

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“ESTUDIO DEL EFECTO DEL AGUA ELECTROLIZADA
SOBRE CÉLULAS LIBRES Y BIOPELÍCULAS DE *Listeria*
monocytogenes EN ACERO INOXIDABLE Y EN UN
ALIMENTO EN FRESCO”

TESIS COLECTIVA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTAN

YESENIA BAUTISTA BAUTISTA

MARTHA EDITH MERCADO HURTADO

DIRIGIDA POR

Dra. BLANCA ESTELA GARCÍA ALMENDÁREZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ESTUDIO DEL EFECTO DEL AGUA ELECTROLIZADA
SOBRE CÉLULAS LIBRES Y BIOPELÍCULAS DE *Listeria
monocytogenes* EN ACERO INOXIDABLE Y EN UN
ALIMENTO EN FRESCO”**

TESIS COLECTIVA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTAN

**YESENIA BAUTISTA BAUTISTA
MARTHA EDITH MERCADO HURTADO**

DIRIGIDA POR

Dra. BLANCA E. GARCÍA ALMENDÁREZ

SINODALES

Dra. BLANCA E. GARCÍA ALMENDÁREZ _____

DIRECTOR

Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ _____

SINODAL

Dra. SILVA AMAYA LLANO _____

SINODAL

Dr. ALDO AMARO REYES _____

SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Biopelículas formadas por bacterias	1
1.2 Definición	1
1.3 Características de las biopelículas	1
1.4 Características de la superficie	2
1.5 Pre acondicionamiento de la superficie	2
1.6 Etapas de formación	3
1.6.1 Adhesión	3
1.6.1.1 Adhesión reversible	4
1.6.1.2 Adhesión irreversible	4
1.7 Modelos de la biopelícula	4
1.7.1 Teoría de monocapa de la biopelícula	4
1.7.2 Teoría estructural en tercera dimensión	5
1.7.3 Teoría actual	5
1.8 Resistencia de la biopelícula a antimicrobianos	5
1.9 <i>Listeria monocytogenes</i>	5
1.9.1 Listeriosis	6
1.9.2 Persistencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en el procesamiento de alimentos	7
1.10 Antimicrobianos utilizados contra biopelículas de <i>Listeria monocytogenes</i>	7
1.11 Agua electrolizada	8
1.11.1 Características	8
1.11.2 Producción	8
1.11.3 Mecanismos de acción	9
1.12 Aplicación del agua electrolizada en la industria de alimentos frescos	10

2. HIPÓTESIS	12
3. OBJETIVOS	13
3.1 General	13
3.2 Específicos	13
4. METODOLOGÍA	14
4.1 Materiales	14
4.1.1 Materiales biológicos	14
4.1.2 Antimicrobianos	14
4.1.3 Reactivos	14
4.1.4 Equipo	14
4.1.5 Alimentos	15
4.2 Método	15
4.2.1 Activación y preparación del inóculo de <i>L. monocytogenes</i> EGDe y Scott A	15
4.2.2 Preparación de la superficie	15
4.2.2.1 Superficie de acero inoxidable	15
4.2.3 Preparación de las soluciones de tratamiento	16
4.2.4 Tratamientos en células libres	16
4.2.5 Formación de las biopelículas	17
4.2.5.1 Adhesión y formación de biopelículas de <i>Listeria monocytogenes</i> EGDe y Scott A	17
4.2.6 Tratamiento de las biopelículas con agua electrolizada neutra	17
4.2.7 Recuperación de células formadoras de la biopelícula	18
4.2.8 Recuento de las células formadoras de biopelículas	18
4.2.9 Preparación e inoculación de alimentos frescos con <i>L. monocytogenes</i> EGDe y Scott A	18
4.2.10 Tratamiento de vegetales con agua electrolizada neutra	18
4.2.11 Análisis microbiológico de los vegetales	19
4.3 Diseño experimental	19
4.3.1 Diseño experimental para evaluar el efecto bactericida de diferentes sanitizantes en aguacate y jitomate.	19

4.3.2	Determinación de bacterias mesófilas aerobias	21
4.3.3	Determinación de hongos y levaduras	21
4.3.4	Determinación de coliformes totales por número más probable	22
4.3.4.1	Prueba presuntiva	22
4.3.4.2	Prueba confirmativa	22
5.	RESULTADOS	25
5.1	Efecto del agua electrolizada neutra sobre células libres de <i>L. monocytogenes</i> Scott A y EGDe.	25
5.2	Formación de biopelículas de <i>L. monocytogenes</i> Scott A y EGDe en placas de acero inoxidable	27
5.3	Efecto del agua electrolizada neutra sobre biopelículas de <i>L. monocytogenes</i> Scott A y EGDe.	29
5.4	Evaluación del efecto de la concentración y tiempo de contacto del agua electrolizada neutra en vegetales (jitomate y aguacate)	31
5.5	Efecto del agua electrolizada neutra sobre alimentos (jitomate y aguacate) inoculados con <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A y EGDe.	37
6.	DISCUSIÓN	41
6.1	Efecto del agua electrolizada neutra sobre células libres de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A y EGDe	41
6.2	Estudio de la formación de biopelículas de <i>L. monocytogenes</i> Scott A y EGDe en placas de acero inoxidable.	42
6.3	Efecto del agua electrolizada neutra sobre biopelículas de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A y EGDe.	43
6.4	Efecto de la concentración y tiempo de contacto del agua electrolizada neutra en vegetales (jitomate y aguacate).	44
6.5	Efecto del agua electrolizada neutra sobre alimentos (jitomate y aguacate) inoculados con <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A y EGDe.	46
7.	CONCLUSIONES	49
8 .	BIBLIOGRAFIA	51
	ANEXOS	55

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Número e incidencia de casos confirmados en laboratorio de infección por bacterias y parásitos patógenos, hospitalizaciones y muertes	6
2. Factores y niveles a evaluar en los tratamientos con jitomate y aguacate	20
3. Tratamientos del diseño experimental para jitomate y aguacate.	21
4. Formación de biopelículas de <i>L. monocytogenes</i> Scott A y EGDe en placas de acero inoxidable.	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Etapas de formación de la biopelícula	3
2. Esquema del generador de agua electrolizada y compuestos producidos	9
3. Esquema de actividades utilizando como modelo de estudio el jitomate (realizado por Mercado Hurtado Martha Edith)	23
4. Esquema de actividades utilizando como modelo de estudio el aguacate (realizado por Bautista Bautista Yesenia)	24
5. Diagrama de flujo para la evaluación del efecto de AEN1 sobre células libres	25
6. Cinética de células libres de <i>L. monocytogenes</i> Scott A	26
7. Cinética de células libres de <i>L. monocytogenes</i> EGDe	27
8. Diagrama de flujo para la formación de biopelículas de <i>L. monocytogenes</i> Scott A y EGDe	28
9. Diagrama de flujo para el tratamiento de biopelículas de <i>L. monocytogenes</i> Scott A y EGDe en placas de acero inoxidable	29
10. Cinética de biopelículas de <i>L. monocytogenes</i> Scott A utilizando AEN1	30
11. Cinética de biopelículas de <i>L. monocytogenes</i> EGDe utilizando AEN1	31
12. Diagrama de flujo del diseño experimental	32
13. Población de bacterias mesófilas aerobias (BMA) en jitomate después del tratamiento de sanitización	33
14. Población de BMA en aguacate después del tratamiento de sanitización	34
15. Población de hongos y levaduras en aguacate después del tratamiento de sanitización	35
16. Población de coliformes totales en aguacate después del tratamiento de sanitización	36
17. Diagrama de flujo para la evaluación del efecto del AEN1 en vegetales inoculados	37
18. Efecto del AEN1 en jitomate inoculado con <i>L. monocytogenes</i> Scott A a 3 min de tiempo de contacto	38

19. Efecto del AEN1 en jitomate inoculado con <i>L. monocytogenes</i> EGDe a 3 min de tiempo de contacto	39
20. Efecto del AEN1 en aguacate inoculado con <i>L. monocytogenes</i> Scott A a 3 min de tiempo de contacto	40
21. Efecto del AEN1 en aguacate inoculado con <i>L. monocytogenes</i> EGDe a 3 min de tiempo de contacto	40

RESUMEN

Existen microorganismos patógenos que tienen la capacidad de adherirse a superficies tanto de acero inoxidable, teflón, vidrio e incluso de alimentos en forma de biopelículas. Las biopelículas representan importantes problemas en la industria alimentaria, ya que pueden generar perjuicios en la salud, en las operaciones y procesos. La tendencia actual en el consumo de alimentos frescos aumenta la preocupación por tener una desinfección adecuada que garantice la calidad e inocuidad para el consumo humano. Varios estudios han demostrado que el agua electrolizada es efectiva para reducir e inactivar microorganismos deterioradores y patógenos en diversas superficies. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto antimicrobiano del AEN en células libres y biopelículas de *Listeria monocytogenes* Scott A y EGDe en superficies de acero inoxidable, jitomate y aguacate. Se inocularon placas de acero inoxidable y los vegetales con *L. monocytogenes* para después ser expuestos al AEN a diferentes tiempos y concentraciones, así como la eliminación de la flora nativa. La concentración efectiva para llegar a niveles no detectables para *L. monocytogenes* Scott A en células libres fue 150 ppm y para biopelículas en acero inoxidable de 400 ppm, en el caso de *L. monocytogenes* EGDe para células libres fue 30 ppm y para biopelículas en placas de acero inoxidable de 70 ppm, para el jitomate se obtuvo eliminación de flora asociada a partir de 70 ppm, y para aguacate a 200 ppm. Para aguacate y jitomate inoculados con *L. monocytogenes* EGDe fue de 300 y 70 ppm respectivamente y para *L. monocytogenes* Scott A fue de 500 y 200 ppm respectivamente. Se considera que el AEN es una alternativa viable para utilizarse como agente sanitizante en la limpieza y desinfección de superficies y alimentos.

1. ANTECEDENTES

1.1 Biopelículas formadas por bacterias

Existen microorganismos patógenos tales como *Salmonella enteritidis*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* capaces de adherirse y crecer sobre superficies en contacto con ellos formando biopelículas. Esto es de suma importancia en la industria de alimentos ya que representa un importante problema que dificulta y perjudica las operaciones y procesos (Navia y col., 2010).

Recientes hallazgos sugieren que los microorganismos adheridos pueden ser más resistentes a compuestos sanitizantes que su forma libre. Considerando que las células viables permanecen en forma de biopelícula y son transferidas a los alimentos, se puede ocasionar un importante impacto negativo en la calidad de almacenamiento y seguridad de los alimentos (Hood y Zottola, 1995).

1.2 Definición

La biopelícula es un conjunto de células microbianas asociadas a una superficie embebidas en una matriz de sustancia polimérica extracelular (SPE) (Donlan, 2002). Estas sustancias protegen a los microorganismos formadores de la biopelícula de los agentes antimicrobianos, evitan la deshidratación y refuerzan la resistencia de la biopelícula al estrés ambiental (Carpentier y Cerf, 1993).

1.3 Características de las biopelículas

Las biopelículas son heterogéneas, contienen microcolonias de células bacterianas envueltas en una matriz de SPE. Las SPE pueden contener polisacáridos, proteínas, fosfolípidos, ácidos nucleicos y otras sustancias poliméricas hidratadas (Chimielewski y Frank, 2003). En las SPE se puede encontrar de un 50-90% del carbono orgánico total de la biopelícula y se puede considerar el material principal de la matriz. Estas sustancias pueden variar en las propiedades físicas y químicas, además están altamente hidratadas ya que pueden incorporar grandes cantidades de agua en su estructura por enlaces de hidrógeno (Sutherland, 2001).

1.4 Características de la superficie

La superficie sólida que puede estar en contacto o no con los alimentos puede tener varias características que son importantes en el proceso de fijación de los microorganismos. Characklis y col. (1990), señalaron que la extensión de la colonización microbiana parece aumentar a medida que aumenta la rugosidad de la superficie. Las propiedades fisicoquímicas de la superficie también pueden ejercer una fuerte influencia en la velocidad y el grado de fijación. La mayoría de los investigadores han encontrado que los microorganismos se pueden fijar más rápidamente a las superficies hidrófobas no polares tales como el teflón y otros plásticos que a los materiales hidrófilos tales como vidrio o metales (Donlan, 2002). Las células bacterianas generalmente tienen una carga negativa en su pared celular. Sin embargo, la magnitud de la carga varía de cepa a cepa y probablemente esté influenciado por las condiciones del cultivo (Gilbert y col 1991) Para medir la carga superficial neta, los investigadores han utilizado la movilidad electroforética y cromatografía de interacción electrostática (Pedersen, 1980).

1.5 Pre acondicionamiento de la superficie

Cuando un líquido que contiene microorganismos está en contacto con una superficie, el primer evento que puede ocurrir es la absorción de moléculas en la misma, lo cual es generalmente conocido como “acondicionamiento de la superficie”. Este contacto da como resultado una modificación química la cual puede afectar la velocidad y el grado de fijación microbiana. Al parecer los residuos de alimentos remanentes en las superficies que no fueron limpiadas adecuadamente pueden proporcionar nutrientes para los microorganismos que se adhieren (Helke y col., 1993).

Ciertos microorganismos también pueden acondicionar la superficie al ser los primeros en adherirse llamados “colonizadores primarios”, los cuales al estar presentes pueden permitir que otras bacterias se adhieran (Hood y Zottola, 1995). La presencia de la película de acondicionamiento altera la energía libre superficial, la carga electrostática y la hidrofobicidad de la superficie, sin embargo la formación

de esta película no es necesaria para que ocurra el ataque microbiano (Kumar y Anand, 1998).

1.6 Etapas de formación

El proceso de adhesión de microorganismos a superficies es complejo ya que intervienen diversas variables que afectan el resultado. Dicho proceso se inicia con la adherencia de células a la superficie, formando microcolonias por la activación de sus genes, con la producción de SPE y una subsecuente maduración de la biopelícula (Figura 1).

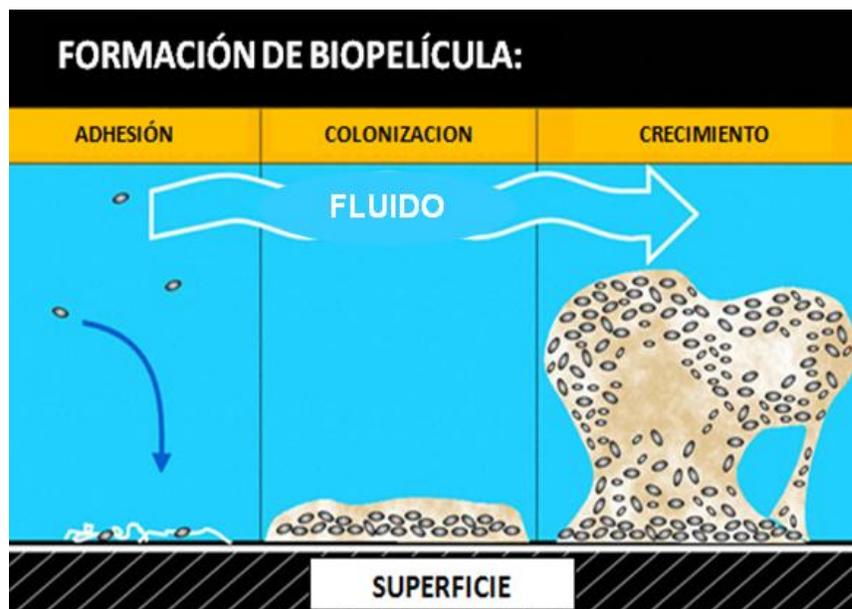


Figura 1. Etapas de formación de la biopelícula (Montana State University, 2012).

