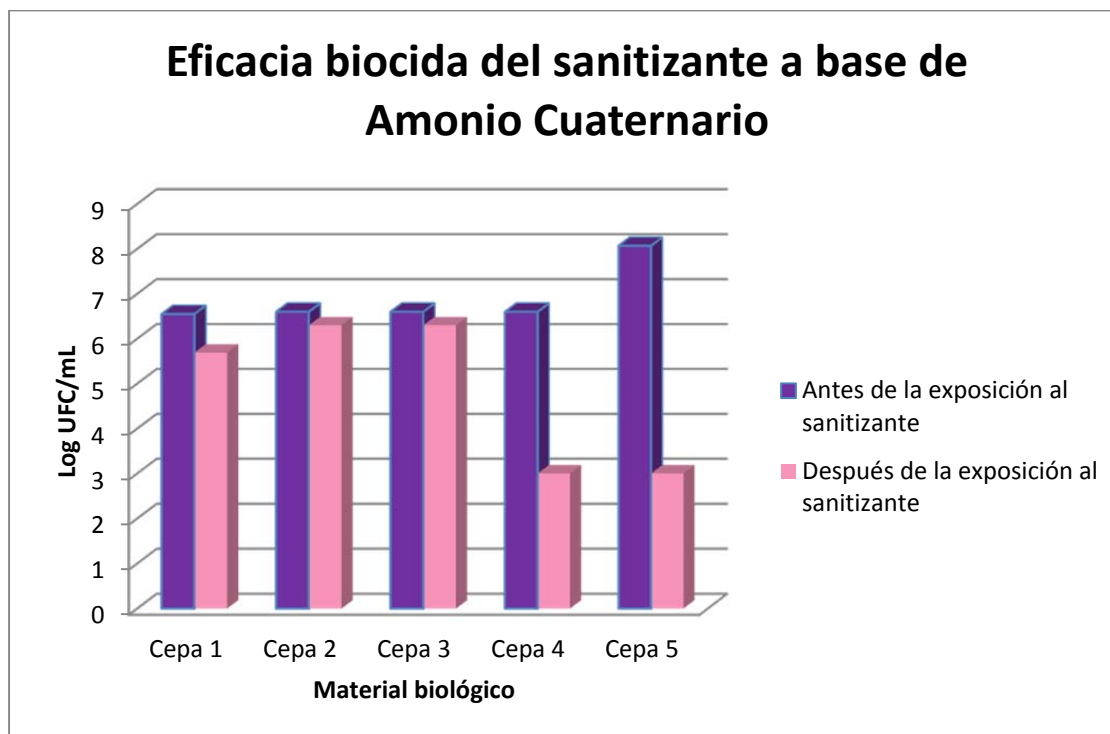
Cepa	Concentración inicial (log)de bacteria	Reducción logarítmica por el sanitizante (media)	% de inhibición	*Reactivación de la cepa después de la neutralización
1	6.55	5.69	13.1	+
2	6.60	6.30	4.5	+
3	6.60	6.30	4.5	+
4	6.60	3.0	54.5	-
5	8.07	3.0	62.8	-

- Bacteriostático
- Bactericida

\*Se reactivaron las diluciones donde la bacteria no presentó crecimiento al sembrarse en medio de cultivo con Agar Casoy a 37°C/24 hrs. Para las cepas 1, 2 y 3 la dilución fue 10<sup>5</sup>ufc y para las cepas 4 y 5 fue 10<sup>3</sup>ufc.

#### Sanitizante a base de Amonio Cuaternario:

En la Tabla 9 se muestran los resultados de la evaluación con el sanitizante a base sales de amonio cuaternario a una concentración de 800 ppm con una exposición de 15 minutos a temperatura ambiente, demostraron de forma similar lo sucedido con el hipoclorito de sodio obteniéndose para las cepas 1 una reducción de 1.16 ciclos logarítmicos, para la cepa 2 de 0.91 ciclos logarítmicos, para la cepa 3 de 2.21 ciclos logarítmicos, para la cepa 4 de 3.6 ciclos logarítmicos y para la cepa 5 se obtuvo una reducción de 5.07 ciclos logarítmicos (gráfica 3).



Gráfica 3. Evaluación “in vitro” del sanitizante a base de amonio cuaternario

Los porcentajes de inhibición que se obtuvieron fueron para la cepa 1 de 17.7%, para la cepa 2 de 13.7%, para la cepa 3 de 33.4%, para la cepa 4 de 54.5% y para la cepa 5 de 62.8%. En la tabla 9 también se observan los resultados de la reactivación de las cepas, de las cuales mostraron crecimiento positivo de microorganismos únicamente en la cepa 1, en base a estos resultados el sanitizante a base de amonio cuaternario se comportó como bacteriostático frente a las bacterias esporuladas, tomando en cuenta que no es un sanitizante esporicida (Sánchez & Sáenz, 2005), se puede deducir que la reducción logarítmica en las cepas 2 y 3 pudo deberse al efecto que tuvo sobre las bacterias que todavía se encontraban en la forma vegetativa, en el caso de la cepa 4 el sanitizante tuvo un efecto bactericida siendo comprobado con la neutralización del sanitizante, sin embargo hubo supervivencia de microorganismos representado por el 45.5%, esto se puede explicar debido a que la resistencia a estos compuestos puede ser alcanzada a través de diversas estrategias que poseen los microorganismos del género *Comamonas* para sobrevivir a la acción de los biocidas. La estrategia más usada por las bacterias gram negativas para alcanzarla resistencia a los biocidas, es la disminución de la acumulación del agente activo dentro del interior celular, y esto se logra debido a la regulación en el flujo de paso de este agente a través de la pared celular (Russell, 2003) y en el caso de la cepa 5 el sanitizante también tuvo un efecto bactericida quedando comprobado con la neutralización del sanitizante. La sensibilidad de los microorganismos gram positivos no esporulados ante el sanitizante a base de amonio cuaternario, se explica por el hecho de que el modo de acción de éste se fundamenta en la desnaturalización de las proteínas y el posterior rompimiento de las membranas celulares (Barreiro, 1992), y tal como lo señalan Pelczar et al. en 1982 las bacterias gram positivas no esporuladas poseen un menor contenido lipídico en sus paredes celulares, lo que favorece la desnaturalización de las proteínas.

En cuanto a las bacterias sobrevivientes, ha sido descrito que la resistencia de las bacterias del género *Corynebacterium spp* a un biocida en particular, puede ser función de la permeabilidad del mismo a través de la pared celular, y este tipo de bacterias son más permeables, y por lo tanto serían más susceptibles a la acción de estos agentes (SCENIHR, 2009), lo cual coincide con los resultados obtenidos ya que la cepa 5 fue la más susceptible a los sanitizantes evaluados en este proyecto.

Estos resultados también son comparables con los obtenidos por Rueda, J., et al 2003, que demostraron que las concentraciones recomendadas comercialmente (1.000 ppm) fueron eficaces frente a microorganismos gram positivos no esporulados obteniéndose un porcentaje de inhibición del 100% y aunque la concentración evaluada en este caso fue menor (800 ppm), el sanitizante problema redujo la carga microbiana un 62% de las bacterias no esporuladas, con lo cual se podría suponer que al aumentar la concentración del sanitizante favorece su acción biocida.

Tabla 9. Efecto antibacteriano de sanitizante a base de sales de amonio cuaternario

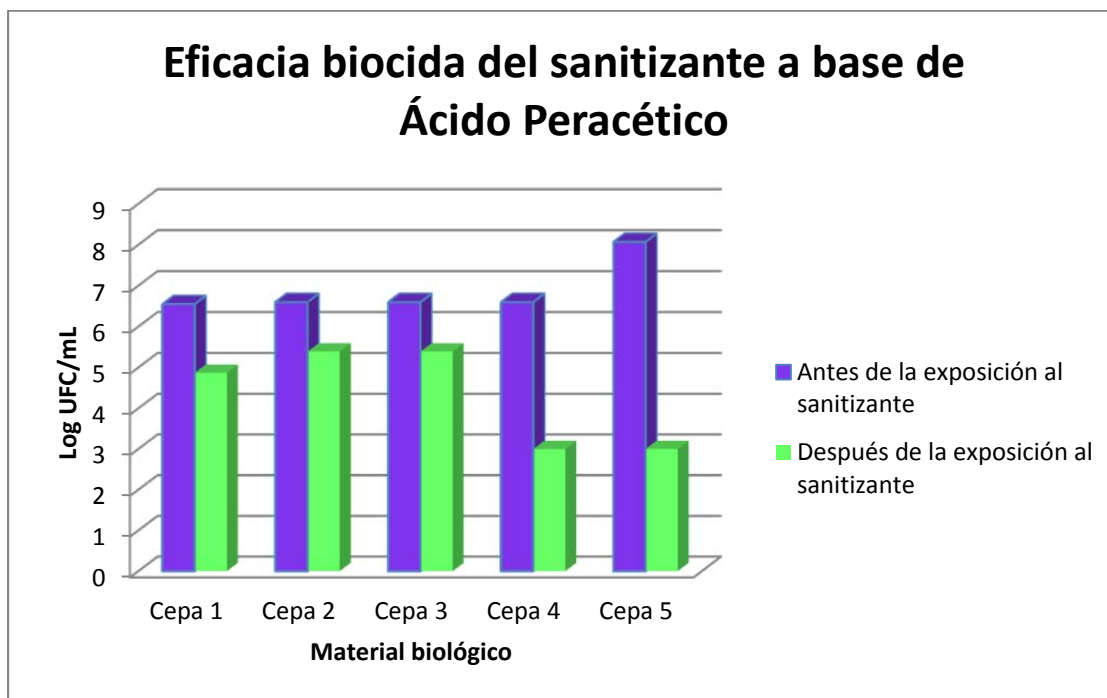
Cepa	Concentración inicial (log)de bacteria	Reducción logarítmica por el sanitizante (media)	% de inhibición	*Reactivación de la cepa después de la neutralización
1	6.55	5.39	17.7	+
2	6.60	5.69	13.7	-
3	6.60	4.39	33.4	-
4	6.60	3.0	54.5	-
5	8.07	3.0	62.8	-

+ Bacteriostático  
 - Bactericida

\*Se reactivaron las diluciones donde la bacteria no presentó crecimiento al sembrarse en medio de cultivo con Agar Casoy a 37°C/24hrs. Para las cepas 1 y 2 la dilución fue 10<sup>5</sup>ufc, para la cepa 3 la dilución fue 10<sup>4</sup>ufc y para las cepas 4 y 5 fue 10<sup>3</sup>ufc.

**Sanitizante a base de Ácido Peracético:**

En la tabla 10 se muestran los resultados de la evaluación con el sanitizante a base de ácido peracético a una concentración de 300 ppm con una exposición de 15 minutos a temperatura ambiente donde se obtuvo para la cepa 1 una reducción logarítmica de 1.66, para las cepas 2 y 3 de 1.21 ciclos logarítmicos, para la cepa 4 de 3.6 ciclos logarítmicos y para la cepa 5 fue de 5.07 ciclos logarítmicos (gráfica 4).



Gráfica 4. Evaluación “in vitro” del sanitizante a base de ácido peracético

De acuerdo a los resultados obtenidos, el porcentaje de inhibición fue de 25.6% para la cepa 1, en el caso de la cepa 2 fue de 18.3%, para las cepas 3 y 4 se obtuvo un porcentaje del 54.5% y para la cepa 5 del 62.8%. Debido a su poder oxidante el ácido peracético es considerado un biocida más potente que el hipoclorito de sodio y el amonio cuaternario ya que tiene la ventaja de eliminar todo tipo de microorganismos incluidos algunas esporas bacterianas a concentraciones bajas (Sánchez & Sáenz, 2005) sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos de la evaluación a los sanitizantes a base de hipoclorito de sodio y amonio cuaternario no se encontraron diferencias en la reducción logarítmica de las cepas 4 y 5 ya que los tres sanitizantes obtuvieron el mismo porcentaje de inhibición (ver gráfica 5).

En la tabla 10 también se muestran los resultados de la reactivación de las cepas después de la neutralización del sanitizante a base de ácido peracético con lo cual se comprobó su acción bactericida para las cepas 4 y 5, eliminando posiblemente solo bacterias en estado vegetativo, esto también explicaría la reducción logarítmica de las cepas 1, 2 y 3 ya que para la eliminación de esporas por medio de agentes químicos se necesitan condiciones de temperatura y tiempo extremas de aplicación de los sanitizantes (Medina & Valencia, 2008). Como se ha mencionado algunas bacterias tienen la capacidad de resistencia a la exposición frente a un sanitizante químico. La resistencia de las bacterias del género *Bacillus*, a los sanitizantes, se atribuye a que los microorganismos esporulados forman una barrera a la entrada de los agentes antimicrobianos, ya que las membranas que rodean el núcleo de la endospora actúan como factor adicional al limitar la penetración del agente químico. Una bacteria no esporulada puede resistir a la acción de los biocidas y los antibióticos mediante una propiedad natural (resistencia intrínseca), o una propiedad adquirida, por mutación o por la adquisición de plásmidos, transposones o integrones (Sheldon, 2005). La susceptibilidad de las cepas 4 y 5 a este sanitizante puede deberse a su modo de acción ya que oxida, desnaturaliza las proteínas y los lípidos de los microorganismos, lo que conduce a una desorganización de su membrana (Sánchez & Sáenz, 2005).

En un estudio realizado por Morales en 2007, el sanitizante pudo ejercer su acción contra las esporas a una concentración de 200ppm en un tiempo de exposición de 3, 6 y 9 horas impidiendo la formación del córtex entre la membrana interna y la externa antes de la maduración de la espora, sin embargo estas condiciones son experimentales donde se controla la formación de la espora y no así en las condiciones de este experimento donde las esporas bacterianas ya están formadas.

Cuando se evalúa un sanitizante frente a un microorganismo esporulado como en el caso de la bacteria del género *Bacillus* es preciso aumentar el tiempo de exposición por muchas razones, por ejemplo; las esporas poseen un núcleo con un gran contenido en dipicolinato de calcio, además el núcleo se encuentra parcialmente deshidratado, esta característica aumenta la termoresistencia de la espora y al mismo tiempo le confiere resistencia frente a sustancias químicas. Además, del bajo contenido en agua de la espora, el pH del citoplasma del núcleo contiene niveles elevados de proteínas específicas del núcleo denominadas proteínas ácido-solubles de la espora (SASPs). Estas proteínas se unen estrechamente al ADN en el núcleo de la espora y la protegen de daños potenciales por la radiación UV, la desecación y agentes químicos, debido a esto se necesitaría aumentar la temperatura y

tiempo de exposición con los sanitizantes para que pueda penetrar a la membrana citoplasmática de las bacterias.

Según Fuster en 2006, los sanitizante a concentraciones subletales o a tiempos insuficientes provocan cambios en las estructuras celulares que conllevan respuestas de tipo adaptativo. Por tanto, en la medida que el tratamiento de sanitización sea insuficiente en tiempo, o cuando la dosificación de los productos a emplear sea también insuficiente, por un intento de reducir costos o porque los equipos empleados no sean los adecuados, no sólo se dará una reducción en la eficacia del sanitizante, sino que además se facilitará la adaptación de los microorganismos.

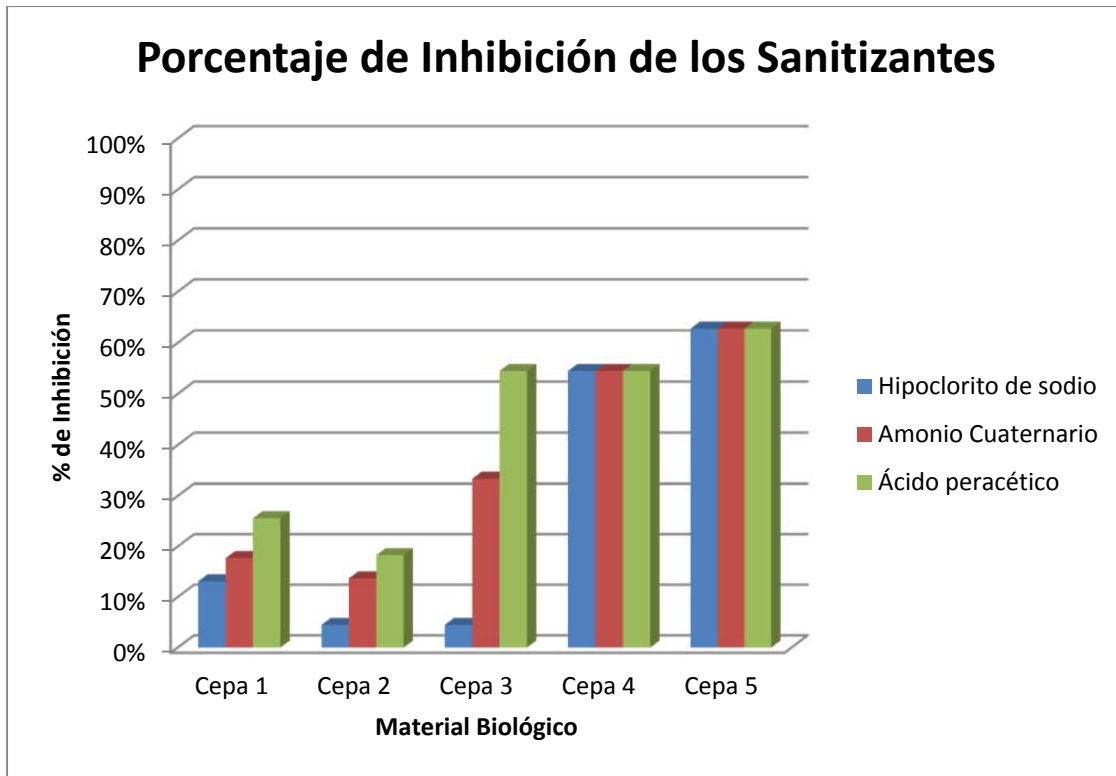
Tabla 10. Efecto antibacteriano del sanitizante a base de ácido peracético

Cepa	Concentración inicial (log)de bacteria	Reducción logarítmica por el sanitizante (media)	% de inhibición	*Reactivación de la cepa después de la neutralización
1	6.55	4.87	25.6	-
2	6.60	5.39	18.3	-
3	6.60	5.39	54.5	-
4	6.60	3.0	54.5	-
5	8.07	3.0	62.8	-

+ Bacteriostático  
- Bactericida

\*Se reactivaron las diluciones donde la bacteria no presentó crecimiento al sembrarse en medio de cultivo con Agar Casoy a 37°C/24 hrs. Para las cepas 1 la dilución fue 10<sup>4</sup>, para la cepa 2 y 3 la dilución fue 10<sup>5</sup>ufc y para las cepas 4 y 5 fue 10<sup>3</sup>ufc.

En la gráfica 5 se muestra el comportamiento que tuvieron los tres sanitizantes evaluados frente a las cinco cepas, según Gálan en 2003, los sanitizantes químicos de acuerdo a su actividad se clasifican por niveles, el ácido peracético está considerado en la sanitización de alto nivel donde se destruyen o eliminan todos los microorganismos, el hipoclorito de sodio está considerado en la sanitización de nivel intermedia, donde se inactivan micobacterias, bacterias vegetativas y la mayoría de los virus y hongos, pero no destruyen las esporas bacterianas y el amonio cuaternario está considerado en la sanitización de bajo nivel donde se inhiben o destruyen la mayoría de las bacterias en estado vegetativo, algunos hongos y virus, no elimina esporas bacterianas.

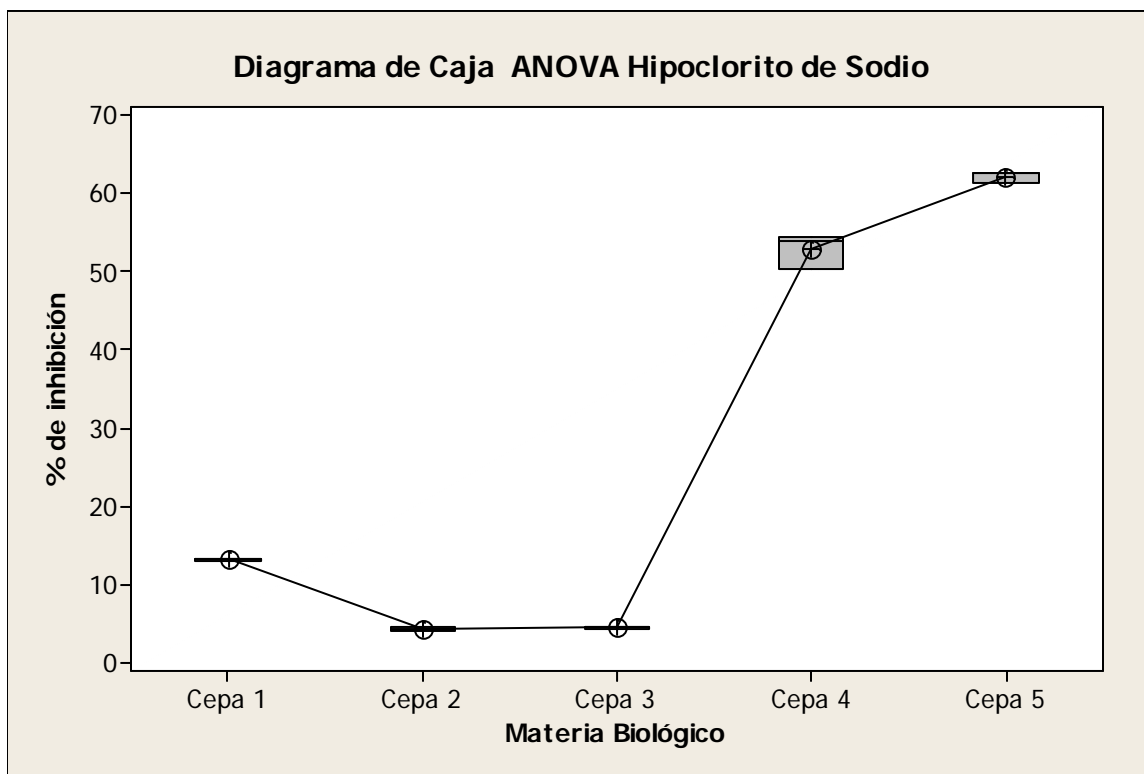


Gráfica 5. Comportamiento de los sanitizantes a base de hipoclorito de sodio, amonio cuaternario y ácido peracético frente a la inhibición del crecimiento de bacterias productoras de biopelículas