1.6.1 Adhesión

El mecanismo de adhesión al sustrato puede ser activo o pasivo dependiendo de la motilidad de las células. Una adhesión pasiva se da por la gravedad, difusión y dinámica del fluido. En una adhesión activa la superficie de la célula bacteriana facilita el proceso. Los flagelos, permiten la movilidad de las células hasta el sitio específico de adhesión y los pili, proteínas de adhesión, cápsulas y carga de las

superficies facilitan el proceso de agregación y adhesión (Chimielewski y Frank, 2003).

1.6.1.1 Adhesión reversible

Las células individuales se adhieren a la superficie. Esta fase es reversible y las células pueden dejar la superficie y volver a su forma libre, mientras la biopelícula crece, las microcolonias y los canales de agua se forman. Las fuerzas de largo alcance como las de van der Waals, electrostáticas e hidrofóbicas están involucradas en este tipo de adhesión, en este punto las células pueden ser removidas por enjuague (Agle, 2007).

1.6.1.2 Adhesión irreversible

Después de la adhesión inicial los organismos pueden mantener contacto con la superficie, con lo que se origina la adhesión irreversible y el crecimiento de la biopelícula. Esta adhesión está mediada por fuerzas de corto alcance como las interacciones dipolo-dipolo, enlaces de hidrógeno, iónicos y covalentes así como interacciones hidrofóbicas. Después de una unión irreversible no es posible eliminar la biopelícula por enjuague. Sin embargo, las células se pueden eliminar por frotación. La transición de las interacciones débiles a fuertes con la superficie se genera mediante la producción de SPE (Kumar y Anad, 1998).

1.7 Modelos de la biopelícula

Varios modelos se han propuesto para explicar el desarrollo y las propiedades de las biopelículas. Algunos de estos modelos se describen a continuación:

1.7.1 Teoría de monocapa de la biopelícula

Es la primera teoría que describe la estructura de la biopelícula, es un modelo continuo, que describe a éstas como lisas, planas y homogéneas (Chimielewski y Frank, 2003)

1.7.2 Teoría estructural en tercera dimensión

El modelo de Kreft describe a las biopelículas como un mosaico heterogéneo conformado por microorganismos agrupados sostenidos por sustancias poliméricas extracelulares (Bishop, 1997).

1.7.3 Teoría actual

Se basa principalmente en la evidencia entregada por el microscopio de barrido con láser confocal. Este instrumento ha permitido visualizar una estructura como un hongo en la biopelícula con estructuras aéreas denominadas torres, pedestales y canales de agua. La porción más elevada es el hongo formado por un tallo estrecho penetrado por canales. Este modelo propone que el crecimiento celular en la periferia es más rápido y lento en el interior. Se ha demostrado que el rango de la porosidad de las biopelículas maduras en la parte superior es de 89% y del 5% en la capa del fondo, lo cual confirma este modelo (Zhang y Bishop, 1994).

1.8 Resistencia de la biopelícula a antimicrobianos

Las biopelículas son más resistentes que las células libres a los antimicrobianos como antibióticos y desinfectantes, además exhiben mayor resistencia a la luz UV. Este incremento en la resistencia se puede deber a la penetración retardada del antimicrobiano a través de la biopelícula, ocasionada por las SPE de la misma. Las SPE representa una barrera difusional para las moléculas del antimicrobiano, influyendo ya sea en la velocidad de transporte de la molécula al interior de la biopelícula o en la reacción que se tenga con el material de la SPE (Donlan y Costerton, 2002).

1.9 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes es una bacteria Gram positiva, no esporulada, anaerobia facultativa, es psicotrópica y puede crecer en temperaturas de refrigeración (-0.4 a 45 °C) y en un rango de pH (4-9). Este microorganismo está muy extendido en la naturaleza y se puede encontrar en muchos ambientes, tales como heces, agua, suelo, aguas residuales (Chengchu y col., 2006).

Según un informe de la CDC (2011) *Listeria monocytogenes* es considerado como uno de los seis microorganismos patógenos más importantes relacionados con enfermedades transmitidas por los alimentos. Su ingestión puede provocar serios problemas en humanos especialmente en personas inmunocomprometidas.

1.9.1 Listeriosis

La listeriosis es una enfermedad transmitida por alimentos, que presenta una incidencia relativamente baja, sin embargo su tasa de letalidad es alta en comparación con otros patógenos alimentarios siendo esta del 12.8%, como se observa en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Número e incidencia de casos confirmados en laboratorio de infección por bacterias y parásitos patógenos, hospitalizaciones y muertes (CDC, 2011).

Patógeno	Clases		Hospitalizaciones		Muertes		Objetivo de salud nacional 2010	Objetivo de salud nacional 2020
	Nº	Incidencia	Nº	%	Nº	Tasa de fatalidad		
Bacterias								
<i>Campilobacter</i>	6365	13.6	928	14.6	8	0.1	12.3	8.5
<i>Listeria</i>	125	0.3	112	89.6	16	12.8	0.24	0.2
<i>Salmonella</i>	8256	17.6	2290	27.7	29	0.4	6.9	11.4
<i>Shigela</i>	1780	3.8	333	18.7	0	0		
<i>STEC O157</i>	442	0.9	184	41.6	2	0.5	1	0.6
<i>STEC no-O157</i>	451	1	69	15.3	1	0.2		
<i>Vibrio</i>	193	0.4	45	23.3	6	3.1		0.2
<i>Yersinia</i>	159	0.3	52	32.7	1	0.6		0.3
Parásitos								
<i>Cryptosporidium</i>	1290	2.8	234	18.1	5	0.4		
<i>Cyclospora</i>	28	0.1	0	0	0	0		
Total	19089		4257		68			

La listeriosis puede provocar meningitis, bacteremia, septicemia, aborto involuntario. La mujer embarazada, fetos, recién nacidos y los individuos inmunocomprometidos son los más susceptibles a la bacteria. La dosis efectiva estimada varía con la cepa de *L. monocytogenes* y el huésped, pero la ingestión de menos de 1000 células se considera suficiente para causar la enfermedad (Martín y Fisher, 1999).

Muchos países como Estados Unidos de América, tienen tolerancia cero para la contaminación con *L. monocytogenes*. Por lo tanto, tal contaminación con este microorganismo es de gran preocupación económica para la industria de elaboración de alimentos, incluso si la bacteria no puede crecer en un producto particular, o si se encuentra sólo en pequeñas cantidades. Los brotes de listeriosis se han relacionado principalmente con el consumo de productos listos para su consumo los cuales son productos que se consumen sin tratamiento térmico previo por parte del consumidor (Moretro y Langsrud, 2004)

1.9.2 Persistencia de *Listeria monocytogenes* en el procesamiento de alimentos

Las materias primas, ingredientes, agua, personas, animales y equipos son fuentes potenciales para la introducción de *L. monocytogenes* en el ambiente del procesamiento de alimentos (Kelthariou, 2002).

Cepas persistentes de *L. monocytogenes* han sido aisladas de las superficies del procesamiento de alimentos, aún después de la limpieza y desinfección, ya que existen ciertas piezas del equipo que son difíciles de desinfectar. Se ha reportado que pueden persistir en el medio de procesamiento de alimentos durante periodos prolongados de tiempo, incluso por más de 10 años. La bacteria tiene la capacidad de adherirse a los materiales utilizados en la industria alimentaria. La adhesión y la formación de biopelículas son dependientes de diversos factores tales como la cepa, temperatura, pH, la nutrición, la presencia de otras bacterias y el tipo y condición de la superficie (Tompkin, 2002).

1.10 Antimicrobianos utilizados contra biopelículas de *Listeria monocytogenes*

En años recientes se han generado nuevas estrategias para evitar la adherencia y formación de biopelículas de *L. monocytogenes*. La mayoría de estas estrategias se basan en la modificación de la superficie para inhibir la adhesión, tal como la adsorción de proteínas antimicrobianas como la nisina y la lisozima. Otros métodos que han sido probados contra las biopelículas son la radiación ultravioleta y el agua electrolizada (Mori y col., 1997).

1.11 Agua electrolizada

El agua electrolizada es un nuevo sistema antimicrobiano que ha sido utilizado en Japón durante años y muestra una gran aplicación sobre gran variedad de microorganismos deterioradores y patógenos. Así mismo ha cobrado interés en los últimos años, como un desinfectante utilizado en diversas áreas como la agricultura, la odontología, la medicina y sobretodo en la industria alimentaria (Hsu, 2005).

1.11.1 Características

El agua electrolizada tiene el potencial de ser más eficaz y barata que los agentes de limpieza tradicionales. La mayor de sus ventajas en la inactivación de microorganismos patógenos es su menor impacto adverso sobre el medio ambiente y en la salud de los usuarios, debido a la ausencia de riesgo por productos químicos añadidos en su producción (Mori y col., 1997).

1.11.2 Producción

El agua electrolizada se produce al hacer pasar una solución de sal (NaCl) diluida a través de una celda electrolítica, donde el ánodo y el cátodo están separados por una membrana (Figura 2). Al someter los electrodos a una corriente, los iones cargados negativamente, tales como Cl^- e OH^- en la solución diluida de sal se mueven al ánodo para ceder electrones. Los iones negativos, se convierten en O_2 , Cl_2 , HOCl^- , ácido hipocloroso y HCl, mientras que los iones cargados positivamente, tales como H^+ y Na^+ se mueven hacia el cátodo a tomar electrones y se convierten en H_2 y NaOH (Huang y col., 2008).

Se producen simultáneamente dos tipos de agua el agua electrolizada ácida (AEA) y el agua electrolizada alcalina. El AEA con un pH bajo (2.3 a 2.7), de alto potencial oxido-reducción (>1000 mV), oxígeno disuelto y que contiene alta concentración de cloro.

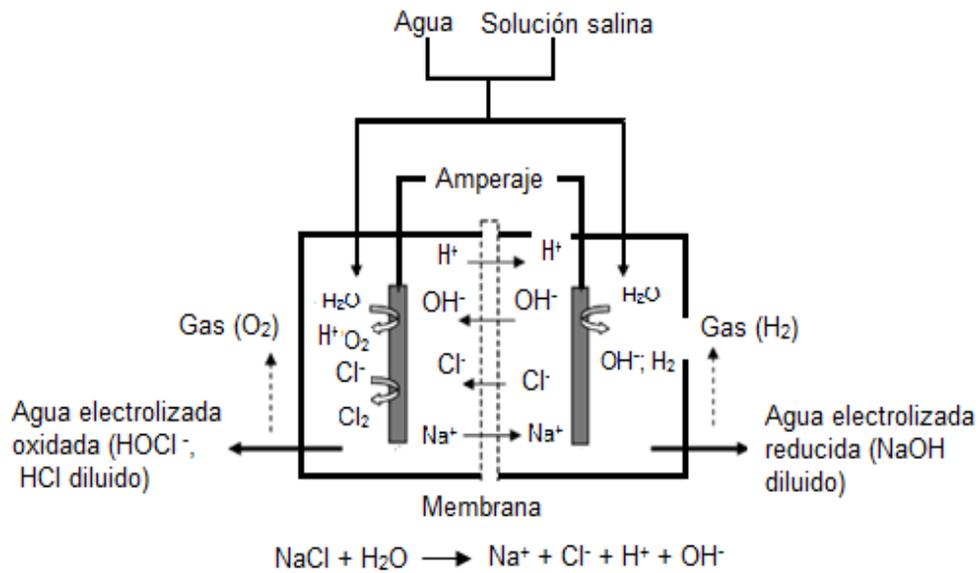


Figura 2. Esquema del generador de agua electrolizada y compuestos producidos (Huang y col., 2008).

En el cátodo se produce agua electrolizada alcalina, con un pH alto (10 a 11.5), hidrógeno disuelto y bajo potencial de oxido-reducción (-800 a -900 mV) (Hsu, 2005).

El agua electrolizada neutra (AEN) se genera como AEA, pero parte del producto obtenido en el ánodo se redirige a la cámara del cátodo. Esto produce una solución neutra (pH ~8) en el que los reactivos biocidas principales son HOCl, ClO⁻ y O₂. Debido a su pH neutro, el AEN no contribuye tan agresivamente como el AEA a la corrosión de los equipos de procesamiento o irritación de las manos, siendo además más estable (Ayeba y Hung, 2005; Len y col., 2002).

1.11.3 Mecanismos de acción

Las bacterias generalmente crecen en un rango de pH de 4 a 9. Las bacterias aerobias crecen favorablemente en un rango de potencial oxido-reducción (POR) de 200 a 800 mV, mientras que la anaerobias crecen en un rango de -700 a -200 mV.

El alto POR en el agua electrolizada puede causar la modificación de flujos metabólicos y la producción de ATP, probablemente debido al cambio en el flujo de electrones en las células. Un pH bajo puede sensibilizar a la membrana externa de las células de las bacterias y permitir la entrada de hipoclorito (McPherson, 1993). El hipoclorito es el compuesto más activo del cloro, puede matar a la célula microbiana a través de la inhibición de la oxidación de la glucosa o por la oxidación a través del cloro de los grupos sulfhidrilo de algunas enzimas importantes en el metabolismo de carbohidratos. Otros mecanismos propuestos de acción del cloro son: (1) Interrupción de la síntesis de la proteína, (2) descarboxilación oxidativa de los aminoácidos a nitritos y aldehídos, (3) reacciones con ácidos nucleicos, purinas y pirimidinas, (4) desequilibrio del metabolismo después de la destrucción de las enzimas clave, (5) inducción de lesiones en el ADN con la consecuente pérdida de la capacidad de replicación, (6) inhibición, de la absorción de oxígeno y la fosforilación oxidativa, junto con las fugas de algunas macromoléculas, (7) formación de N-cloro tóxico derivado de la citosina y (8) creación de aberraciones cromosómicas (Marriott y Gravani, 2006).

Len y col. (2002), reportaron que la concentración relativa de cloro molecular acuoso, HOCl, ion hipoclorito (OCl⁻) y cloro gas (Cl₂) eran los factores que explicaban la potencia bactericida del agua electrolizada (AE). A un pH de 4, el AE con la concentración máxima de HOCl, tenía la actividad microbicida máxima. Park y col. (2004), investigaron los efectos del cloro y pH sobre la eficacia del agua electrolizada en *E. coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*. Se demostró que el AE es muy eficaz para la inactivación de ambos microorganismos en un amplio rango de pH (2.6 - 7), si hay suficiente cloro libre (>2 mg/l).

El efecto antimicrobiano del agua electrolizada deriva de la acción combinada de la concentración de iones hidrógeno, del potencial de oxido-reducción y del cloro libre.

1.12 Aplicación del agua electrolizada en la industria de alimentos frescos

Las frutas y verduras representan parte esencial en la dieta a nivel mundial, es por ello que los nutriólogos enfatizan en la importancia de un consumo de 5 porciones de ellos al día por los beneficios a la salud que presentan. Sin embargo, existen

datos que sugieren que la proporción de brotes de enfermedades relacionadas con la ingesta de frutas y verduras son mayores en comparación con otros alimentos. La frecuencia con la que se han manifestado cuadros epidémicos ha puesto en entredicho la inocuidad de productos no sometidos a procesamientos para reducir o eliminar la carga microbiana.