Se realizó un análisis de varianza ANOVA con un intervalo de confianza del 95%, con los valores del porcentaje de inhibición de los tres sanitizantes con respecto a las cinco cepas para conocer si había o no diferencia significativa entre ellas (ver gráfica 6, 7 y 8). Como se aprecia en las gráficas no hay diferencia significativa entre la cepa 1 y la cepa 2 para los tres sanitizantes esto podría deberse a que ambas cepas pertenecen al mismo género; en la gráfica 6 se observa la interacción entre el sanitizante a base de hipoclorito de sodio y las cinco cepas, entre las cepas 1, 2 y 3 no hubo diferencia significativa entre sus medias sin embargo si existe diferencia significativa con respecto a las cepas 4 y 5 lo que corresponde con los resultados experimentales al obtenerse mayores porcentajes de inhibición lo que comprueba el efecto biocida que tuvo el sanitizante sobre las bacterias no esporuladas. En la gráfica 7 se presenta la interacción entre el sanitizante a base de sales de amonio cuaternario y las cinco cepas, se observa que hay diferencia significativa entre la cepa 3 con respecto a las cinco cepas y que no hay diferencia significativa entre las cepas 4 y 5. En la gráfica 8 se presenta la interacción del sanitizante a base de ácido peracético con respecto a las cinco cepas, se observa que entre las cepas 1 y 2 con respecto a la cepa 3 existe diferencia significativa, con lo cual se podría suponer que el ácido peracético tuvo mayor efecto sobre las bacterias que estaban en forma vegetativa y que no todas se encontraban en forma esporulada ya que se obtuvieron porcentajes más altos de inhibición, pero si comparamos los resultados obtenidos entre la cepa 4 y 5 que son bacterias no esporuladas donde no se encontró diferencia significativa entre sus medias se puede concluir que los

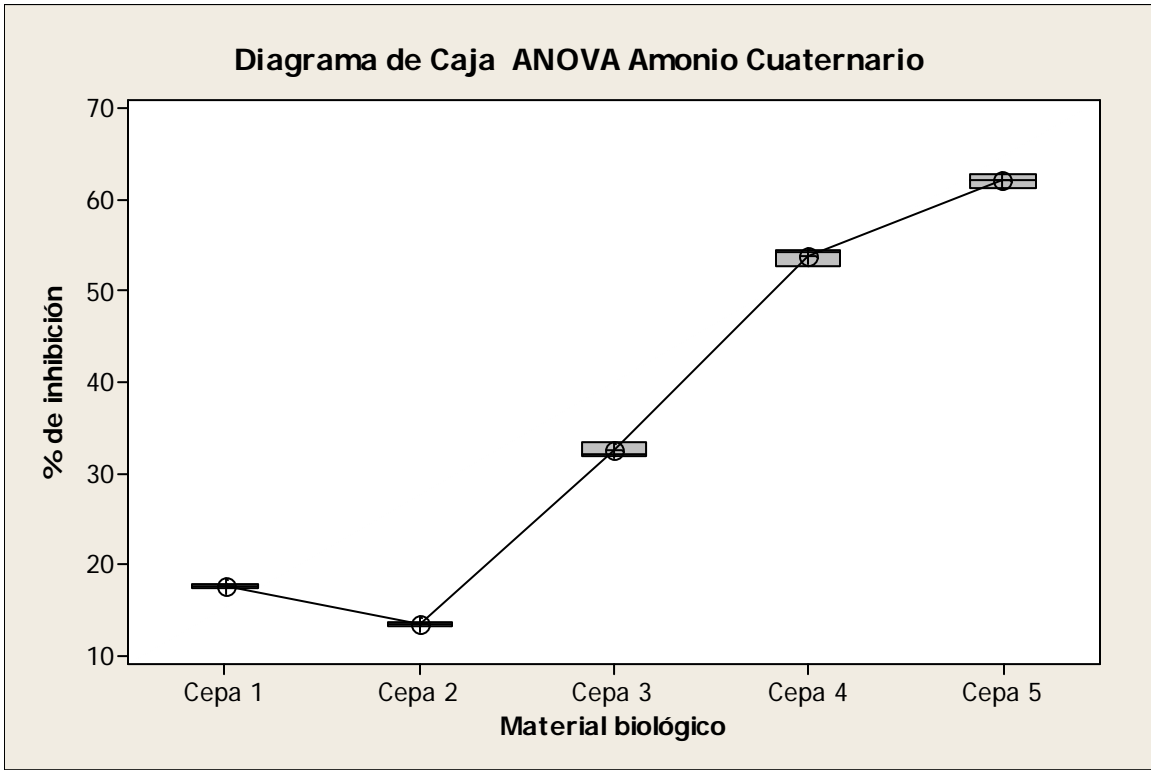
tres sanitizantes presentan en mismo comportamiento frente a las cepas evaluadas. Así mismo se obtuvo una p-valor prácticamente nulo (0.000) en los tres casos lo cual indica que existen diferencias significativas sobre el efecto del sanitizante con respecto a cada cepa.

El objetivo de los agentes químicos es disminuir el número de microorganismos, de forma que los que sobrevivan (esporas o formas vegetativas) no influyan en la calidad microbiológica de las muestras y productos que contactan con las superficies y además de esto serán necesarios rigurosos procedimientos de limpieza que faciliten la acción de estos sanitizantes.

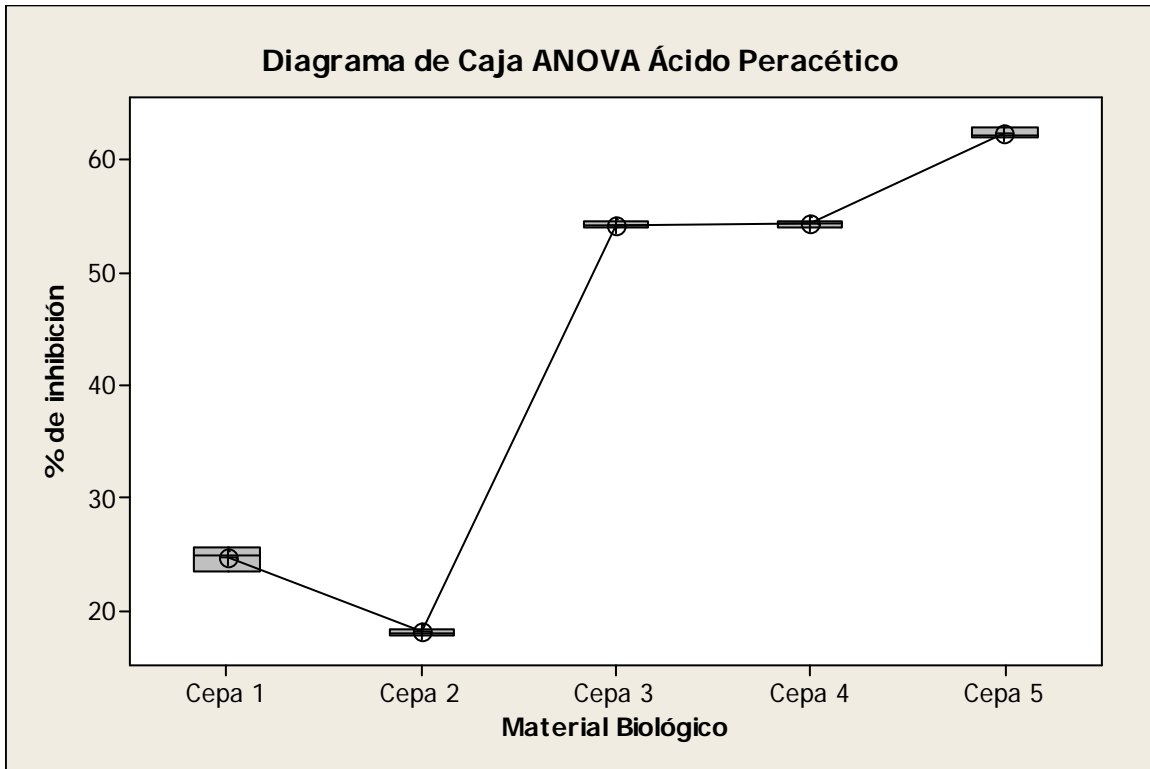


Gráfica 6. Análisis Estadístico ANOVA Hipoclorito de Sodio





Gráfica 7. Análisis Estadístico ANOVA Amonio Cuaternario



Gráfica 8. Análisis Estadístico ANOVA Ácido Peracético

### 5.3 Detección de estructuras bacterianas por Microscopía electrónica de transmisión

El estudio de las biopelículas bacterianas está relacionado directamente con la actividad fisiológica de los individuos que conforman esta estructura ya que a su vez comprende el estudio de las funciones realizadas por los microorganismos. La función fundamental de todo ser vivo es el crecimiento, esto es aumentar en forma ordenada el número y la masa de todos sus componentes celulares, tales como pared celular, membrana citoplasmática, ácidos nucleicos (ADN y ARN), flagelos, fimbrias, entre otros (Cruz & Hermosilla, 2009). En su defecto, también sirve para determinar las características estructurales o determinar indirectamente la capacidad de formación “in vitro” en algunos materiales como vidrio, acero inoxidable, plásticos de poliestireno, etc.

Las técnicas de microscopía se pueden emplear para conocer las características estructurales de las biopelículas bacterianas ya que se puede aumentar su imagen hasta 10,000 veces, lo que permite visualizar la formas y agrupamientos bacterianos, los cuales contribuyen a que se conozca la heterogeneidad de la población y consecuentemente se estudien las funciones que desempeñan los microorganismos implicados (Harrison et al., 2006). Además, permite el aislamiento de grupos pequeños de células a partir de la biopelícula.

En la figura 47, se presentan las fotografías tomadas del microscopio electrónico de transmisión a 10,000 aumentos que pertenecen a tres cepas clasificadas como “baja” en la formación de biopelículas; se observa en la fotografías 47a, 47b, y 47c que después de la unión inicial, la célula empieza a crecer y a esparcirse sobre la superficie. Según Harrison et al. en 2006, cuando las bacterias planctónicas que nadan libremente en suspensión se adsorben sobre una superficie biótica o inerte, presentan una asociación leve o débil al sustrato, la adsorción desencadena los primeros cambios fisiológicos que conducen al estilo biológico de la biopelícula.

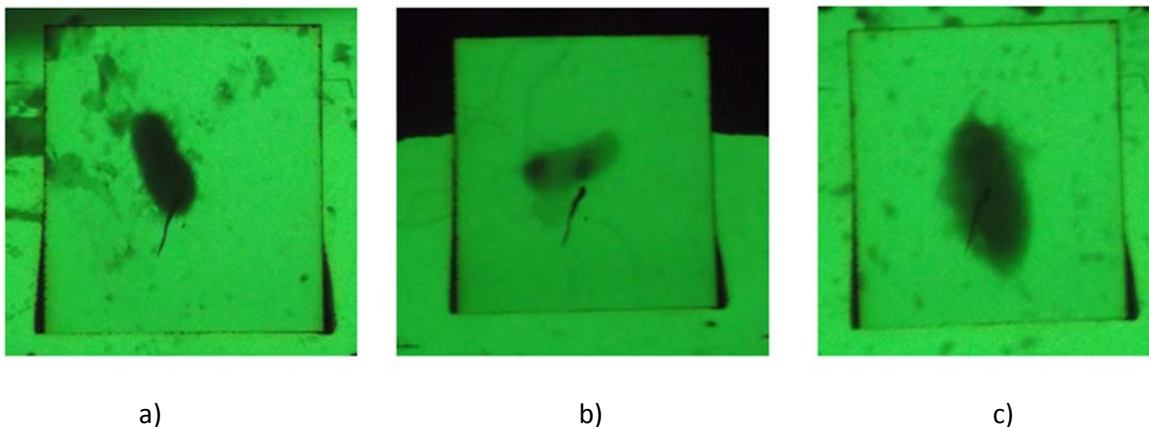


Figura 47. Fotografías pertenecen a una cepa clasificada como “baja formación de biopelícula”

En la figura 48, se muestran las fotografías que pertenecen a tres cepas clasificadas como “moderada” en la formación de biopelículas, como se observa en las fotografías 48a, 48b y 48c. Las bacterias tienen la capacidad de formar polisacárido y adherir a más bacterias. El proceso de adhesión se da en dos fases: una reversible, seguida de una segunda fase irreversible, según Sánchez en 2003. La fase irreversible se da por el anclaje de los apéndices celulares y/o de la producción de polímeros extracelulares que estabilizan las colonias y protegen a las bacterias de las fluctuaciones del medio circulante.

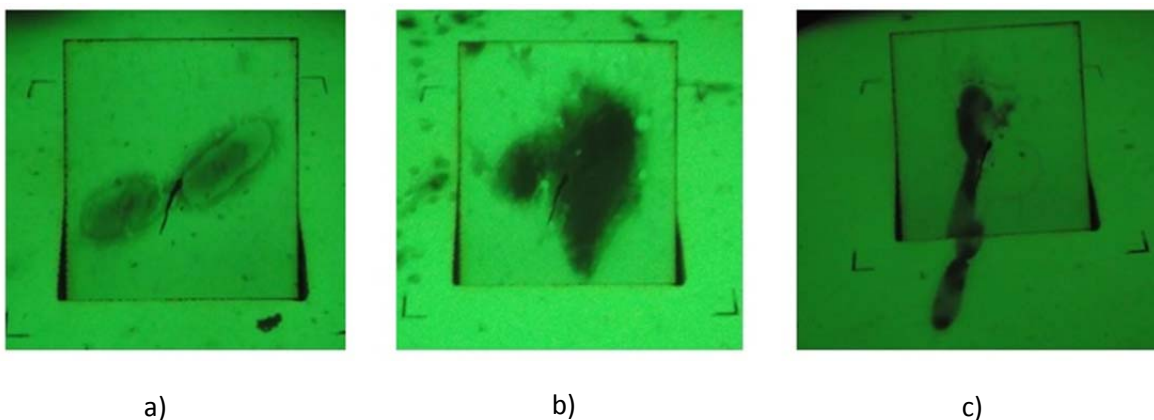


Figura 48. Fotografías tomadas a una cepa clasificada como “moderada formación de biopelícula”

En la figura 49, se muestran las fotografías de diferentes colonizaciones bacterianas de tres cepas clasificadas como “alta” en la formación de biopelículas. Según Fuster en 2006, si las condiciones son adecuadas para un crecimiento suficiente de la biopelícula, por naturaleza, desarrollará una estructura organizada (depende de factores como la disponibilidad de nutrientes, la diversidad microbiana de la comunidad, la disponibilidad de agua y el transporte celular) como se observa en las fotografías 49a, 49b y 49c. A este proceso se le llama maduración. Una biopelícula madura puede consistir en una simple capa de células, en un polímero extracelular poroso o en múltiples capas de microcolonias sueltas o en estructuras por sustancias poliméricas extracelulares. La madurez de la biopelícula es directamente proporcional a su capacidad de resistencia a ser eliminada (Encinas & Barbero, 2010) ya que se adapta a los nutrientes, al oxígeno y los cambios poblacionales, se ha demostrado que la madurez de la biopelícula afecta la eficacia del sanitizante por lo que es recomendable la rotación entre distintos sanitizantes que no estén relacionados o la aplicación del sanitizante a concentraciones más altas.

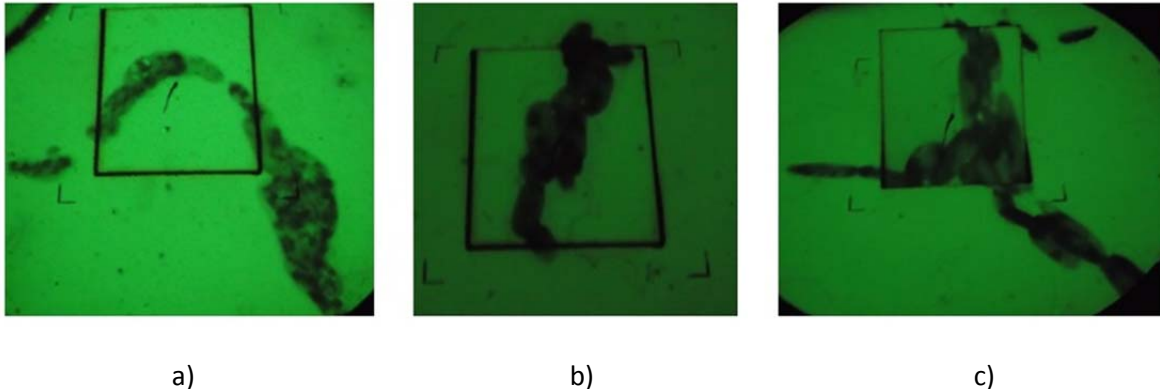


Figura 49. Fotografías tomadas a una cepa clasificada como “alta formación de biopelícula”

En la figura 50, se muestran las fotografías de biopelículas formadas “*in vitro*” por las cinco cepas evaluadas en este proyecto, los resultados reflejan la interacción que tuvieron al formar biopelículas de estructura estable y organizada. Las diferentes bacterias contenidas en la biopelícula responden a las condiciones de sus microambientes específicos, presentando diferentes patrones de crecimiento. La cooperación fisiológica es el factor principal que ayuda a conformar la estructura, haciendo de las biopelículas maduras adheridas a las superficies, comunidades microbianas muy eficientes (Costerton et al., 1995) ya que se incrementa la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento, se facilita el aprovechamiento de agua, reduciendo la posibilidad de deshidratación y dificulta la acción de los agentes antimicrobianos.

En las fotografías se observan diferentes formas de la colonización de las bacterias existentes dentro de las biopelículas. Socransky & Haffajee, en 2002 observaron que las biopelículas son modeladas por fuerzas externas debido al paso de fluidos sobre las mismas, por lo que con una fuerza externa baja, las colonias son morfológicamente como torres o en forma de hongo, con grupos celulares circulares separados por vacíos; mientras que con la aplicación de una fuerza externa alta, las colonias son elongadas en la dirección del flujo y capaces de realizar oscilación rápida, teniendo así la ventaja del afluente, lo que puede incrementar el transporte de solutos a través de la biopelícula. De esta manera la estructura final resultante va a estar influenciada por determinadas condiciones como las propiedades de la superficie y la interfase, la disponibilidad de nutrientes y la composición microbiana de la población.

Según Chmielewski y Frank en 2003 indican que las biopelículas formadas por varias especies diferentes son más gruesas y estables frente al estrés ambiental que las biopelículas monoespecíficas. La estabilización de las biopelículas mixtas posiblemente se deba a la producción de diferentes sustancias poliméricas extracelulares resultantes de la actividad de diferentes especies de microorganismos. Además, se puede observar el sinergismo que hubo entre las cinco cepas, esto se explica debido a la tendencia de las bacterias a colonizar superficies, pues induce las relaciones simbióticas, por ejemplo un aumento en el acceso a los nutrientes. Cuando un nutriente es requerido por un microorganismo, generalmente otro no lo puede usar, pero sí puede existir intercambio de

nutrientes permitiendo la supervivencia de los microorganismos dentro de las biopelículas. Esto sucede cuando las biopelículas son formadas por comunidades de diferentes especies que son complementarias, ya que la degradación de un compuesto por un microorganismo permite que otro lo pueda utilizar como fuente de alimento (Costerton et al., 2005).