Existen diversos factores que contribuyen a la presencia de microorganismos patógenos que se asocian a estos productos como lo son: riego con aguas contaminadas, baja eficiencia en sistemas de desinfección para el control de microorganismos en recepción y lavado de frutas y hortalizas, condiciones sanitarias del área de empaque, higiene de los trabajadores, canales de distribución distantes y complejos, y mal manejo en el almacén (Siller y col., 2002). Aunque en México el consumo de alimentos frescos aún es bajo, resalta el gran incremento en las exportaciones agropecuarias, que representó un avance del 9.9% a tasa anual, entre las más importantes se encuentran el jitomate (51.2%), aguacate (38.5%), y fresas frescas (36.7%) (INEGI, 2011). México es un país exportador de productos frescos y debe seguir lineamientos integrales de sistemas de prevención para atender las exigencias internacionales y obtener productos que cumplan con las normas más altas de calidad e inocuidad. Se han utilizado una variedad de desinfectantes para reducir las poblaciones bacterianas en las frutas y hortalizas. Sin embargo, además de su toxicidad potencial, se han mostrado incapaces de eliminar completamente o inactivar los microorganismos en los productos frescos lo cual obliga a la investigación de desinfectantes alternativos y sostenibles que garanticen la seguridad alimentaria y la calidad global nutricional durante una adecuada vida de anaquel (Callejas y col., 2010).

El agua electrolizada neutra (AEN) ha demostrado su eficacia en diferentes superficies vegetales para reducir microorganismos patógenos como *E. coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* y *Listeria monocytogenes* (Deza y col., 2003).

El mantener la higiene y buenas prácticas de sanidad en la industria de frutas y hortalizas, es responsabilidad de todos los que están involucrados en su proceso: desde el que cultiva hasta el que lo pone a disposición del consumidor final (Siller y col., 2002).

2. HIPÓTESIS

El agua electrolizada neutra (AEN) representa una alternativa para el control microbiano de células libres y biopelículas de *Listeria monocytogenes* tanto en superficies inertes como de alimentos.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Estudiar el efecto antimicrobiano del AEN en células libres y biopelículas de *Listeria monocytogenes* Scott A y EGDe en superficies de acero inoxidable, jitomate y aguacate.

3.2 Específicos

1. Evaluar el efecto del agua electrolizada neutra sobre células libres de *Listeria monocytogenes* Scott A y EGDe.
2. Estudiar la formación de biopelículas de *L. monocytogenes* Scott A y EGDe en placas de acero inoxidable.
3. Determinar el efecto del agua electrolizada neutra sobre biopelículas de *Listeria monocytogenes* Scott A y EGDe.
4. Evaluar el efecto de la concentración y tiempo de contacto del agua electrolizada neutra en vegetales (jitomate y aguacate).
5. Estudiar el efecto del agua electrolizada neutra sobre alimentos (jitomate y aguacate) inoculados con *Listeria monocytogenes* Scott A y EGDe.
6. Determinar el efecto del agua electrolizada neutra sobre microorganismos indicadores y de *Listeria monocytogenes* Scott A y EGDe.

4. METODOLOGÍA

4.1 Materiales

4.1.1 Materiales biológicos

Listeria monocytogenes EGDe resistente a cloranfenicol, donada por el Dr. Collin Hill, Universidad de Cork, Irlanda.

Listeria monocytogenes Scott A donada por el Dr. Scott E. Martin. Laboratorio de microbiología. Departamento de ciencia de alimentos y nutrición humana, Universidad de Illinois en Urbana- Champaign, EUA.

4.1.2 Antimicrobianos

Agua electrolizada neutra, producida por el Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico del estado de Querétaro (CIDETEQ), señalada en el resto del documento como AEN1

Agua activada DESY[®] (Grupo Ecorus AEQ S.A. de C.V.)

Solución de Hipoclorito de sodio (Cloralex[®] con 6% de cloro residual total) diluido a 120 ppm

4.1.3 Reactivos

Agar papa dextrosa (Difco) , agar para métodos estándar (Sigma Aldrich), agua peptonada (Difco) al 10%, caldo bilis verde brillante (Sigma Aldrich), caldo lauril soya tripticasa (Sigma Aldrich), cloranfenicol, suplemento selectivo para *Listeria* modificada (Oxford), agua destilada, caldo LB (Difco), solución salina 0.85% (Difco), L-lisina 0.1 mM, buffer neutralizante (Difco), Buffer de fosfatos (50mM, pH 7, Difco).

4.1.4 Equipo

Centrífuga e Incubadora

Cuenta colonias (Leica).

4.1.5 Alimentos

Jitomate variedad saladette y aguacate variedad Hass, sin lesiones físicas aparentes, de superficie firme y en estado de madurez óptimo fueron obtenidos de manera comercial en la central de abastos de la ciudad de Querétaro, Qro., México.

4.2 Método

4.2.1 Activación y preparación del inóculo de *L. monocytogenes* EGDe y Scott A

La cepa se conservó en chaquiras de vidrio a -70°C con una suspensión que contiene 10% (v/v) glicerol y 10% (v/v) leche como agentes criogénicos. Para su activación, se tomó una conserva de *L. monocytogenes* EGDe y se colocó en 10 mL de caldo LB suplementado con cloranfenicol y se incubó por 24 h a 37°C en agitación a 180 rpm. Para la activación de *L. monocytogenes* Scott A se utilizó caldo soya tripticaseína y se incubó a las mismas condiciones que *L. monocytogenes* EGDe. Finalizado el periodo de incubación se tomaron los 10 mL del caldo de *L. monocytogenes* EGDe y se resuspendieron en 90 mL de caldo LB suplementado con cloranfenicol incubándose por 24 h a 37°C en agitación a 180 rpm. Para *L. monocytogenes* Scott A el caldo no se suplementó. Al finalizar el tiempo de incubación, los 100 ml del caldo con la cepa se centrifugaron a 6500 rpm durante 15min, se removió el sobrenadante y las células se resuspendieron en un mismo volumen solución salina 0.85% estéril, y se centrifugó nuevamente para lavar las células a las mismas condiciones. La pastilla se resuspendió en 5 mL de la misma solución salina.

4.2.2 Preparación de la superficie

4.2.2.1 Superficie de acero inoxidable

Se usaron placas de acero inoxidable tipo 304, grado No. 4 (pulido mecánico, rugosidad promedio de 0.2 - 1.0 mm) de 2.54 cm de largo por 2.54 cm de ancho con una superficie total de 6.45 cm^2 . Antes de cada experimento, se lavaron con agua destilada caliente, se cepillaron con un detergente aniónico para remover

cualquier material orgánico no deseado y se enjuagaron con agua destilada. Se colocaron cuatro placas en una caja petri y se esterilizaron en autoclave por 15 min a 121°C (García y col., 2008).

4.2.3 Preparación de las soluciones de tratamiento

Para el tratamiento con células libres se utilizaron concentraciones de 30, 70 y 150 ppm de cloro libre de agua electrolizada para *Listeria monocytogenes* Scott A y EGDe.

Para el tratamiento con biopelículas, se utilizó agua electrolizada neutra referida como AEN1 a una concentración de 4000 ppm de agentes oxidantes. El AEN1 se diluyó con agua desionizada estéril para tener concentraciones de 40, 100 y 400 ppm para *Listeria monocytogenes* Scott A y concentraciones de 40, 70 y 150 ppm para *Listeria monocytogenes* EGDe.

Para los tratamientos del diseño experimental se utilizó AEN1 con una concentración de 9,747 ppm de agentes oxidantes, la cual se diluyó a concentraciones de 70, 100 y 200 ppm. El agua activada Desy® con 220 ppm de agentes oxidantes, se diluyó a concentraciones de 60 y 100 ppm.

En el tratamiento con cloro, se utilizó una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) comercial (Cloralex®) que se diluyó con agua desionizada estéril a una concentración de 120 ppm.

4.2.4 Tratamientos en células libres

Se prepararon tubos de rosca con 9 ml de AEN1 a (30, 70 y 150 ppm) de agentes oxidantes y un tubo con 9 ml de agua desionizada (HPLC) como control. Se utilizó un inóculo de 9 log UFC por ml, preparado según el apartado 4.2.1

Se colocó 1 ml del inóculo a cada tubo de las soluciones de tratamiento y control. Se evaluó el efecto de las concentraciones a los 3 y 10 minutos de tiempo de exposición para células libres.

Transcurridos los tiempos de exposición se tomó 1 ml de cada tubo de tratamiento y se transfirió a 9 ml de solución de amortiguador neutralizante Difco [que contiene una mezcla de 0.0043% (p/v) fosfato monopotásico, 0.016% (v/v) de tiosulfato de

sodio y 0.5% (p/v) de aril sulfonato] durante 10 segundos para neutralizar el cloro residual del agua electrolizada.

A continuación se realizaron diluciones decimales sucesivas y se determinó el número de población viable mediante el método de Miles-Misra (Miles y Misra, 1938) en placas de agar Oxford y LB para *L. monocytogenes* Scott A y *L. monocytogenes* EGDe respectivamente.

4.2.5 Formación de las biopelículas

4.2.5.1 Adhesión y formación de biopelículas de *Listeria monocytogenes* EGDe y Scott A

Las placas se inocularon con 100 µL del cultivo activado, resuspendido en una solución salina al 0.85%, se dispersaron en el área de tratamiento con asa de platino estéril y se colocaron en contenedores con agua estéril cerrados para mantener la humedad relativa de 100% y se incubaron a 37°C. Las placas inoculadas se lavaron cada 24 h con 10 ml del amortiguador de fosfatos (50mM, pH 7) y se alimentaron con 100 µL de medio de cultivo LB suplementado con cloranfenicol para el caso de *L. monocytogenes* EGDe, para *L. monocytogenes* Scott A el caldo no se suplementó.

4.2.6 Tratamiento de las biopelículas con agua electrolizada neutra

Las biopelículas de *L. monocytogenes* EGDe y Scott A al quinto día de su formación se sumergieron en 15 mL de agua electrolizada a diferentes tiempos y concentraciones, según lo descrito en el diseño experimental. Para el tratamiento control las biopelículas se sumergieron en 15 mL de agua desionizada estéril, posteriormente las placas tratadas se sumergieron en una solución amortiguador neutralizante (Difco) durante 10 segundos para neutralizar el cloro residual del agua electrolizada. Las placas de tratamiento control se sumergieron directamente en la solución amortiguador neutralizante durante 10 segundos.

4.2.7 Recuperación de células formadoras de la biopelícula

Las células se recuperaron por frotación con un hisopo estéril humedecido con solución salina 0.85% (p/v).

Se frotó vigorosamente el área de tratamiento con el hisopo estéril de manera vertical, horizontal y dos veces en forma diagonal y se introdujo en un tubo con 10 mL de solución salina 0.85%, se homogeneizó en vortex por 1 minuto y se realizaron diluciones seriadas.

4.2.8 Recuento de las células formadoras de biopelículas

El recuento de la población se realizó por la técnica de Miles-Misra (Miles y Misra, 1938), para la cual se tomaron 20 μ L de la dilución correspondiente y se colocaron en una caja Petri en agar LB suplementado con cloranfenicol y agar Oxford suplementado para *L. monocytogenes* EGDe y Scott A respectivamente y se incubaron por 24 horas a 37°C y posteriormente se contaron con cuenta colonias (Leica). Los ensayos de recuento se realizaron por triplicado por cada dilución.

4.2.9 Preparación e inoculación de alimentos frescos con *L. monocytogenes* EGDe y Scott A

Los jitomates y aguacates de peso similar (130-160g para jitomate y de 180-192g para el aguacate) y fueron almacenados a 5°C, hasta su experimento. Los vegetales se sumergieron en una suspensión microbiana con una concentración de 10^{10} log UFC para *L. monocytogenes* EGDe y 10^{11} log UFC para Scott A preparada con 250 ml de peptona al 0.1% durante 30 minutos. Los vegetales se dejaron secar en campana de flujo laminar durante 15 minutos.

4.2.10 Tratamiento de vegetales con agua electrolizada neutra

El vegetal se colocó en una bolsa estéril conteniendo 225ml de la solución de tratamiento (AEN1 a 70ppm y 200 ppm de cloro residual preparadas según el apartado 4.2.3) durante 3 minutos con agitación manual vigorosa, después se enjuagó con agua desionizada durante 1 minuto y se dejó secar en campana por 5 minutos para su posterior análisis.

La población inicial del vegetal se obtuvo mediante frotación o agitación manual colocando el vegetal en 225 ml de agua peptonada al 0.1% dentro de una bolsa estéril durante 5 minutos, Se realizaron las diluciones apropiadas de esta solución y se inocularon placas con medio selectivo según la cepa, como se describe en el siguiente apartado.

4.2.11 Análisis microbiológico de los vegetales

El alimento se colocó en 225 ml de peptona al 0.1%, siendo esta la solución directa dentro de una bolsa estéril frotando vigorosamente para la recuperación de células adheridas, después de ello se prepararon 6 diluciones seriadas tomando 1ml de la solución directa y transfiriéndolo a tubos con 9 ml de solución salina al 0.85%. Se inocularon placas de agar Oxford y LB (ambos suplementados según el apartado 4.2.8) para *L. monocytogenes* Scott A y EGDe respectivamente, mediante la técnica de Miles-Misra (Miles y Misra, 1938). Las cajas se incubaron durante 24 horas a 37°C.

4.3 Diseño experimental

4.3.1 Diseño experimental para evaluar el efecto bactericida de diferentes sanitizantes en aguacate y jitomate.

Se realizó un diseño experimental para evaluar el efecto de los antimicrobianos (hipoclorito de sodio, AEN1 y agua activada Desy®) sobre la superficie de vegetales (aguacate y jitomate comprados en la central de abastos de la ciudad de Querétaro, Qro.).

El diseño estadístico utilizado tomó en cuenta 4 factores, concentración AEN 1 con 3 niveles, concentración AEN Desy con 2 niveles, (NaClO) con 1 nivel y tiempo con dos niveles (Cuadro 2). Para encontrar las concentraciones adecuadas de uso en los alimentos estudiados, que permita la eliminación de la población bacteriana.

Cuadro 2. Factores y niveles a evaluar en los tratamientos con jitomate y aguacate

Agente Desinfectante	Concentración de cloro libre	Tiempo
Agua	0 ppm	3 minutos
Desy	60 ppm	
	100 ppm	
AEN1	70 ppm	5 minutos
	100 ppm	
	200 ppm	
NaClO	120 ppm	

Para todos los tratamientos indicados en el Cuadro 3 para jitomate y aguacate, se siguió la siguiente metodología.

El vegetal entero se colocó en una bolsa estéril (unidad experimental) con 225 ml del antimicrobiano agitando vigorosamente (sin generar daños mecánicos) durante el tiempo de exposición marcado por el diseño experimental. Pasado el tiempo de contacto el vegetal se sumergió en 225 ml de agua desionizada en condiciones estériles para neutralizar el cloro residual. Se dejó secar el vegetal en campana de flujo laminar durante 5 min, seguido de esto se colocó con 225 ml de agua peptonada dentro de bolsa estéril y se agitó vigorosamente durante 5 min.

Se realizaron diluciones seriadas tomando 1 ml de la solución directa (agua peptonada). El tratamiento control se realizó sustituyendo el agente desinfectante con agua desionizada estéril y se expuso durante los tiempos de contacto marcados por el tratamiento. La variable de respuesta fue la población de microorganismos detectada, después del proceso de sanitización.

Cuadro 3. Tratamientos del diseño experimental para jitomate y aguacate.

Tratamiento	Concentración (ppm)	Tiempo (min)
1	Control	5
2	100 Desy	5
3	120 NaClO	3
4	100 Desy	3
5	60 Desy	5
6	Control	3
7	120 NaClO	5
8	60 Desy	3
9	200 AEN1	5
10	70 AEN1	3
11	70 AEN1	5
12	100 AEN1	3
13	200 AEN1	3
14	100 AEN1	5

4.3.2 Determinación de bacterias mesófilas aerobias (BMA)

Después de la inoculación de las diluciones de las muestras preparadas según el apartado 4.3.1, en las cajas Petri, se agregaron de 12 a 15 ml del agar para métodos estándar, siguiendo la técnica de vaciado en placa descrita en la NOM-092-SSA1-1994. Se incubaron las cajas en posición invertida durante 48 h a 37°C.

4.3.3 Determinación de hongos y levaduras

Después de la inoculación de las diluciones de las muestras preparadas según el apartado 4.2.9, en las cajas Petri, se agregaron de 12 a 15 ml del agar Papa dextrosa siguiendo la técnica de vaciado en placa descrita en la NOM-111-SSA1-1994. Se incubaron las cajas en posición invertida durante 5 días a 25±2°C.

4.3.4 Determinación de coliformes totales por número más probable (NMP)

4.3.4.1 Prueba presuntiva

Se inocularon tres tubos del medio lauril sulfato triptosa con 1 ml de la muestra preparada según el apartado 4.2.9. Los tubos se incubaron a $35 \pm 0,5$ °C por 24 ± 2 horas, pasado este tiempo se observaron los tubos para ver formación de gas, en caso contrario se prolongó la incubación hasta 48 ± 2 horas.

4.3.4.2 Prueba confirmativa

De cada tubo que mostró formación de gas, se tomó una azada y se sembró en un número igual de tubos con caldo bilis verde brillante que se incubaron a $35 \pm 0,5$ °C por 24 ± 2 horas, si la formación de gas no fue observada en este tiempo, se prolongó la incubación por 48 ± 2 horas.

Para el conteo de coliformes totales se utilizó la tabla del número más probable (NMP) para serie de 3, que se encuentra descrita en la NOM-112-SSA1-1994.

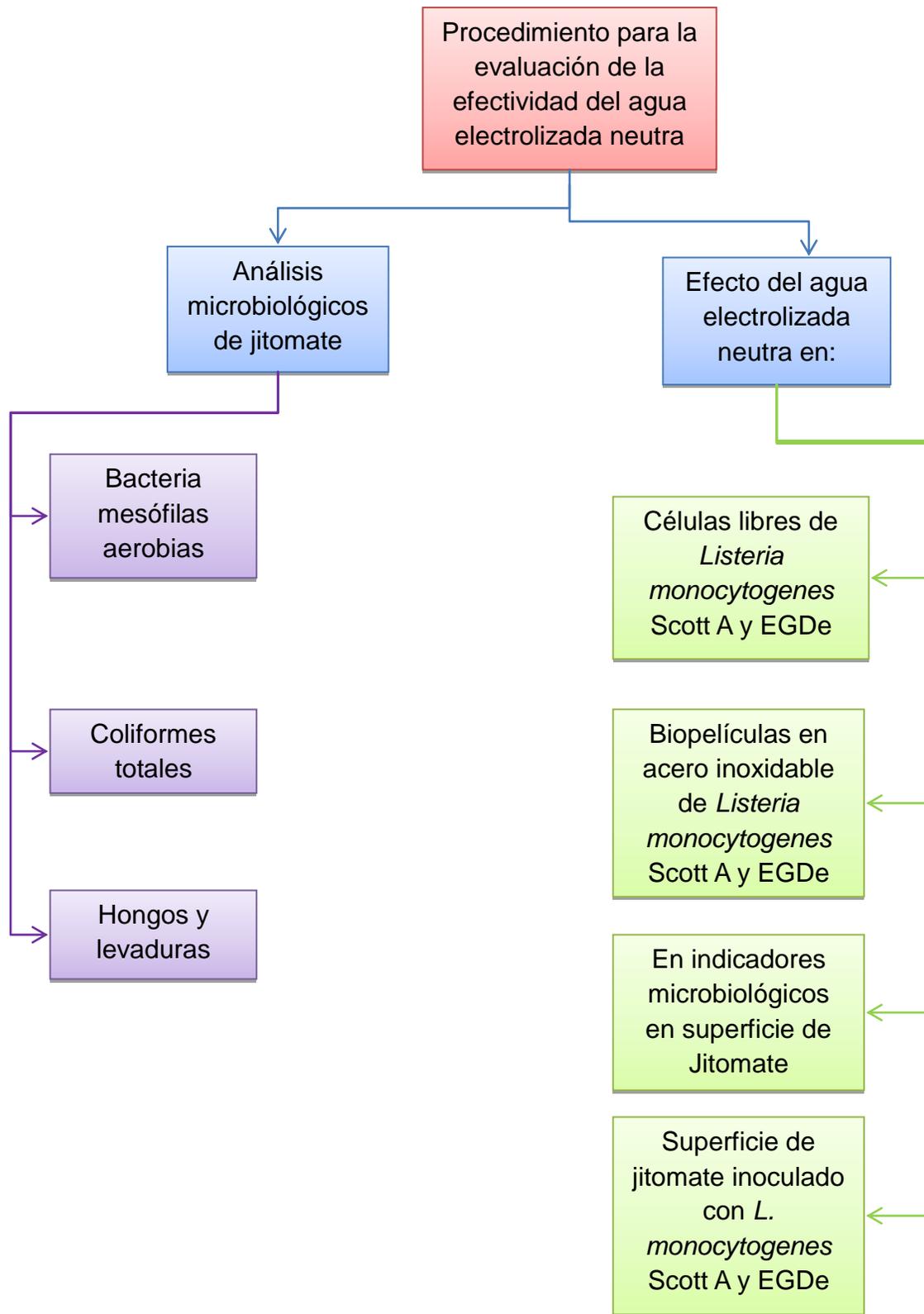


Figura 3. Esquema de actividades utilizando como modelo de estudio el jitomate (realizado por Mercado Hurtado Martha Edith)

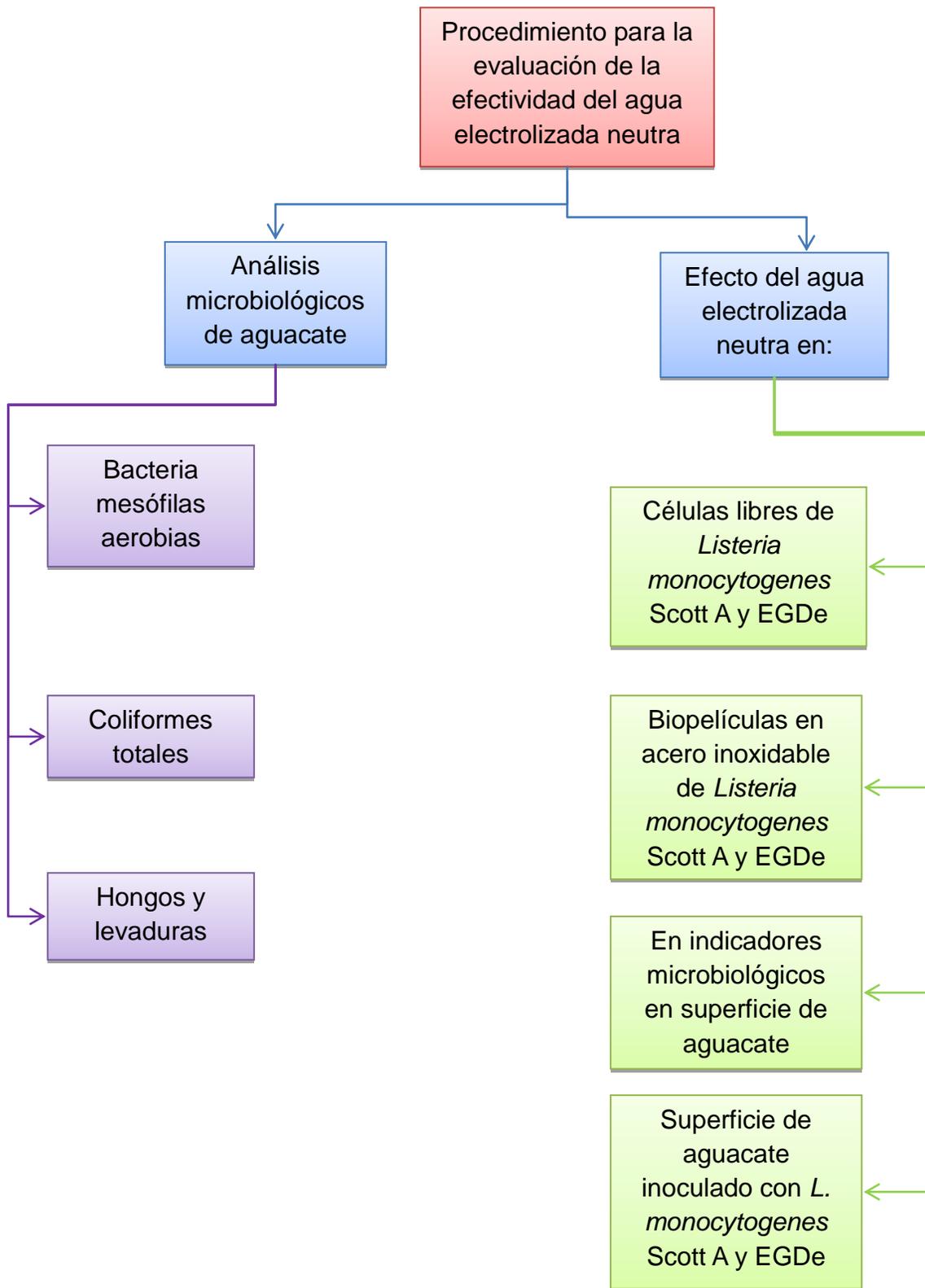


Figura 4. Esquema de actividades utilizando como modelo de estudio el aguacate (realizado por Bautista Bautista Yesenia)

5. RESULTADOS

5.1 Efecto del agua electrolizada neutra sobre células libres de *L. monocytogenes* Scott A y EGDe.

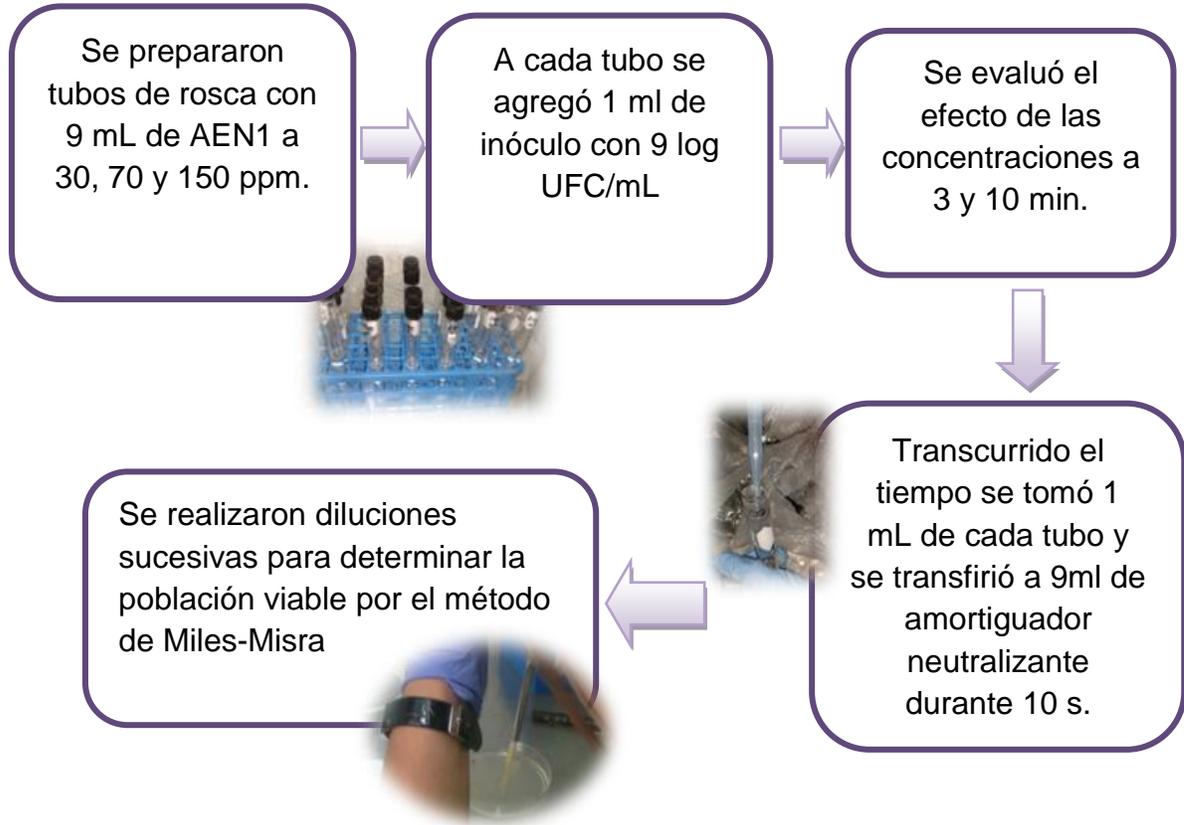


Figura 5. Diagrama de flujo para la evaluación del efecto de AEN1 sobre células libres.

Hallazgos recientes han posicionado al agua electrolizada neutra como un desinfectante efectivo contra microorganismos patógenos (Kim, 2000). El alto potencial oxido-reducción presente en este tipo de agua altera la membrana celular externa, facilitando la transferencia de HOCl a través de la membrana, resultando en una oxidación adicional en reacciones intracelulares y en vías de respiración tales como el par redox glutatión- glutatión disulfuro (Liao y col., 2007).

El uso del agua electrolizada neutra minimiza además los riesgos a la salud humana y la corrosión de superficies, causados por el cloro, debido a su pH neutro.

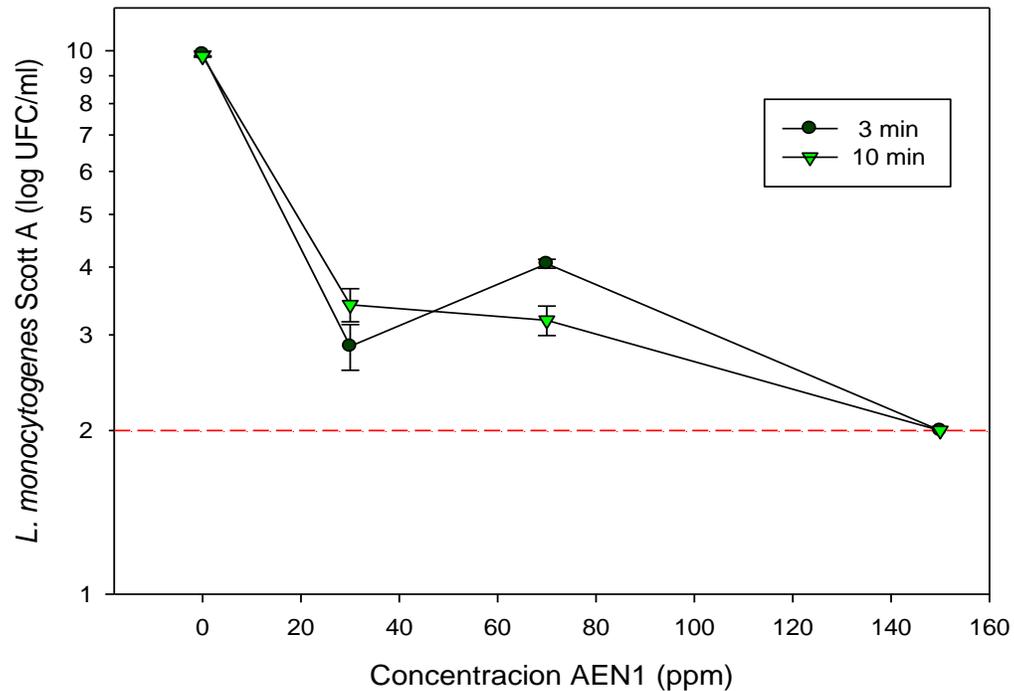


Figura 6. Cinética de células libres de *L. monocytogenes* Scott A

Como se puede observar en la gráfica (Figura 6) para *L. monocytogenes* Scott A se partió de un inóculo inicial de aproximadamente de 10 log UFC/mL y se obtuvo una reducción de alrededor de 7 log a una concentración de 30 ppm de AEN1 a 3 min y de 6.4 log a 10 min. También se observa un incremento de alrededor de 1 log a las 70 ppm en 3 min de contacto, presentando inhibición total a partir de 150 ppm, sin diferencia significativa a los 3 y 10 minutos de tiempo de contacto.