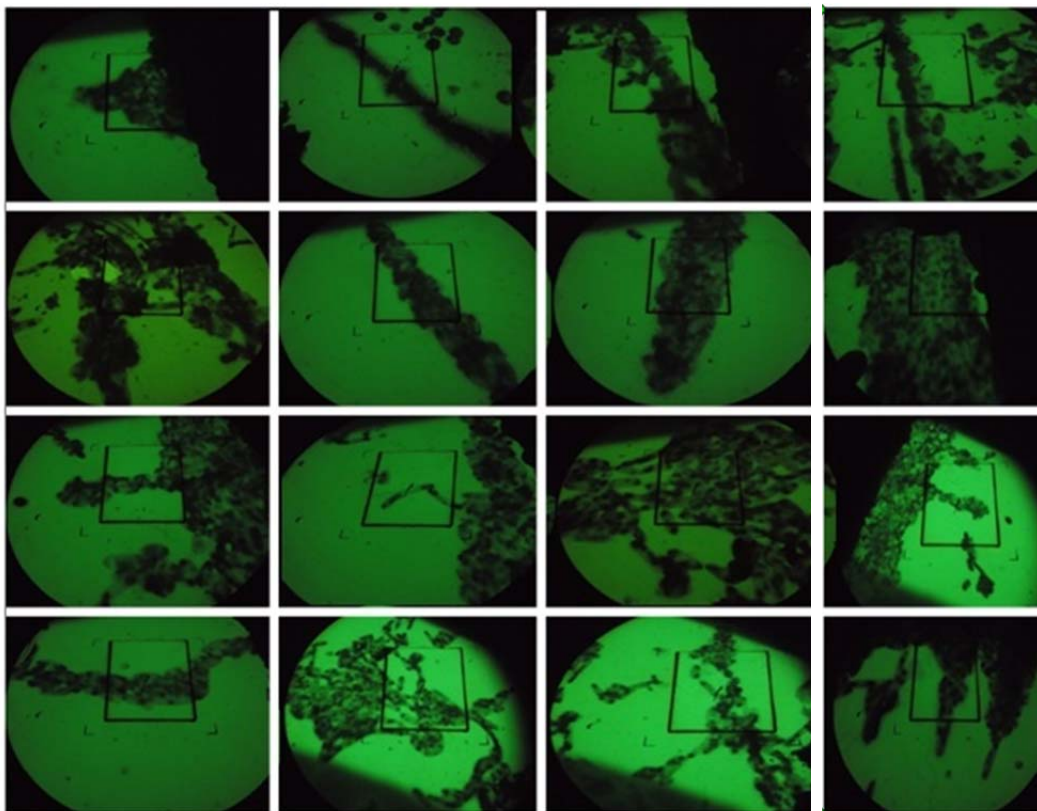


Figura 50. Fotografías de la formación de biopelículas de las cinco cepas en estudio

Los resultados obtenidos también muestran que las bacterias se multiplican y adhieren en las superficies inertes de manera irreversible por medio de fimbrias y sustancias poliméricas extracelulares, así como también por flagelos, que les proporcionan movilidad a las bacterias y además están relacionados con otras funciones biológicas de las bacterias como la virulencia; estas estructuras se observan en la figura 51. Las fimbrias y flagelos contribuyen dando hidrofobicidad a la superficie celular ya que muchas de ellas contienen aminoácidos hidrófobos. Por otra parte se sabe que las células inmóviles no recolonizan las áreas de un sustrato como lo hacen las células móviles, resultando más lenta la formación de la biopelícula por las células inmóviles. Los flagelos aparentemente tienen un papel importante en las primeras etapas de la adhesión bacteriana al vencer las fuerzas de repulsión asociadas con el sustrato (Rodney & Costerton, 2002). Estas estructuras favorecieron el anclaje inicial de las cinco cepas de manera irreversible a la superficie permitiendo la formación de la biopelícula.

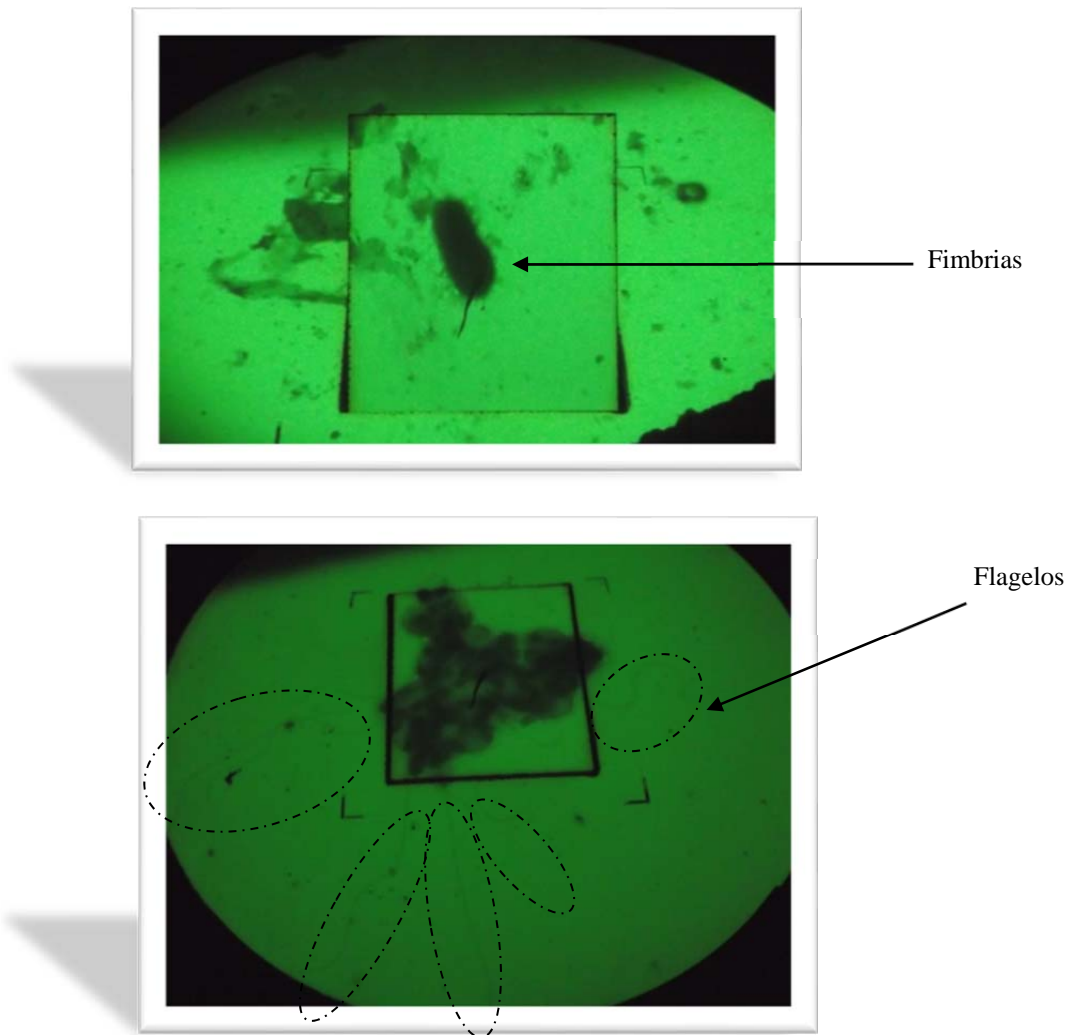


Figura 51. Apéndices bacterianos

En la figura 52, se observan las fotografías de biopelículas formadas *“in vitro”* por una bacteria clasificada como *“alta”* en la formación de biopelículas con dos cepas bacterianas clasificadas como *“baja”*. Los microorganismos producen cantidades diferentes de polímeros extracelulares, algunos tienen la capacidad de formar más polisacáridos y con ello adherir a las bacterias, lo que explica la formación de la biopelícula y la interacción entre estas cepas. Cuando las colonias comienzan a rodearse de la matriz de EPS, el proceso de adhesión se vuelve irreversible y de allí parte la colonia para formar una biopelícula estructurada. Actualmente, la composición de la matriz de exopolímeros no está perfectamente definida. Aunque algunos autores han demostrado que las EPS son uno de los componentes principales que interviene en el mecanismo de adhesión de los microorganismos (Goncalves, 2002). Con lo anterior se puede suponer que la cepa clasificada como *“alta”* tiene mayor capacidad de formar polisacáridos y con ello adherir a las dos cepas clasificadas como *“baja”*.

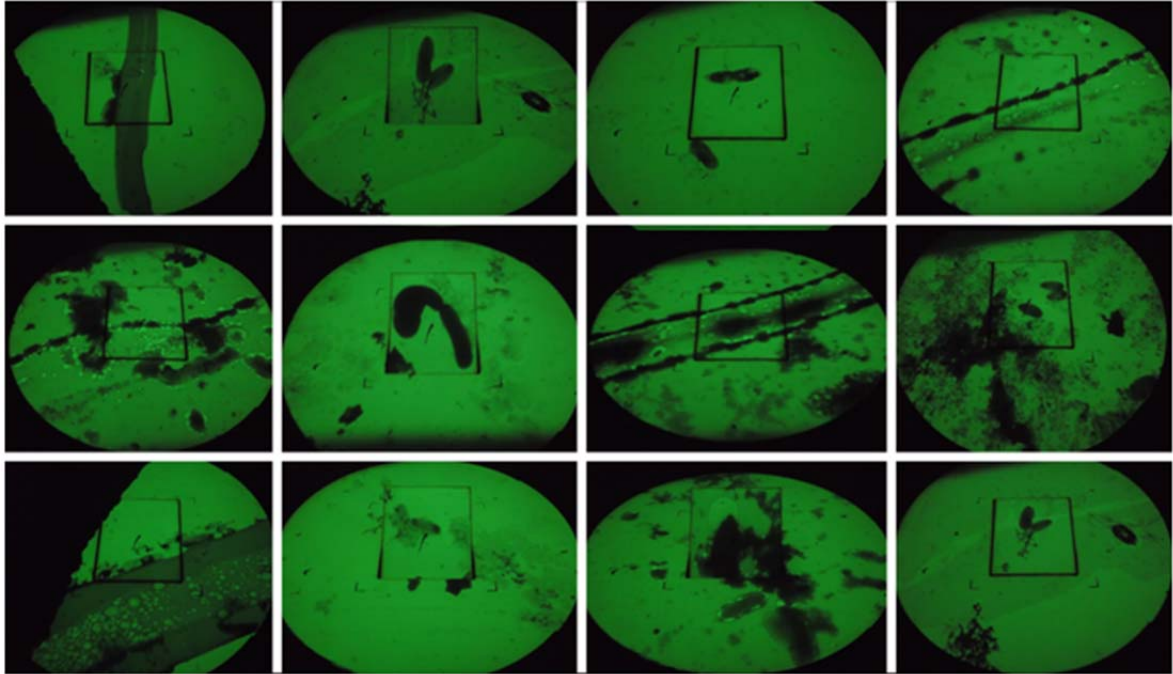


Figura 52. Fotografías de la interacción entre una cepa con “alta” capacidad para formar biopelículas con dos cepas con “baja” capacidad para formar biopelículas

## CONCLUSIONES

1. Se consiguió determinar el tipo de microorganismos que se encuentran con mayor incidencia en la planta procesadora de cárnicos, los cuales pertenecieron al género *Bacillus*, *Comamonas spp.* y *Corynebacterium spp.*
2. Los sanitizantes usados a las condiciones de concentración y tiempo recomendadas por el fabricante no presentan acción bactericida frente a esporas bacterianas.
3. Los neutralizantes empleados para cada sanitizante inactivan adecuadamente a los sanitizantes.
4. En las condiciones evaluadas, se obtuvo un mayor porcentaje de inhibición del ácido peracético a 300 ppm para todas las cepas.
5. El sanitizante que presentó un menor porcentaje de inhibición fue el hipoclorito de sodio frente a bacterias con capacidad de formar esporas siendo este del 4.55%.
6. Los sanitizantes usados a las condiciones de concentración y tiempo recomendadas por el fabricante, presenta “*in vitro*” una reducción de 3 y 5 ciclos logarítmicos frente a bacterias del género *Comamonasspp.* y *Corynebacterium spp.* no esporuladas formadoras de biopelículas.
7. De acuerdo al análisis estadístico los tres sanitizantes no presentan diferencia significativa con bacterias no esporuladas a la concentración recomendada por el fabricante.
8. La técnica de tinción negativa en microscopia electrónica presentó alta efectividad para detectar estructuras relacionadas con la formación de biopelículas.