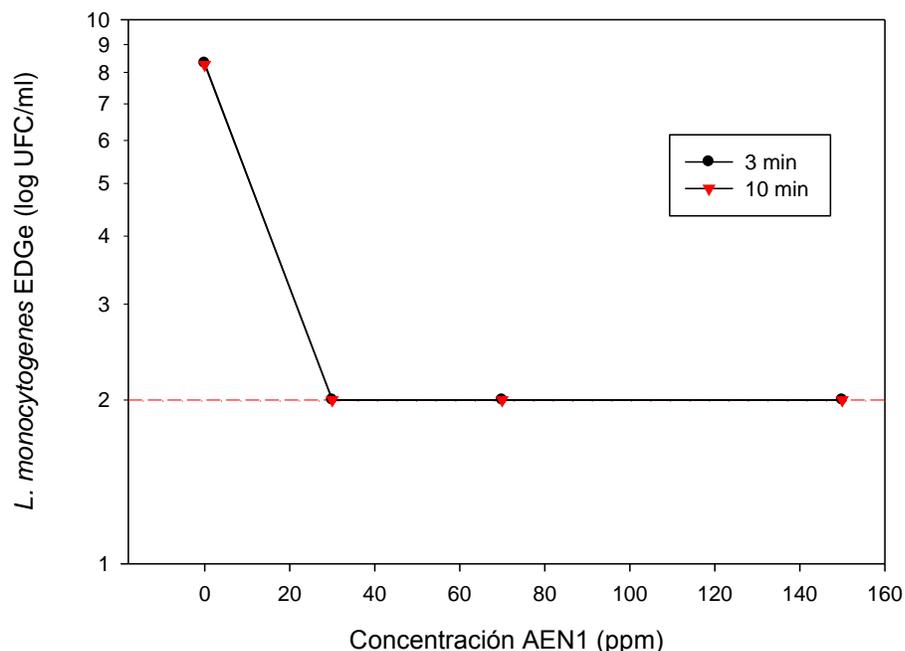


Figura 7. Cinética de células libres de *L. monocytogenes* EGDe

En el caso de *L. monocytogenes* EGDe, se partió de un inóculo de 8.2 log UFC/mL, se encontró una mayor sensibilidad al AEN1 teniendo inhibición total a partir de la menor concentración utilizada, siendo ésta de 30 ppm, teniendo el mismo comportamiento independientemente del tiempo de exposición (Figura 7).

5.2 Formación de biopelículas de *L. monocytogenes* Scott A y EGDe en placas de acero inoxidable

Existen microorganismos patógenos capaces de adherirse y crecer en superficies en contacto con ellos como *Salmonella enteritidis*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* formando biopelículas. Esto es de suma importancia en la industria de alimentos ya que representa un importante problema que dificulta y perjudica las operaciones y procesos (Navia y col., 2010).

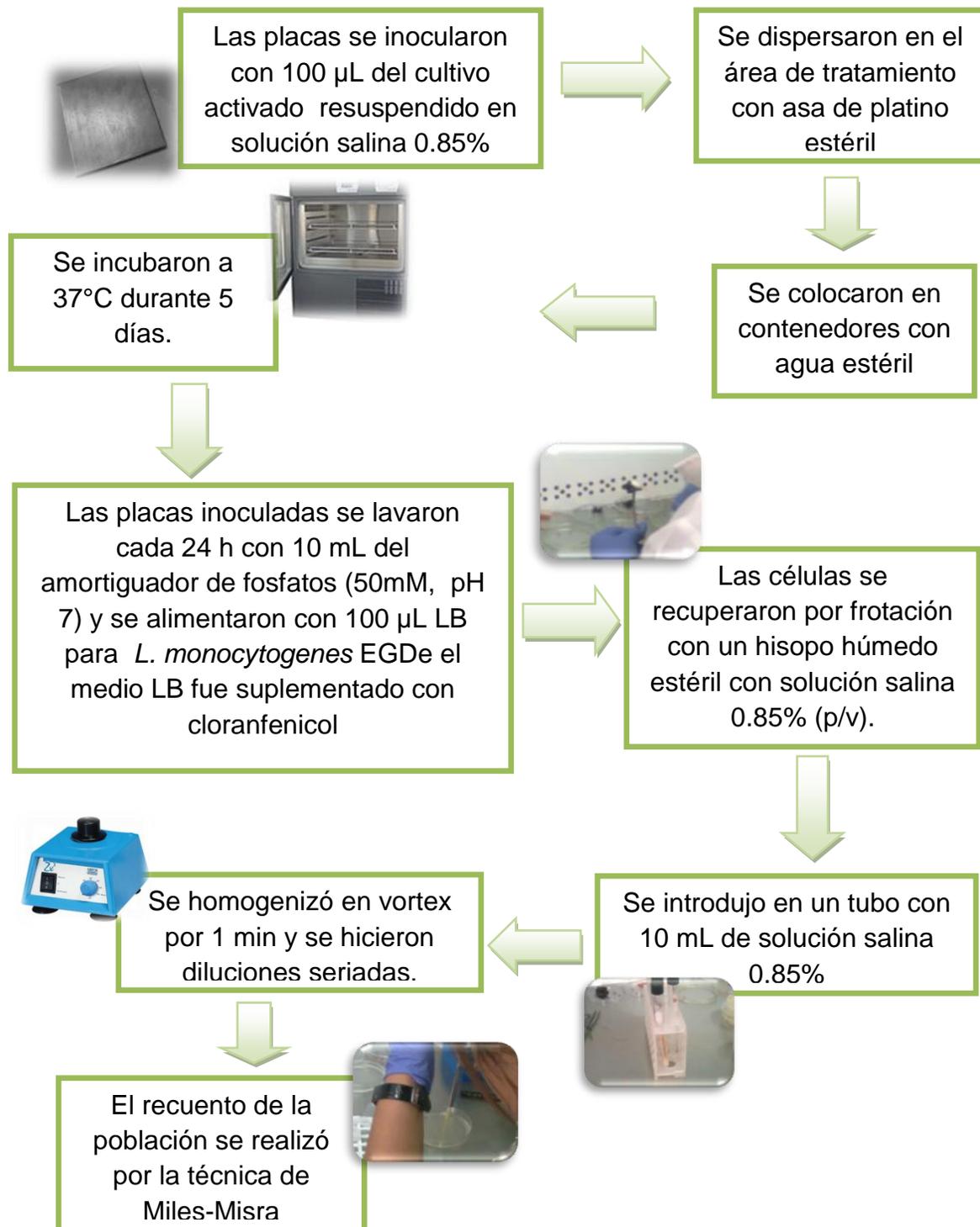


Figura 8. Diagrama de flujo para la formación de biopelículas de *L. monocytogenes* Scott A y EGDe.

Se ha demostrado que los microorganismos adheridos pueden ser más resistentes que su forma libre a compuestos sanitizantes. Considerando que células viables permanecen y son transferidas a los alimentos, puede ocasionar un importante impacto negativo en la calidad de almacenamiento y seguridad de los alimentos (Hood y Zottola, 1995).

Las placas de acero inoxidable fueron inoculadas con 2 cepas distintas de *L. monocytogenes*, Scott A y EGDe, en condiciones controladas de tiempo y temperatura, de tal forma que se pudiera favorecer la adhesión de dicho microorganismo. La adhesión en las placas de acero de ambas cepas fue de 5.69 log para *L.monocytogenes* Scott A y 5.61 para *L. monocytogenes* EGDe después de cinco días (Cuadro 4).

Cuadro 4. Formación de biopelículas de *L. monocytogenes* Scott A y EGDe en placas de acero inoxidable.

<i>L. monocytogenes</i>	Inóculo (log)	Adhesión (log)
Scott A	8.86	5.69
EGDe	8.23	5.61

5.3 Efecto del agua electrolizada neutra sobre biopelículas de *L. monocytogenes* Scott A y EGDe.

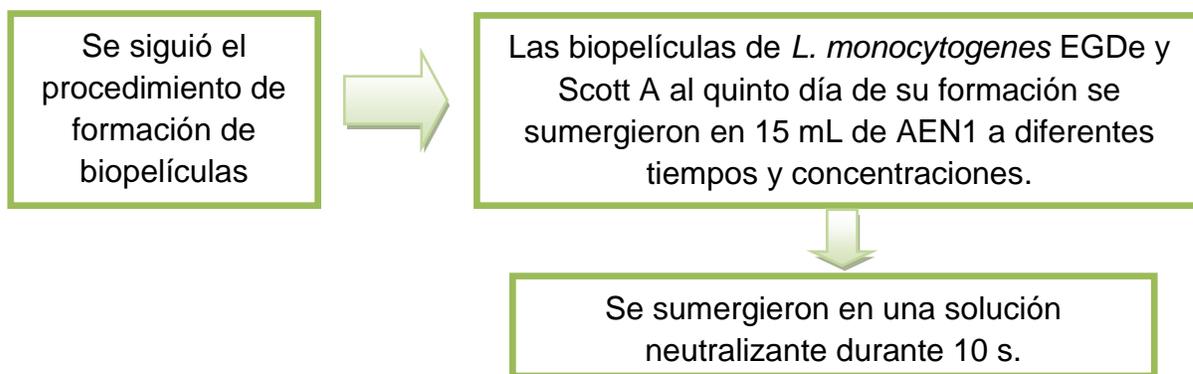


Figura 9. Diagrama de flujo para el tratamiento de biopelículas de *L. monocytogenes* Scott A y EGDe en placas de acero.

Se utilizó el agua electrolizada neutra como desinfectante, para la eliminación de biopelículas en placas de acero inoxidable en los dos tiempos, 3 y 10 min, los cuales arrojaron comportamientos similares en las dos cepas.

Para *L. monocytogenes* Scott A se utilizó concentraciones de 40, 100 y 400 ppm de AEN1. En 40ppm no hubo una disminución significativa en ninguno de los dos tiempos establecidos, la mayor efectividad del AEN1 se puede observar en 400ppm en donde hay una inactivación de cerca de 4 log a niveles no detectables tanto en 3 como en 10 min de exposición (Figura 10).

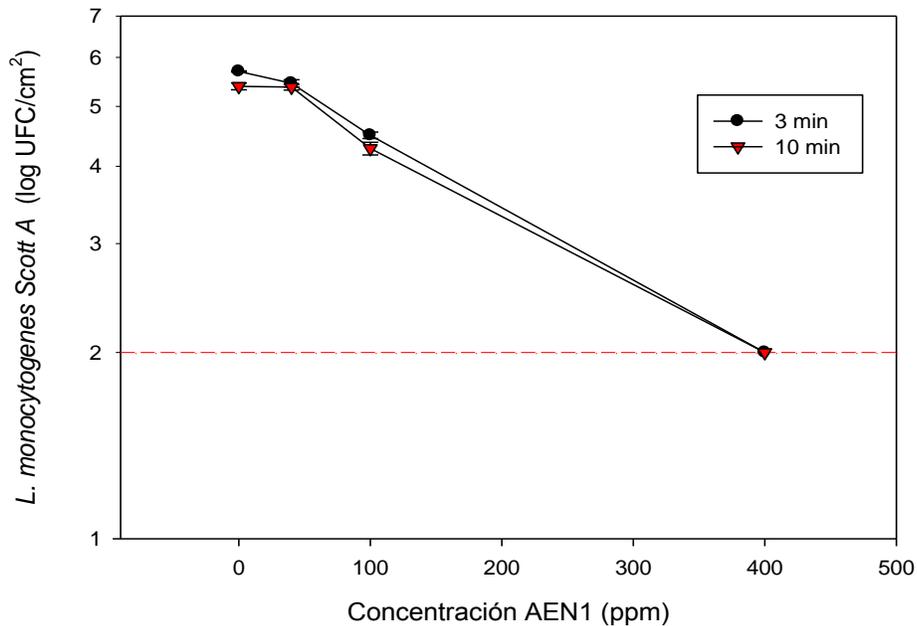


Figura 10. Cinética de biopelículas de *L. monocytogenes* Scott A utilizando AEN 1

Para *L. monocytogenes* EGDe se utilizaron concentraciones menores de AEN1, 40, 70 y 150 ppm, por ser más susceptible a los agentes desinfectantes debido a su modificación genética se puede observar un disminución de 1.8 y 2.7 log en 3 y 10 min respectivamente para la concentración de 40 ppm y para el resto de las concentraciones, 70 y 150 ppm, hay una inactivación total en los 2 tiempos (Figura 11).

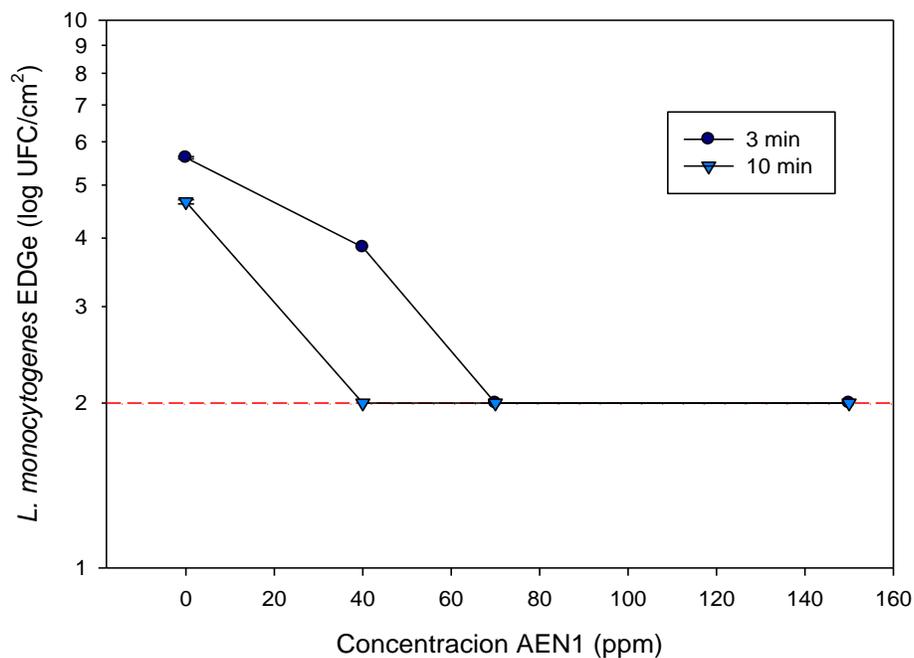


Figura 11. Cinética de biopelículas de *L. monocytogenes* EGDe utilizando AEN1

5.4 Evaluación del efecto de la concentración y tiempo de contacto del agua electrolizada neutra en vegetales (jitomate y aguacate)

Los 2 vegetales, aguacate y jitomate, se sometieron a diferentes tratamientos con diversos agentes desinfectantes a distintas concentraciones (AEN 1, AEN Desy, NaCl y tiempo de exposición) para evaluar su efecto mediante el diseño experimental descrito y de esta manera encontrar las concentraciones adecuadas de uso en los alimentos estudiados (Figura 12).

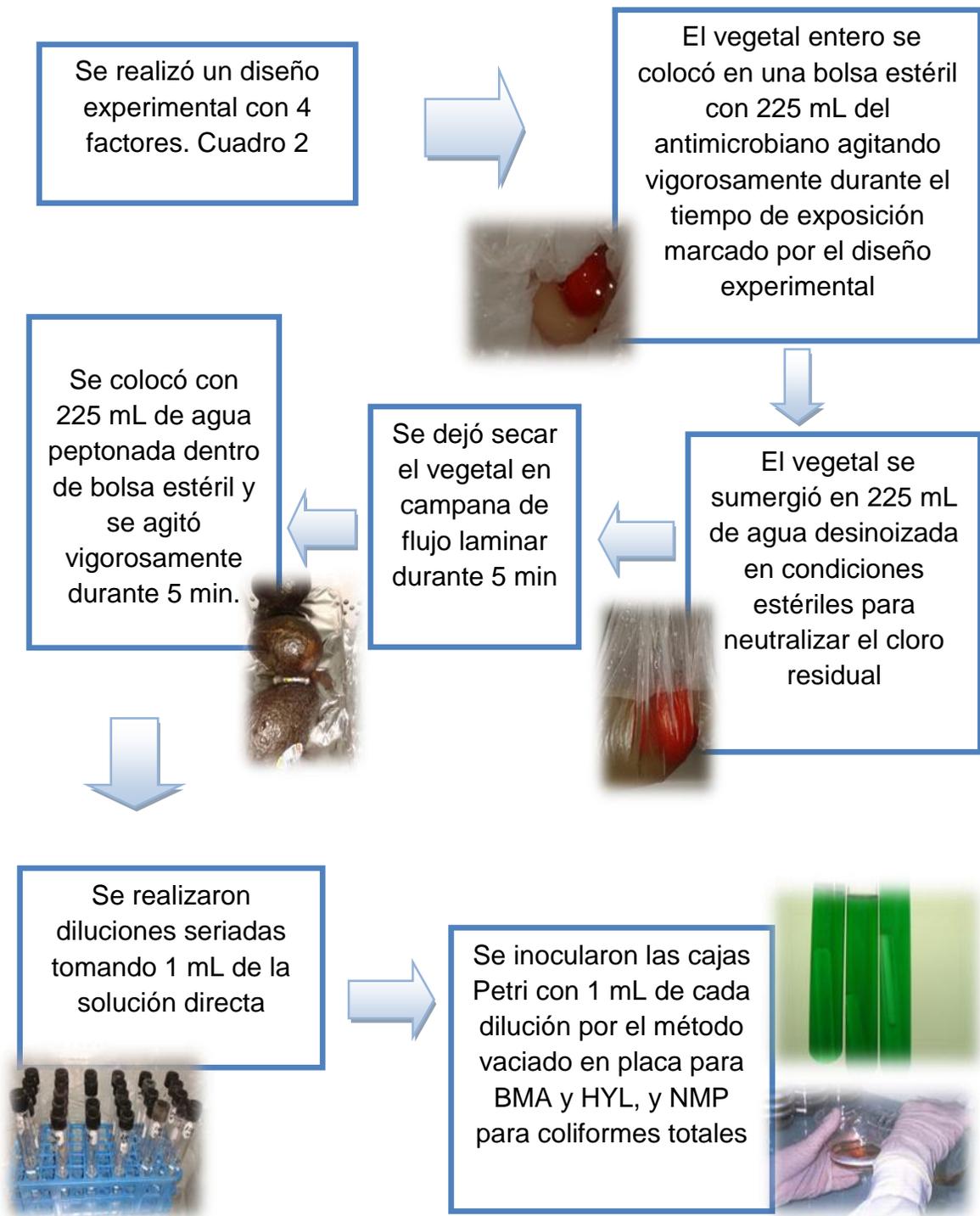


Figura 12. Diagrama de flujo del diseño experimental

La población inicial de BMA en el jitomate fue de 5.1 y 5.2 log UFC/unidad. En la figura 13 se puede ver la población de BMA con los distintos tratamientos a los 2 tiempos determinados. Para el tratamiento con agua, la población de BMA fue de 4.3 y 2.3 log, en 5 y 3 min respectivamente. Solo presentó crecimiento en 5 min en los tratamientos de Desy 100 ppm 2.2 log y Desy 60 ppm 3.4 log, en el tiempo de 3 min no se presentó crecimiento en ninguno de los tratamientos.

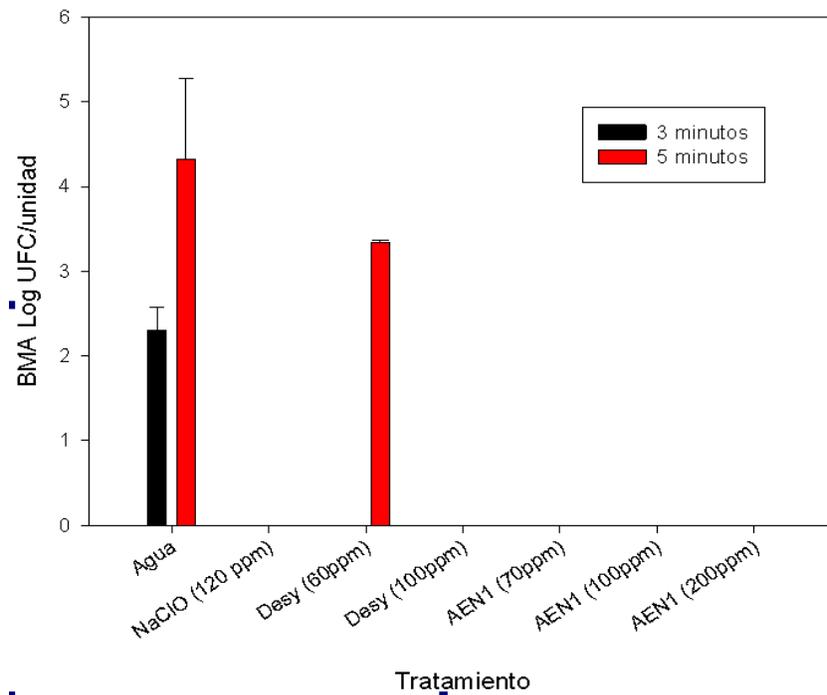


Figura 13. Población de bacteria mesófilas aerobias (BMA) en jitomate después del tratamiento de sanitización.

Para hongos y levaduras no hubo crecimiento en ninguno de los casos y para coliformes totales 3.6 NMP/unidad con el tratamiento de agua en 5min, 460 NMP/unidad en NaClO 100ppm en 3 min y 15 NMP/unidad en AEN170ppm en 3 min.

Para el aguacate se encontró una población inicial de BMA alrededor de 5.2 y 5.2 log UFC/unidad. Como se muestra en la figura 14 se obtuvo una población de 4.4 y 3.2 log UFC/unidad a los 3 y 5 min respectivamente, para el tratamiento con agua,

a 60ppm de agua electrolizada Desy se obtuvo una población de 2.2 log UFC/unidad a los 5 min, y a 100 ppm del mismo desinfectante se tuvo 2.2 log UFC/unidad a los 3 min de contacto como resultado al tratamiento de desinfección. Para el resto de concentraciones no se presentó población en ninguno de los dos tiempos.

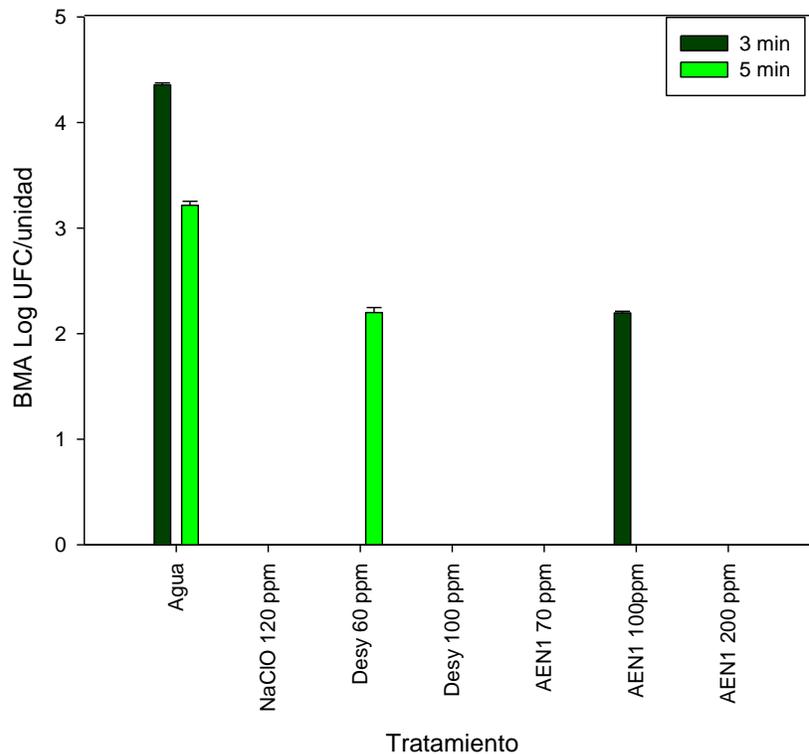


Figura 14. Población de BMA en aguacate después del tratamiento de sanitización.

La determinación de población inicial para hongos y levaduras en aguacate fue de 2.1 y 2.2 log UFC/unidad. La población detectada en el tratamiento de Desy 60 ppm fue de 2.3 log y en AEN1 70ppm de 2.2 log. No se presentó crecimiento en el resto de los tratamientos en ninguno de los 2 tiempos (Figura 15).

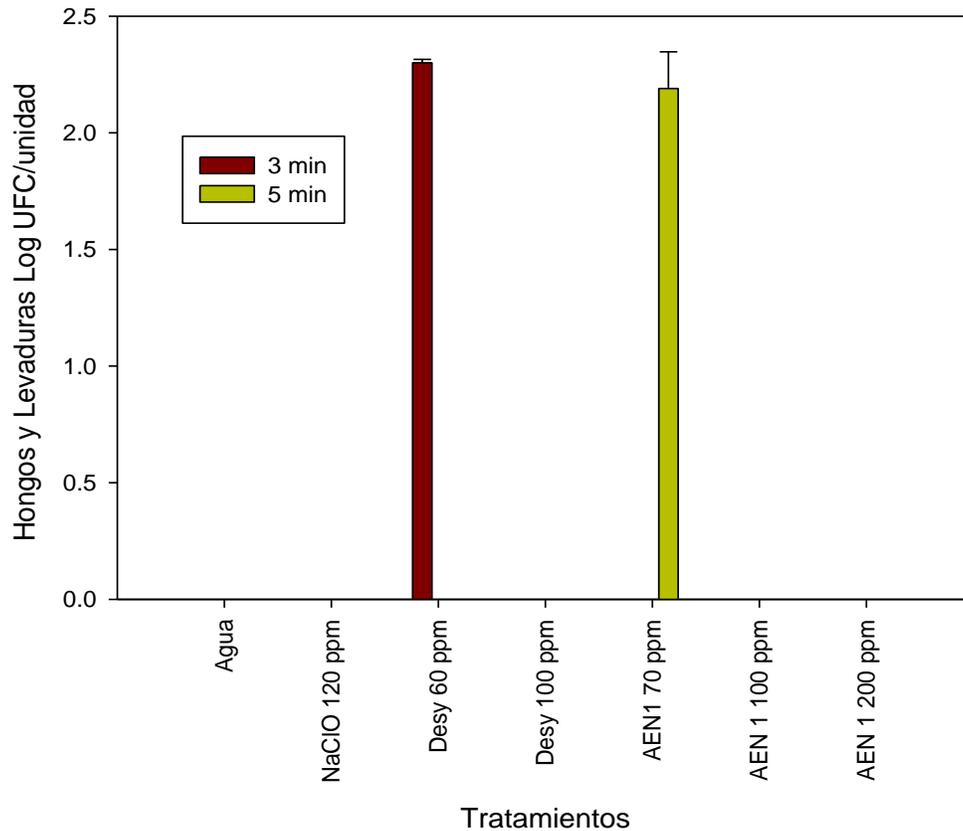


Figura 15. Población de Hongos y levaduras en aguacate después del tratamiento de sanitización.

Los microorganismos coliformes totales detectados inicialmente en el aguacate fueron aproximadamente 93 NMP CT/unidad. Se presentó población después del tratamiento de desinfección en 5 min en agua de 9.2, en AEN1 70ppm de 150 y AEN1 100ppm de 1100 NMP CT/unidad y en 3 min en NaClO de 1100 y en AEN1 100 ppm de 11 NMP CT/unidad (Figura 16).

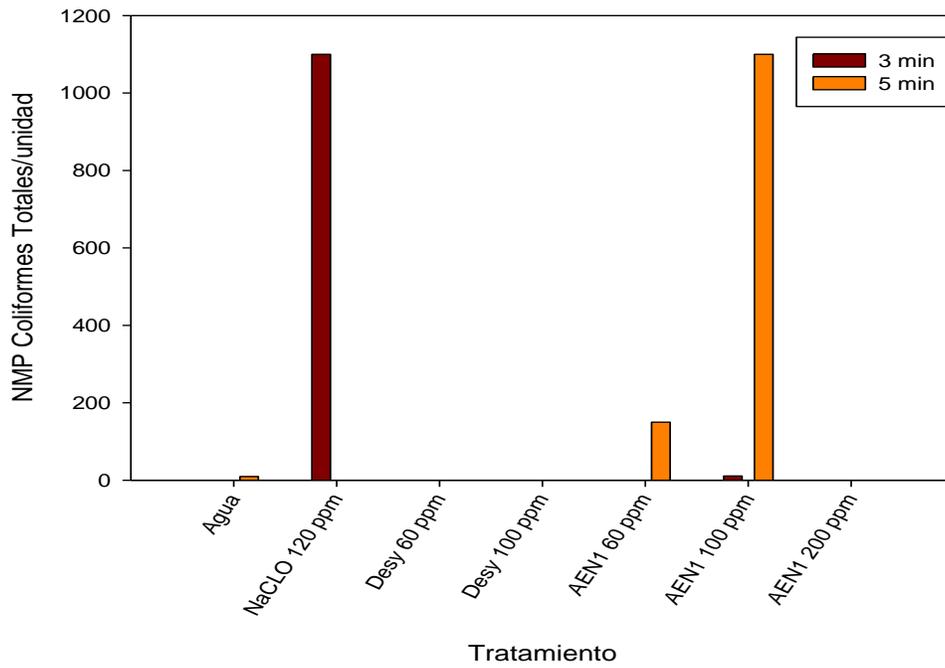


Figura 16. Población de coliformes totales en aguacate después del tratamiento de sanitización.