## RECOMENDACIONES

1. Se recomienda evaluar más concentraciones y tiempos de contacto con el fin de conocer su efecto sobre los microorganismos y comprobar si se alcanza un mayor porcentaje de inhibición.
2. Es aconsejable evaluar los sanitizantes sobre otros microorganismos patógenos que pueden contaminar las materias primas y productos de la planta de procesados cárnicos.
3. Es recomendable y viable colocar una mayor cantidad de barreras físicas tanto en la ventilación como en las entradas de la planta para así evitar la contaminación cruzada de las áreas de trabajo y que contactan con los alimentos.
4. Comprobar siempre la eficacia antibacteriana de los sanitizantes antes de aplicarlos a gran escala en la planta.
5. Verificar las condiciones higiénico-sanitarias de las áreas de la planta, así como de los equipos, utensilios y superficies que contactan con los alimentos.
6. Realizar una correcta limpieza de las áreas para evitar la inactivación de los sanitizantes por restos orgánicos.
7. Se recomienda rotar los productos sanitizantes con el fin de evitar la adaptación de los microorganismos.
8. Probar el sanitizante amonio cuaternario a temperaturas altas para conocer su efecto sobre las esporas ya que por ser biodegradable sería una opción adecuada.
9. Probar los sanitizantes a temperaturas superiores a la ambiental con tiempos de exposición prolongados para verificar si tienen efecto sobre las esporas bacterianas.



## ANEXOS

### ANEXO 1

#### FICHA TÉCNICA DEL SANITIZANTE A BASE DE HIPOCLORITO DE SODIO

**EUROCHLOR** es un saneador para equipos en plantas procesadoras de alimentos, bebidas y equipos de recirculación de agua. Aplicable en industrias cerveceras, refresqueras y bebidas en general, lecheras y sus derivados, enlatadoras, empacadoras, pesqueras y plantas de alimentos.

Cuadro 1. Características del Sanitizante a base de Hipoclorito de Sodio

Característica	Ventajas	Beneficios
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Germicida de amplio espectro</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Efectivo contra una amplia variedad de bacterias incluyendo esporas.</li> <li>• Sanea en una sola operación, eficazmente, en todas las superficies de contacto.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reduce el riesgo de contaminaciones.</li> <li>• Incremento en la calidad de saneamiento de los equipos.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Con estabilizadores de concentración de cloro.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se alarga el tiempo de vida útil ó de anaquel.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Menos mermas.</li> <li>• Saneamientos más seguros.</li> <li>• Resultados más consistentes.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Concentración fácilmente detectable.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mejor control de la cantidad de producto.</li> <li>• Superficies de equipos más protegidos de un ataque corrosivo.</li> <li>• Se protege al usuario de irritaciones por manejar exceso de producto.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No se desperdicia producto, se gasta solo lo necesario.</li> <li>• Equipos y accesorios más durables.</li> <li>• Mayor seguridad personal para los usuarios.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Seguro en su uso.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• En las concentraciones recomendadas, los residuos son fácilmente enjuagables, no afectando con esto sabores, colores u olores.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mayor seguridad para el producto en proceso.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Versátil en su aplicación.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Efectivo en todo tipo de desinfección sobre superficies, pisos, paredes, etc.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ahorro en tiempo.</li> <li>• Minimiza inventarios.</li> <li>• Ahorro en la compra de productos adicionales.</li> </ul>

*EUROCHEM, International Corporation de México, S.A. de C.V. Ficha técnica de los sanitizantes, 2012*

#### **Cumplimiento**

**EUROCHLOR** cumple con las especificaciones marcadas por la FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, según la parte 178.1010 subparteb (1), (No debe exceder de 200 ppm de cloro disponible) de acuerdo a los C.F.R. de los E.U.A., título 21.

### **Propiedades Fisicoquímicas**

- Apariencia Líquido transparente
- Color Amarillo verdoso
- Olor Cloro
- pH (1% H<sub>2</sub>O) 11-12
- Cloro disponible 9% mínimo
- Densidad 1.2
- Espuma Nula

Nota: Las especificaciones aquí descritas no son las especificaciones del producto.

### **Recomendaciones**

#### ***DESINFECCIÓN:***

- Después de una buena limpieza y enjuague, sanee con 400 ppm de cloro disponible para las superficies no porosas.
- Para el saneamiento de superficies porosas use 800 ppm de cloro disponible.

Déjelo actuar por lo menos durante 5 minutos. Las superficies que hayan sido saneadas con una solución de más de 200 ppm. de cloro disponible, deben ser enjuagadas, antes de reutilizarlas, con agua potable.

### **Almacenamiento**

Mantenga los envases bien cerrados. Almacénelo en un lugar fresco, seco y bajo techo, alejado de alimentos y sus derivados. Circule inventarios para asegurar que el producto no se almacene por más de 3 meses.

No se deje al alcance de los niños.

### **Precauciones**

Causa lesiones en ojos e irritación severa en la piel; evite su contacto. Dañino si es ingerido. Evite su inhalación. Producto corrosivo; no se mezcle con otros químicos o suciedades pesadas.

### **Primeros auxilios**

- En caso de inhalación: Se emplea como antídoto inhalaciones de alcohol o solución amoniacal.
- En caso de ingestión: No provoque el vómito. Beba leche o leche de magnesia, claras de huevo o agua en abundancia.
- En caso de contacto con piel y ojos: Lávese con agua en abundancia durante 15 minutos.

## FICHA TÉCNICA DEL SANITIZANTE A BASE DE AMONIO CUATERNARIO

**MICRODYNA** es un algicida y germicida recomendado para evitar el desarrollo de microorganismos en las industrias cerveceras, embotelladoras de gaseosas y otras bebidas, enlatadoras, lecheras, industrias avícolas, ganaderas y otras donde se procesan alimentos.

Cuadro 2. Características de Sanitizante a base de Amonio Cuaternario

Características	Ventajas	Beneficios
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Poderoso sanitizante, germicida y algicida de amplio espectro.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Máximo poder germicida aún contra bacterias Gram(-).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se obtienen equipos mejor saneados.</li> <li>• Mejor calidad del producto final.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Producto concentrado.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Capacidad germicida alta, aun con menos producto.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ahorro económico por consumo de producto.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta estabilidad.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Buena actividad a temperaturas altas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proceso de limpieza con mejor calidad.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Elimina malos olores.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se elimina el efecto de la degradación orgánica.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Equipos microbiológicamente confiables en el proceso productivo.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• No tóxico, ni irritante.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Producto seguro: no produce vapores, ni olores peligrosos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Seguridad total para el usuario.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• No corrosivo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Producto confiable en su uso.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Seguridad para ser usado en todas las superficies lavables.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Producto de espuma controlada.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A diferencia de otros productos de base cuaternario, se recomienda para ser usado en sistemas C.I.P. sin tenerse espuma objetable.</li> <li>• No provoca cavitación en equipos de bombeo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta eficiencia en el proceso de sanitización.</li> <li>• Confianza en los resultados del proceso de limpieza.</li> <li>• Equipos de bombeo con operación adecuada.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Funciona en aguas de dureza alta (hasta + 250 ppm.).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Su actividad microbicida no es afectada en aguas duras.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Resultados confiables aun sin tener tratamiento de suavizado en el agua.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biodegradable.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cumple con las normas oficiales de biodegradabilidad.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Un problema menos con las reglamentaciones oficiales.</li> </ul>

*EUROCHEM, International Corporation de México, S.A. de C.V. Ficha técnica de los sanitizantes, 2012*

### Cumplimiento

Este producto cumple con las especificaciones marcadas por la FOOD AND DRUG ADMINISTRATION en los C.F.R. de los E.U.A, según las partes 178.1010 b(9), (11), (17) y (18).

### Propiedades Físicoquímicas

- Apariencia Líquido transparente
- Color Ligeramente amarillo
- Olor Característico
- Solubilidad 100% en agua
- Espuma en aplicación Moderada

- pH (1% H<sub>2</sub>O) 9.0
- Densidad 1 + 0.03 gr./ml
- Humectancia Excelente
- Activo germicida 8% Mínimo

Nota: Las propiedades aquí mostradas no son las especificaciones del producto.

Cuadro 3. Recomendaciones

Concentraciones de activo <i>MICRODYNA</i>	Dosis	Aplicación
200 ppm.	2 mL/L	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Saneamiento de equipo en plantas de alimentos, por inmersión, aspersión y/o recirculación, previa limpieza y enjuague.</li> </ul>
400 ppm.	4 mL/L	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desinfección de paredes, pisos, lavabos, baños, etc.</li> </ul>
800 ppm.	8 mL/L	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desinfección de superficies porosas como tajos de corte, transportadores de hule en empacadoras y enlatadoras, etc</li> <li>• Deodorizar botes de basura y áreas inaccesibles en plantas alimenticias, por atomización ó nebulización, para el control de malos olores.</li> </ul>

*EUROCHEM, International Corporation de México, S.A. de C.V. Ficha técnica de los sanitizantes, 2012*

### Almacenamiento

Almacénelo en un lugar fresco, seco y bajo techo, lejos de alimentos y sus ingredientes. Circule inventarios para asegurar que el producto no se almacene por más de un año.

### Precauciones

Use guantes y lentes o mascarilla de seguridad. Al hacer las adiciones, hágalo despacio para evitar salpicaduras. No se mezcle con detergentes aniónicos.