5.5 Efecto del agua electrolizada neutra sobre alimentos (jitomate y aguacate) inoculados con *Listeria monocytogenes* Scott A y EGDe.

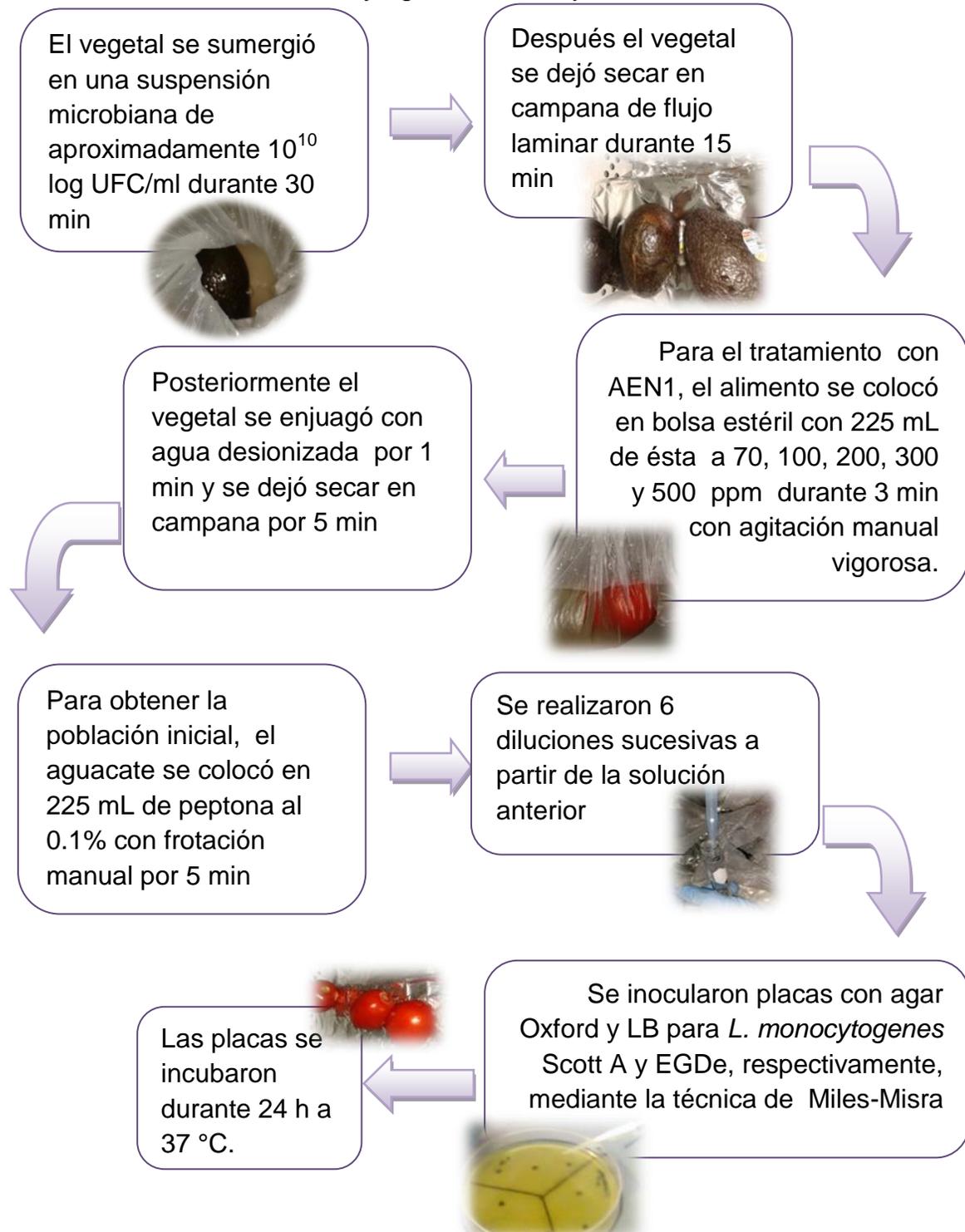


Figura 17. Diagrama de flujo para la evaluación del efecto del AEN1 en vegetales inoculados.

El agua electrolizada neutra (AEN) ha demostrado su eficacia en diferentes superficies vegetales para reducir microorganismos patógenos como *E. coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* y *Listeria monocytogenes* (Deza y col., 2003).

Por ello en el presente trabajo, se inocularon muestras de aguacate y jitomate, con dos cepas distintas de *L. monocytogenes*, siendo éstas Scott A y EGDe, con la finalidad de evaluar el efecto del AEN1 sobre esta contaminación y determinar así la concentración y tiempo de contacto recomendable para una desinfección adecuada de estos vegetales que permita su consumo seguro.

Se utilizaron concentraciones de AEN1 70, 100 y 200 ppm para ambos vegetales y para aguacate se incluyeron dos concentraciones más de 300 y 500 ppm para las 2 cepas de *L. monocytogenes*, Scott A y EGDe, con un tiempo de exposición de 3 min.

Para el caso del jitomate se puede observar en la gráfica (Figura 18) que la adhesión de *L. monocytogenes* Scott A fue de 6.08 log UFC/unidad, habiendo una disminución importante de casi 3 log en la mínima concentración, 70 ppm, donde se observa después un pequeño incremento de menos de 1 log a 100ppm y llegando a niveles no detectables a 200 ppm.

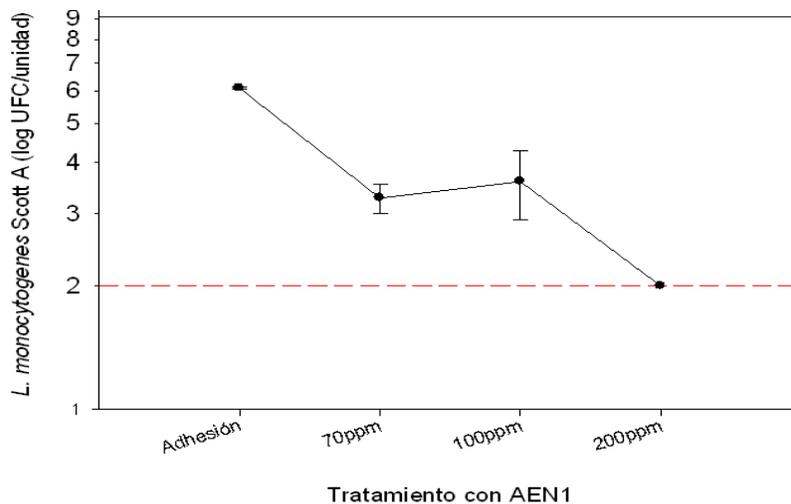


Figura 18. Efecto del AEN1 en jitomate inoculado con *L. monocytogenes* Scott A a 3 min de tiempo de contacto.

En el caso de *L. monocytogenes* EGDe la adhesión fue menor, siendo de 4.61 log UFC/mL, la efectividad del AEN1 tuvo un efecto desinfectante mucho mayor, en donde desde 70 ppm llega a niveles no detectables (Figura 19).

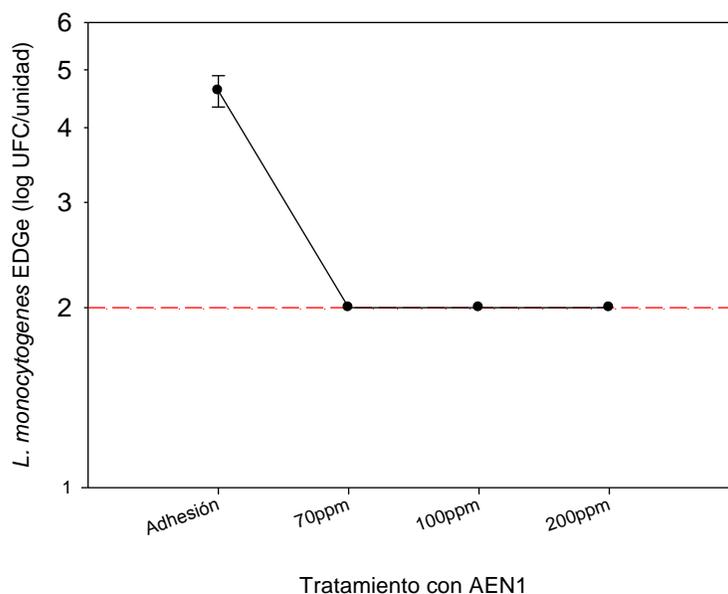


Figura 19. Efecto del AEN1 en jitomate inoculado con *L. monocytogenes* EGDe a 3 min de tiempo de contacto.

La adherencia de *Listeria monocytogenes* Scott A en la superficie del aguacate fue de 6.23 log UFC/unidad, teniendo una reducción de aproximadamente 2.5 log a 70 ppm del AEN1, incrementándose de acuerdo al aumento en la concentración, excepto a 100 ppm. A 500 ppm se logró reducir hasta su límite detección (Figura 20).

La población adherida de *L. monocytogenes* EGDe en la superficie de aguacate fue de 4.75 log UFC/unidad, al igual que *L. monocytogenes* Scott A, la población disminuyó con el aumento de concentración, exceptuando el resultado obtenido con 100 ppm, teniendo un incremento respecto a 70 ppm. El comportamiento fue muy similar al obtenido con la otra cepa, teniendo reducción hasta límites de detección a 300 ppm (Figura 21).

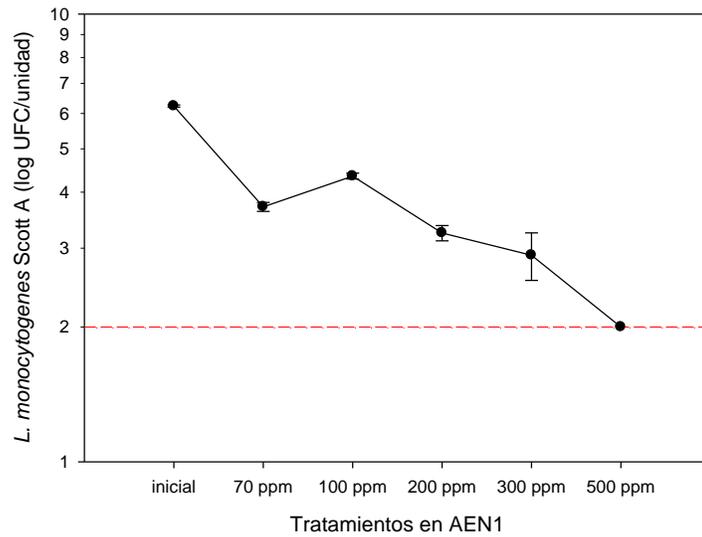


Figura 20. Efecto del AEN1 en aguacate inoculado con *L. monocytogenes* Scott A a 3 min de tiempo de contacto.

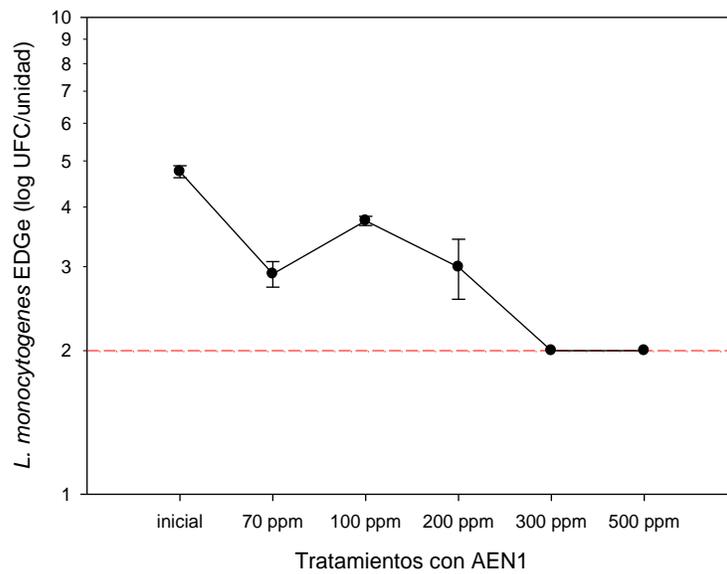


Figura 21. Efecto del AEN1 en aguacate inoculado con *L. monocytogenes* EGDe a 3 min de tiempo de contacto.

6. DISCUSION

6.1 Efecto del agua electrolizada neutra sobre células libres de *Listeria monocytogenes* Scott A y EGDe.

Listeria monocytogenes es un género bacteriano que se adapta fácilmente a cambios ambientales y a condiciones químicas y físicas, por ello a generado una resistencia a desinfectantes de uso frecuente en las industrias de alimentos, con la realización de este trabajo se muestra el AEN1 como una opción efectiva para la inhibición de esta bacteria, puesto que su actividad antimicrobiana se debe a un efecto combinado entre el ORP y los compuestos oxidantes. Por un lado el ORP daña la membrana celular y desactiva los mecanismos de defensa de las bacterias y el HClO penetra en el interior de la célula (Cadena, 2011).

Los resultados encontrados, mostraron la eficacia del efecto bactericida del agua AEN1 para lo cual se utilizaron diferentes concentraciones en 2 tiempos, para observar el comportamiento en la reducción de dos distintas cepas de *Listeria monocytogenes*, sienta estas Scott A y EGDe, se obtuvo mayor influencia en la disminución de estas cepas con la concentración de los agentes oxidantes en el AEN1, mostrando comportamientos similares en los dos tiempos evaluados de 3 y 10 minutos.

Para *L. monocytogenes* Scott A se obtuvo una reducción de alrededor de 6.8 log a una concentración de 30 ppm de AEN1, presentando inhibición total con 150 ppm, sin diferencia significativa a los 3 y 10 minutos de contacto. Estos resultados son similares con los obtenidos por Arévalos y col. (2011), donde encontró una reducción de aproximadamente 7 log, para esta misma cepa en tiempos de exposición de hasta 2 minutos, utilizando agua electrolizada, generada por la empresa Ecorus®.

Otros estudios realizados por Liu y col. (2006) con AEA (50ppm de cloro, OPR: 1150mV, pH 2.5) mostraron una reducción de más de 8 log, teniendo una concentración inicial de 3.0×10^9 UFC/mL hasta llegar a 10UFC/mL después de 5 s de exposición, y a niveles no detectables a los 10 s.

Así mismo en un estudio realizado por Abadias (2008), donde se evaluó el efecto de AEN con pH aproximadamente de 8, a concentraciones de 48 ppm, 89 ppm y NaClO 120 ppm en tres tiempos 1,3 y 5 minutos de exposición se obtuvieron resultados de reducción para *L. innocua*, mayor a los 5.5 log en todos los casos. También en este estudio se realizó un ensayo a 30 ppm, obteniéndose una reducción de aproximadamente 2.5 en todos los tiempos. Cuando la población inicial era de 10^8 log UFC/ml.

Como se pudo observar para *L. monocytogenes* EGDe, se encontró que respecto a Scott A es una cepa que presenta mayor sensibilidad al AEN teniendo inhibición total a partir de la menor concentración utilizada, siendo ésta la de 30 ppm, teniendo el mismo comportamiento independientemente del tiempo de exposición. Lo anterior puede deberse a la modificación genética de esta cepa, la cual le brinda bioluminiscencia, lo cual podría hacerla más susceptible. En un estudio realizado por Cadena (2011) a una concentración de 9ppm de AEN con un tiempo de exposición de 1 min se logró llegar a niveles no detectables. La diferencia entre nuestros resultados para ambas cepas se puede deber a las características del agua, de acuerdo a su fabricación.