### Primeros auxilios

- En caso de ingestión: Beba leche, claras de huevo, o una solución suave de jabón.
- En caso de contacto con ojos y piel: Lave con agua en abundancia durante 10 minutos.

## FICHA TÉCNICA DEL SANITIZANTE A BASE DE ÁCIDO PERACÉTICO

**PEROXEN** es un microbicida de amplio espectro, de acción inmediata y temporal, para aplicaciones a bajas temperaturas. Para uso en la industria cervecera, láctea, de gaseosas y cualquier planta procesadora de alimentos y bebidas.

Cuadro 4. Características del Sanitizante a base de Ácido Peracético

Características	Ventajas	Beneficios
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Microbicida que opera a temperaturas de hasta 4 ° C.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sanitización en “frío”, sin involucrar equipos generadores de vapor o agua caliente.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ahorro económico por consumo de energéticos.</li> <li>• Ahorro económico por ausencia de mantenimiento a equipos generadores de vapor.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Microbicida de amplio espectro.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Su acción microbicida incluye esporas y virus.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta seguridad microbiológica en los equipos saneados.</li> <li>• Proceso de producción con mayor calidad.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Producto de alta concentración.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acción inmediata.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ahorro económico por consumo de producto.</li> <li>• Inventarios bajos en su almacén.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• No produce espuma.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se puede emplear en procesos por recirculación o por sistema CIP.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Equipos de bombeo con operación adecuada, sin cavitaciones, y mayor tiempo de vida.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• De acción sinérgica.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Por su compatibilidad con soluciones ácidas típicas de limpieza, puede ser empleado como aditivo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proceso de limpieza ácida con mayor efectividad.</li> <li>• Equipos más limpios.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Seguro en su uso.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Producto no tóxico.</li> <li>• Aplicable sobre todas las superficies encontradas en los equipos de proceso de alimentos: Acero inoxidable, aluminio, plásticos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mayor seguridad personal para usuario.</li> <li>• Ahorro por compra de productos adicionales.</li> <li>• Minimización de inventarios.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Buena estabilidad a temperaturas de 20 a -30 °C.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se puede almacenar hasta 6 meses bajo estas condiciones de temperatura.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Menos mermas de producto.</li> <li>• Saneamientos confiables.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biodegradable.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cumple con las normas oficiales de biodegradabilidad.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Un problema menos con las regularizaciones ambientales oficiales.</li> </ul>

*EUROCHEM, International Corporation de México, S.A. de C.V. Ficha técnica de los sanitizantes, 2012*

### Cumplimiento

**PEROXEN** cumple con las especificaciones marcadas por la FOOD AND DRUG ADMINISTRATION de los E.U.A. según la parte 178.1010 b (30) del Código de Regulaciones Federales, Título 21.

### **Propiedades Fisicoquímicas**

- Apariencia Líquido transparente
- Color Incoloro
- Olor Característico, irritante
- Solubilidad 100 % en agua
- pH 1 % H<sub>2</sub>O 2.5 - 3.0
- pH Directo 0.5 - 1.3
- Espuma No produce
- Densidad (20°C) 1.11 - 1.13 gr./ ml.
- Acidez 2.5 - 5%

Nota: Las propiedades aquí mostradas no son las especificaciones del producto.

### **Recomendaciones**

Para la correcta aplicación del PEROXEN se debe tomar en consideración la temperatura disponible de las soluciones y los reportes microbiológicos, tanto cualitativos como cuantitativos.

Concentración: 0.05 - 3.0 %

Temperatura: 5 a 30 °C

Tiempo: 5 -15 minutos

### **Almacenamiento**

Almacénese en un lugar fresco, seco, bajo techo, lejos de la luz solar, alimentos y sus ingredientes. Circule inventarios, no se almacene por más de 6 meses. Mantenga en el envase bien tapado. No se deje al alcance de los niños.

### **Precauciones**

Veneno, puede ocasionar la muerte si es ingerido. Producto ácido, puede ocasionar irritaciones en la piel y lesiones en los ojos. Utilice guantes y lentes o careta de seguridad para su manejo. Evite contacto con piel y ojos. Evite su ingestión. No se mezcle con productos alcalinos o neutros. En caso de trasvasar, lave los recipientes perfectamente con detergentes ácidos.

### **Primeros auxilios**

- En caso de contacto con ojos: Lave con agua en abundancia durante 15 minutos.
- En caso de contacto con piel: Lave el área afectada con agua en abundancia durante 15 minutos y después con una solución de jabón, enjuague con agua.
- En caso de ingestión: Provoque el vómito y beba grandes cantidades de agua o leche, seguido de aceite vegetal.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Aldana, L., & Sarassa, S. (1999). Efecto de desinfectantes y antimicrobianos naturales frente a cepas de *Listeria monocytogenes*. Pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Bogotá, Colombia.
2. Baldry, M. G., & French, M. S. (1989.). Disinfection of sewage effluent with peracetic acid. *Water Sci. Technol.*, 203-206.
3. Baldry, M., French, M., & Slater, D. (1991). The activity of peracetic acid on sewage indicator bacteria and viruses. *Water Sci. Technol.*, 353-357.
4. Barreiro, J. (1992). Higiene y Saneamiento en el Procesamiento de Alimentos. Universidad Simón Bolívar, Baruta.
5. Basurto, Z. A., & Martínez, M. M. (2006). Determinación de los flujos de producción del taller de productos cárnicos de la posta veterinaria. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacan.
6. Belletti, N., Grébol, N., Puxan, A., & Fargas, C. (2010). Estudio y diseño de un sistema experto para la higienización de cuchillos. *Eurocarne*, 185, 103-110.
7. Belloso, A. D., Blanco, G. C., Caldés, C. A., Gallego, P. E. (2010). Agentes químicos en el ámbito sanitario. Escuela nacional de medicina del trabajo (ENMT), 1-260.
8. Beraca, J. (2008). La cloración del agua: factores de desinfección adecuada. *Industria Avícola*, 1, 11-25.
9. Betancourth, M., Botero, J. E., & Rivera, S. P. (2004). Biopelículas: Una comunidad Microscópica en desarrollo. *Colombia Médica*, 35(3), 34-39.
10. Bishop, P. (1997). Biofilm structure and kinetics. *Water Science Technology*, 287-294.
11. Bloomfield, S. F., Arthur, M., Looney, E., Begun, K., & Patel, H. (1991). Comparative testing of disinfectant and antiseptic products using proposed European suspension testing methods. *Letters in Applied Microbiology*, 233-237.
12. Boulangé-Peterman, L. (1996). Processes of bioadhesion on stainless steel surfaces and cleanability: a review with special reference to the food industry. *Biofouling*, 275-300.
13. Carpentier, B., & Cert, O. (1993). Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal Appl. Bacteriology*, 499-511.

14. Castillo, C., Sosa, B y Scorza, J. (2004). Evaluación de la termorresistencia en metabolitos antifúngicos, producidos por esporulados del género *Bacillus*. *Rev. Soc. Ven. Microbiol*, 24 (2), 65-67.
15. Castrillón, R. L., Palma, R. A., & Padilla, D. M. (2010). Importancia de las biopelículas en la práctica médica. *Dermatología Rev Mex*, 54(1), 14-24.
16. Cerutti de G., Diez, O. A., Cárdenas, G. J., & Olivier, G. (2000). Control microbiológico de la industria azucarera: empleo de agentes de sanitización puros y en mezcla . *Ind. y Agric. de Tucumán*, 77(2), 19-27.
17. Chacón, J., Granadillo, R. K., García, C., & Martín, E. (2009). Identificación de biocatalizadores potenciales para la remediación de desechos petrolizados de la Faja Petrolífera del Orinoco. *Revista de Estudios Transdisciplinarios*, 1(2), 9-109.
18. Chmielewski, R., & Frank, J. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 22-32.
19. Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial Biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284, 1318-1322.
20. Costerton, J., Lewandowski, Z., Caldwell, D., Korber, D., & Lappin-Scott, H. (1995). Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 711-745.
21. Costerton, J.W., Montanaro, L., & Arciola C. R. (2005). Biofilm in implant infections: its production and regulation. *Int J Artf Organs*, 28 (11), 1062-8.
22. Cowan & Steel's. (1994). *Manual para la identificación de bacteria*(3ra ed.). España: Cambridge.
23. Cruz, M. A., & Hermosilla, G. D. (2009). Fisiología Bacteriana. *Biología de los Microorganismos*, 1, 15-24.
24. Denyer, S.P. (1995). Mechanisms of action of antibacterial biocides. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 36(4), 227-245.
25. Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Centers for Disease Control and Prevention*, 8(9), 881-890.
26. Encinas, S., & Barbero, G. (2010). Biofilm: Un nuevo concepto de enfermedad. *Endodoncia*, 28(4), 241-256.
27. Esaín, J. (2000). *Limpieza y desinfección en la industria alimentaria*. Zaragoza, España: Acribia.



28. EUROCHEM, (2012). International Corporation de México, S.A. de C.V. Ficha técnica de los sanitizantes.
29. Falsanisi, D., Gehr, R., Santoro, D., Dell'Erba, A., Notarnicola, M., & Liberti, L. (2006). Kinetics of PAA demand and its implications on disinfection of wastewaters. *Water Qual*, 398-409.
30. Forero V. A., & Piedrahita N. C. (2008). Análisis y evaluación de los procesos de limpieza manual de equipos de manufactura en una industria nutracéutica. Tesis de Microbiología Industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Florida.
31. Forsythe, S., & Hayes, P. (2002). *Higiene de los alimentos*. España: Acribia S.A.
32. Fuster, I. (2006). Importancia del control higiénico de las superficies alimentarias mediante técnicas rápidas y tradicionales para evitar y/o minimizar concentraciones cruzadas. Tesis de Doctorado dentro del programa en ciencias de los alimentos. Barcelona, España.
33. Fuster, V. N. (2004). *Los biofilms en la industria alimentaria*. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona.
34. Galán, A. L. (2003). Desarrollo de Métodos para Verificar la Eficacia Fungicida de Sustancias Desinfectantes. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España: Facultad de Veterinaria.
35. García, A. (1989). Programa de limpieza e higiene. *Alimentaria 2*, 29-50.
36. Garrett, T., Bhakoo, M., & Zhang, Z. (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Review Prog Nat Sci*, 1049-1056.
37. Gibson, H., Taylor, J., Hall, K., & Holah, J. (1999). Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 41-48.
38. Goldin, P. (2008). Aplicaciones de Limpieza: Sanitizar o desinfectar. *ISSA*, 1, 1-5.
39. Gómez, P. E. (2004). Evaluación comparativa entre dos sistemas de desinfección pre-operacional en una planta de faenado de bovinos. Tesis de Médico Veterinario, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
40. Goncalves, P. J. (2002). Relevancia y participación de las biopelículas microbianas. *Bóveda*, 1-11.
41. González, G. S., Ruíz, V. M., & Hernández, B. E. (2003). Guía de Microscopía Electrónica. México: UNAM.

42. Harrison, J. J., Turner, J. R., Lyriam, L. R., & Howard, C. (2006). Biopelículas: Los avances en el conocimiento de estas comunidades microbianas estándose encadenando una revolución que puede transformar la microbiología. *American Scientist Magazine*, 1, 77-84
43. Hayes, P. R. (2002). *Higiene de los Alimentos, Microbiología y HACCP*, (2da ed.). Zaragoza, España: Acribia S.A.
44. Hernández, N. J., & Rengel, A. (2002). Actividad antibacteriana de dos desinfectantes en función de la temperatura y el tiempo de contacto. *Ciencia*, 10(4), 332-339.
45. Herrera, L. F. (2007). Coloración Gram: Juego de soluciones para la coloración diferencial de GRAM para microscopía. *IHR Diagnóstica*, 8 (2), 1-2.
46. Herruzo, R. (2000). Desinfectantes españoles para el siglo XXI. *Anuales de la Real Academia*, 791-806.
47. Holah, J. (1995). Disinfection of food production areas. *International Office of Epizootics*, 343-363.
48. Iranzo, O. E. (2012). Nuevas herramientas para la detección y eliminación de biofilms. *Betelgeux SL*, 42-46.
49. Jiménez, M. C. (2012). Protocolo Central de Esterilización. Tesis de Odontología. Facultad de Odontología, Cartagena.
50. Keskinen, L.A., Todd, E.C.D. y Ryser, E. (2008). Transfer of Surface-Dried *Listeria monocytogenes* from Stainless Steel Knife Blades to Roast Turkey Breast. *Journal of Food Protection*, 71, 176-181.
51. Kitis, M. (2004). Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. *Environment International*, 47-55.
52. Kyanko, M. V., Russo, M. L., Fernández, M., & Pose, G. (2010). Efectividad del Acido Peracético sobre la reducción de la carga de Esporas de Mohos causantes de Pudrición Poscosecha de Frutas y Hortalizas. *Información Tecnológica*, 1-6.
53. Langsrud, S., Sidhu, M., Heir, E., & Holck, A. (2003). Bacterial disinfectant resistance a challenge for the food industry. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 283-290.
54. Lee, S., & Frank, J. (1991). Inactivation of surface-adherent *Listeria monocytogenes* by hypochlorite and heat. *Food Prot*, 54 (1), 4-6.

55. Leveau, J. Y. (2002). *Manual técnico de higiene*. Madrid: Mundi-Prensa.
56. López, P. J. (2010). Medición de la eficacia antibacteriana del programa de limpieza y desinfección de la mesa de despiece en una planta empacadora de carnes frías de la ciudad de México. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista, Universidad de Estudios Superiores Cuautitlán, Cuautitlán, Izcalli.
57. Luppens, S., Rombouts, F., & Abee, T. (2002). One explanation for the variability of the bacterial suspension tests. *Journal of Applied Microbiology*, 237-250.
58. MacFaddin, J. F. (2004). *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica* (3ra ed.). Estados Unidos: Media panamericana.
59. Marriott, N. G. (2003). *Principios de higiene alimentaria*. España: Acribia.
60. McDonnell, G., & Russell, D. (1999). Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *American Society for Microbiology*, 12(1), 147-179.
61. McEldowney, S., & Fletcher, M. (1988). The effect of temperature and relative humidity on the survival of bacteria attached to dry solid surfaces. *Letters in Applied Microbiology*, 83-86.
62. McGlynn, W. (2007). Guía para el Uso de Cloro como Desinfectante en el Procesamiento de Alimentos. *Seguridad Alimentaria*, 20-22.
63. Medina, C. L., & Valencia, M. L. (2008). Evaluación de la eficacia de un desinfectante de alto nivel, a base de peróxido de hidrógeno, empleado en la esterilización de dispositivos e instrumentos hospitalarios. Javeriana CEJA, Bogotá.
64. Medina, T. C. (2005). Uso de desinfectantes. *Química Farmacéutica*. 1-41.
65. Meyer, B. (2006). Does microbial resistance to biocides create a hazard to food hygiene? *International Journal of Food Microbiology*, 275-279.
66. Miles, A. A., & Misra, S. S. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *J. Hyg*, 38, 732-749.
67. Mittelman, M. (1998). Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. *Journal of Dairy Science*, 2760-2764.
68. Molinar, A. C., Ballinas, M., Solís, M. F., Chavira, R. E., Rodríguez, C. G., & Moorillón, N. V. (2007). Formación de Biopelículas sobre membranas utilizadas en el tratamiento de aguas residuales. *Biotecnología y Bioingeniería*, 25, 1.

69. Morales, A. (2007). Evaluación de la eficacia del desinfectante LARK SANITIZER empleado en las áreas de elaboración de envases y tapas plásticas en ENCI S.A. Tesis de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.
70. Moreno, S. O. (2010). Hoja de seguridad para desinfectantes. Eurochem international corporation de México, 1-6.
71. Mortimore, S. W. (2004). *HACCP*. Zaragoza, España: Acribia.
72. Navia, D., Villada, H., & Mosquera, S. (2010). Las biopelículas en la Industria de los alimentos. Grupo CITBIA, 1-11.
73. Nazar, J. (2007). Biofilms bacterianos. *Rev. Otorrinolaringol*, 67, 61-72.
74. Negroni, M. (2009). Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica (2da ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
75. Ninemeier, J. (2000). *Principios de desinfección: esterilización y reprocesamiento de instrumental médico y de laboratorio*. México: Grupo editorial Iberoamérica.
76. Orihuel, I., Bertó, N. R., & Canet, G. J. (2010). Detección y control de puntos negros en la limpieza y desinfección de superficies en industrias alimentarias. *Alimentaria*, 411, 60-66.
77. Pelczar, M., Reid, R., & Chang, E. (1982). *Microbiología* (4ta ed.). México, D.F: McGraw Hill.
78. Pérez, R. 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.
79. Puig-Durán, F. J. (2002). *Ingeniería, autocontrol y auditoría de la higiene en la industria alimentaria*. Madrid: Mundi-Prensa.
80. Ramírez, E. N. (2006). *Limpieza y desinfección en la Industria de Alimentos para la eliminación de contaminación superficial (biopelícula)*. Edo. de Mex., Cuautitlán Izcalli.
81. Rocha, M. T., Verges, E., Lewintre, M., & Valsecia, M. (2006). Detección de reacciones adversas a los compuestos de Yodo. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*, 110(1), 1-4.
82. Rodney, M. D., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 15(2), 167-93.

83. Rodríguez, D. L., Badiola, D. J., Cepeda, S. A., Más, B. A., Rodríguez, F. E., Zurera, C. G., & Téllez, P. S. (2010). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los biofilms y su repercusión en la seguridad alimentaria. *Comité Científico*, 12, 37-61.
84. Rodríguez, M. O. (2009). Comportamiento reológico de disoluciones acuosas de surfactantes comerciales no iónicos. Tesis de doctorado en Ingeniería Química, Universidad de Granada, Facultad de Ciencias Departamento de Ingeniería Química, Granada.
85. Rodríguez, R. E. (2011). Evaluar la capacidad de un sanitizante cítrico para remover biopelículas y reducir la carga microbiana en equipos acero inoxidable en el taller de cárnicos. Tesis de Ingeniería en Alimentos . Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Edo de Mex.
86. Rossi, S., Antonelli, M., Mezzanotte, V., & Nurizzo, C. (2007). Peracetic acid disinfection: a feasible alternative to wastewater chlorination. *Water Environment Research*, 341-350.
87. Roux, D. (2006). Prevención de la Contaminación en la Industria Cárnica en la región mediterránea. *Centro de Actividad Regional para la Producción Limpia*, 1-172.
88. Rueda, J., Amigot, L., & Ducha, J. (2003). Evaluación de desinfectantes de amonio cuaternario sobre cepas bacterianas de origen animal. *Revue Scientifique et Technique (Office International des Épizooties, Paris, France)*, 22(3), 1097-1104.
89. Russell A.D. (2003). Biocide use and antibiotic resistance: therelevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Lancet Infect Dis*, 3, 794-802.
90. SAGARPA (2012). Manual de Buenas Prácticas de Manufactura y Procedimiento operacional de sánitización estándar para la industria: Empacadora no TIF de carnes frías y embutidos. Gobierno Federal, 5-40.
91. Salgar, B. R. (2004). Biopelículas o biofilms en la industria alimentaria. *Mundo Alimentario*, 30-31.
92. Sánchez, J. A. (2003). Diseño del plan de limpieza y desinfección en un matadero de porcino. Ed. Servicio de Publicaciones Universidad de Córdoba, 22-48.
93. Sánchez, L., & Sáenz, E. (2005). Antisépticos y Desinfectantes. *Dermatología Peruana*, 15(2), 1-22.
94. SCENIHR. (2009). Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. *Assessment of the antibiotic resistance effects of biocides*.

95. Sharma, M. y. (2002). Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food dairy processing industry a case. *Food Control*, 469-477.
96. Sheldon, A.T. (2005). Antiseptic "resistance": real or perceived threat?. *Clin Infect Dis*, 40, 1650-1656.
97. Socransky, S. S., &Haffajee, A. D. (2002). Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000*, 28, 12-55.
98. Stanier, R. Y. (1985). *Microbiología*. Barcelona, España: Reverté, S.A
99. Stopforth, J., Samelis, J., Sofos, J., Dendall, P., & Smith, G. (2002). Biofilm formation by acid-adapted and nonadapted *Listeria monocytogenes* in fresh beef decontamination washings and its subsequent inactivation with sanitizers. *Journal of Food Protection*, 1717-1727.
100. Téllez, P. S. (2010). Los biofilms en la industria alimentaria. *Seguridad Alimentaria y Alimentación: Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET)*, 1-2.
- 101 Valdebenito, S. (2010). El poder desinfectante de los yodóforos. *Actualidad Avipecuaria*, 1-13.
102. Wei, C., Cook, D., & Kirk, J. (1985). Use of chlorine compounds in the food industry. *Food Technol.* 39 (1), 107-114,
103. Wildbrett, G. (2000). *Limpieza y Desinfección*. Zaragoza, España: Acribia, S.A.
104. Zottola, A. E., & Sasahara, C. K. (1994). Microbial biofilms in the food processing industry-Should they be a concern?. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 125-148.

#### Referencia de NMX

- NMX-BB-040-SCFI-1999. Métodos generales de análisis - determinación de la actividad antimicrobiana en productos germicidas. Norma Mexicana