6.2 Estudio de la formación de biopelículas de *L. monocytogenes* Scott A y EGDe en placas de acero inoxidable.

Listeria monocytogenes tiene la capacidad de formar biopelículas, y como se ha mencionado anteriormente, es una forma de 100 a 1000 veces más resistente que el cultivo puro. Por lo anterior genera un gran inconveniente para la industria de alimentos, para la limpieza y sanitización de los equipos, se han utilizado diversos desinfectantes, sin embargo debido a sus diversas características ocasionan corrosión a los equipos o en otros casos algunos de ellos dejan residuos que pueden ser nocivos a la salud humana.

La formación de biopelículas ha sido estudiada en trabajos anteriores. Hilbert y col. (2003) utilizaron superficies de acero inoxidable, en donde partieron de un número de células en suspensión de 7.1×10^6 UFC/ml de *L. monocytogenes*, obtuvieron una adhesión en la superficie de entre 10^6 y 10^7 log UFC/cm² después de 8 horas

de incubación. En el estudio de Arevalos y col. (2011) la adhesión de las células de *Listeria* fue de 6 log UFC/cm² después de 4 días de la colonización con un inóculo inicial de 9 log.

Con la realización de este trabajo se pudo constatar la formación de biopelículas en placas de acero inoxidable, las cuales fueron inoculadas con 2 cepas distintas de *L. monocytogenes*, Scott A y EGDe, en condiciones controladas de tiempo y temperatura de tal forma que se pudiera favorecer la adhesión de dicho microorganismo. La adhesión en las placas de acero de ambas cepas fue cerca de 6 log, siendo de 5.69 log para *L. monocytogenes* Scott A y 5.61 para *L. monocytogenes* EGDe. Como se puede observar la cantidad de células adheridas en este tipo de superficie es similar en los estudios mencionados.

6.3 Efecto del agua electrolizada neutra sobre biopelículas de *Listeria monocytogenes* Scott A y EGDe.

Varios factores pueden reducir el efecto del desinfectante sobre los microorganismos, como lo es la presencia de materia orgánica o la formación de biopelículas, este último factor es el estudiado en este trabajo.

Fue utilizada el AEN1 para la eliminación de biopelículas en superficies de acero inoxidable, en lo cual se obtuvieron resultados positivos después de someterlas a diferentes concentraciones y tiempos de exposición, en dos cepas distintas de *L. monocytogenes*, Scott A y EGDe.

Al observar los resultados obtenidos en la eliminación de *L. monocytogenes* en células libres se decidió tomar concentraciones mayores para Scott A ya que mostró mayor resistencia al desinfectante, en el caso *L. monocytogenes* EGDe las concentraciones del AEN1 fueron similares a las utilizadas en células libres.

La concentración de AEN1 efectiva para la eliminación de *L. monocytogenes* Scott A fue la de 400ppm en donde se pudo observar niveles no detectables, habiendo una reducción final de aproximadamente 4 log UFC/cm² para ambos tiempos de exposición, 3 y 10 min. En estudios anteriores (Arevalos y col., 2011), se vio una reducción de hasta 6.5 log con una concentración de 65ppm de AEN de marca Ecorus® con esta misma cepa. En los estudios realizados por Liu y col (2006) con

AEA (50ppm de cloro, OPR: 1150mV, pH 2.5) se obtuvo una reducción en placas de acero inoxidable de 3.73 log UFC/cm² después de 5 min de exposición. Los resultados en este experimento arrojaron datos similares a los obtenidos en nuestro estudio.

Debido a la susceptibilidad de la cepa de *L. monocytogenes* EGDe mostrada frente al agente desinfectante se utilizaron concentraciones menores de AEN1, 40, 70 y 150ppm. Se logró una eliminación del crecimiento total desde 70 ppm en ambos tiempos de exposición. Estos resultados son similares a los obtenidos por Cadena (2011) donde trabajó con esta cepa de *Listeria* en donde a esta misma concentración (70ppm) se llegó a niveles no detectables con una exposición de 15 y 20min. A concentraciones menores de 28, 30 y 37ppm presentó una variación en los resultados dado que a 28ppm reportó una reducción de 4 log, habiendo un pequeño incremento en la población a las concentraciones de 30 y 37ppm. Los resultados anteriores posiblemente fueron atribuidos al efecto bacteriostático del AEN, lo cual puede explicarse a que posiblemente las células de la bacteria llegan a adquirir resistencia al tratamiento recibido y las células sobrevivientes nuevamente se empiezan a multiplicar. Por ello es importante encontrar la concentración adecuada para que el AEN tenga un efecto bactericida.

6.4 Efecto de la concentración y tiempo de contacto del agua electrolizada neutra en vegetales (jitomate y aguacate).

Para evaluar la concentración de diferentes agentes sanitizantes en dos vegetales, aguacate y jitomate, se realizó un diseño experimental con 4 factores: AEN1, AEN marca Desy, NaClO y tiempo, para comprobar su efectividad bactericida frente a la flora nativa.

Se evaluaron los indicadores, BMA, coliformes totales, hongos y levaduras. Los resultados obtenidos en dicho diseño confirmaron la efectividad del AEN para la eliminación de la flora nativa de estos vegetales. Sin embargo es importante considerar todos los factores que están estrechamente relacionados para que el efecto bactericida sea efectivo.

Es fundamental tomar en cuenta la superficie de la muestra, en este trabajo se utilizó aguacate Persea americana variedad Hass, el cual presenta una piel gruesa y rugosa. Para el jitomate se utilizó la variedad saladette presentando una superficie firme, piel gruesa y lisa. Otro factor importante que debe considerarse es la manipulación que tuvo el vegetal antes de ser adquirido para su estudio. Los vegetales fueron obtenidos del mercado de abastos de la ciudad de Querétaro, Qro. Se tomaron los jitomates de las cajas aproximadamente del mismo tamaño, se colocaron en una bolsa de plástico y se refrigeraron hasta su uso. A pesar de que cada tratamiento se utilizaron unidades diferentes, con pesos similares de aproximadamente 130-160g para jitomate y de 180-192g para el aguacate, a pesar de que fueron adquiridos en un mismo lugar, es difícil controlar y tener características homogéneas. Además se debe considerar el manejo previo a su venta al consumidor, y a las situaciones adyacentes a su exposición en dicho establecimiento.

De esta manera es posible explicar algunas inconsistencias arrojadas en los resultados, como se puede observar en jitomate en el tratamiento de AEN Desy 60 ppm en 5 minutos de exposición en donde no alcanzó a llegar a niveles no detectables siendo de aproximadamente 3 log UFC/unidad, cuando en 3 min si se logró.

Así mismo ocurrió en dos tratamientos en el aguacate, AEN Desy 60ppm con 5 min de exposición y en AEN Desy 100ppm en 3 min fue de aproximadamente 2 log UFC/unidad para ambos.

Para lograr estos resultados fue necesario repetir algunos tratamientos ya que, como se mencionó anteriormente, por las características de los vegetales, la manipulación y teniendo que ser una unidad diferente para cada tratamiento, se encontraron algunos casos en donde la población microbiana eran mayores a pesar de ser sometidos a algún tratamiento con sanitizantes comparado con el tratamiento de agua. El efecto del AEN observado en la flora nativa de los vegetales, en ciertos casos fue mínimo, esto se puede deber a una probable producción de biopelículas, lo cual hace más difícil su sanitización, además que esta biopelícula estaría conformada por diferentes microorganismos, haciéndola

más compleja. En este trabajo la flora nativa (BMA) inicial tanto para aguacate como jitomate fue de 5.2 log UFC/unidad, población muy similar al trabajo de Abadias y col., (2008) con lechuga iceberg y escarola siendo de 5.7 y 5.5 log UFC/unidad respectivamente, logrando una reducción de 0.8 log al someterla en un tratamiento de AEN a una concentración de 52ppm. Se obtuvieron mejores resultados con los sanitizantes utilizados en este trabajo (AEN Desy, AEN1 e NaClO) dado que para jitomate se lograron niveles no detectables para casi todos los tratamientos excepto para la concentración de 60 ppm de AEN Desy con 5 min de exposición obteniendo una reducción de 1.8 log. En el caso de aguacate la reducción del tratamiento de AEN Desy 60 ppm en 5 min y 100 ppm en 3 min fue de 3 log UFC/unidad para ambos, mientras que para el resto de los tratamientos se llegó a niveles no detectables. Fue posible esta reducción debido a que las concentraciones utilizadas fueron mayores (AEN Desy 60, 100 ppm, AEN1 70,100 y 200 ppm e NaClO 120ppm).

Con los resultados obtenidos, y según el análisis estadístico realizado, se consideró que el factor que más influye en la sanitización de los vegetales fue la concentración de agentes oxidantes presentes en el AEN1, más que al tiempo de exposición a la misma.

6.5 Efecto del agua electrolizada neutra sobre alimentos (jitomate y aguacate) inoculados con *Listeria monocytogenes* Scott A y EGDe.

L. monocytogenes es un microorganismo que se puede encontrar ampliamente distribuido en el ambiente, por lo que representa un peligro importante para el hombre. Una de las formas más comunes es su presencia en una diversidad de alimentos contaminados que han producido brotes tras su consumo, por ejemplo en queso tipo mexicano y vegetales crudos (Ho, 1986).

El AEN1 tiene la capacidad de reducir y eliminar microorganismos en cultivos puros así como en superficies, por ello es de gran importancia conocer estos beneficios especialmente en la industria de alimentos, ya que existen muchos microorganismos patógenos que pueden ser encontrados en alimentos, dependiendo de las condiciones de almacenamiento y en el proceso de manufactura (Cadena, 2011).

El mantener la higiene y buenas prácticas de sanidad en la industria de frutas y hortalizas, es responsabilidad de todos los que están involucrados en su proceso: desde el que cultiva hasta el que lo pone a disposición del consumidor final (Siller y col., 2002).

La adherencia de *L. monocytogenes* Scott A en la superficie de aguacate y jitomate fue prácticamente de 6 log UFC/unidad para ambos. En el caso de *L. monocytogenes* EGDe, la adhesión fue de aproximadamente 5 log UFC/unidad. Una vez más esta cepa mostró menor actividad respecto a Scott A. Deza y col., (2003) en su trabajo realizado, obtuvo una adherencia de *L. monocytogenes* a jitomate de 5.34 log UFC/unidad.

Como se mostró en los resultados del presente trabajo, la adherencia de *L. monocytogenes* a superficie de jitomate y aguacate fue similar en tiempos de inoculación de 30 y 60 min. Estos resultados son comparables con los obtenidos por Deza y col., (2003), donde se inocularon jitomates por 30 y 60 min obteniéndose los mismos resultados en adherencia.

En estudios realizados por Guentzel y col (2008) obtuvieron una adhesión de 6.1-6.7 log para *L. monocytogenes* en espinaca, la cual se sometió a tratamientos de 4, 20, 50, 100, 120 ppm de AEN durante 10 minutos de exposición. Los resultados obtenidos con el agente desinfectante fueron no detectables a partir de 20 ppm, en el presente trabajo se obtuvieron niveles no detectables para *L. monocytogenes* Scott A a partir de 200 ppm y para *L. monocytogenes* EGDe a 70ppm, en jitomate.

Para aguacate, fue necesario agregar 2 concentraciones de tratamiento no consideradas, ya que las propuestas en un inicio no fueron suficientes para inhibir el crecimiento bacteriano, siendo éstas de 300 y 500 ppm. Como se ha ido mencionando, *L. monocytogenes* EGDe muestra menor resistencia al AEN1, en comparación a Scott A, y en este caso se tuvo inhibición a partir de 300 ppm del desinfectante, mientras que *L. monocytogenes* Scott A, fue inhibida hasta el tratamiento con 500 ppm del AEN1.

Esto se puede deber posiblemente a las características de la superficie de este vegetal como se mencionó con anterioridad.

En general para todos los tratamientos, tanto en aguacate como jitomate la reducción para *L. monocytogenes* Scott A fue de aproximadamente 3 log UFC/unidad. Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Guentzel y col., (2008) donde inoculó lechuga, y obtuvo una reducción de 3.63 log ufc a los 120 ppm de AEN.

Es de suma importancia tener en cuenta, la aplicación y utilidad que tienen este tipo de estudios, donde se investiga la capacidad de adherencia de microorganismos patógenos tanto en superficies de alimentos como inertes. Así como la efectividad que tiene sobre ellos los diferentes desinfectantes emergentes que pueden ser de gran ayuda para la industria, teniendo como beneficio principal, la desinfección de las distintas superficies en contacto con alimentos y de éstos mismos.

Debido a la situación actual, relativa al comercio exterior, las empresas interesadas en la exportación de sus productos, deben considerar las reglamentaciones extranjeras sobre el control y mantenimiento de la inocuidad de los alimentos. Muestra de ello es lo estipulado por el gobierno de Canadá (Canadá, 2011), donde se enfatiza la necesidad de muestreos periódicos, dentro de la planta de alimentos incluidas las superficies que no entran en contacto con el alimento así como al ambiente.

7. CONCLUSIONES

La concentración efectiva para llegar a niveles no detectables para *Listeria monocytogenes* Scott A en células libres es de 150 ppm y para biopelículas en acero inoxidable es de 400 ppm, en el caso de *Listeria monocytogenes* EGDe para células libres es de 30 ppm y para biopelículas de acero inoxidable de 70 ppm, se concluye que se requiere de una mayor concentración de cloro residual para la eliminación de biopelículas debido a su mayor resistencia a agentes sanitizantes.

El efecto bactericida de los diferentes desinfectantes evaluados, para la eliminación de la microflora nativa fue variable. De acuerdo al análisis del diseño experimental muestra que el principal factor significativo para la eliminación de estos microorganismos fue concentración de agentes oxidantes presentes en el AEN1. Además por la comparación con el hipoclorito de sodio (NaClO) con una concentración de agentes oxidantes de 120 ppm el manejo del AEN1 como remplazo del cloro es factible y beneficioso, teniendo en consideración las ventajas que presenta, tanto en seguridad de uso, como en la efectividad de eliminación de microorganismos que comprometen la inocuidad de los alimentos, además de ser un agente amigable con el medio ambiente.

Para el jitomate se obtuvo eliminación de flora asociada a partir de 70 ppm del AEN1, y para aguacate este efecto se observó a las 200 ppm. Lo anterior se atribuye a las características de la superficie que presentan estos alimentos, siendo muy diferente su topografía entre sí, lo cual lleva a una mayor conciencia en los métodos de desinfección. Según la superficie a tratar, considerándose a las más rugosas con mayor dificultad, ya que las bacterias pueden adherirse y formar biopelículas en grietas de una superficie, por lo que las concentraciones utilizadas en éstas son mayores.

La concentración inicial con la que fueron inoculados los vegetales fue de 8.8 log para *L. monocytogenes* Scott A y 8.2 log para *L. monocytogene* EGDe. El AEN1 mostró efectividad en la eliminación de *L. monocytogenes* inoculada en aguacate y jitomate, presentando adherencia diferente entre las 2 cepas utilizadas pero muy

semejante para ambos vegetales, siendo aproximadamente de 6 y 5 log para Scott A y EGDe respectivamente.

La concentración efectiva para eliminar *L. monocytogenes* EGDe en aguacate fue de 300 ppm y en jitomate de 70 ppm. Para *L. monocytogenes* Scott A la concentración efectiva para su eliminación en aguacate fue de 500 ppm, y en jitomate fue de 200 ppm.

Con lo anterior se puede observar que la dosis efectiva, depende del microorganismo. A lo largo de este estudio, se pudo constatar que la cepa EGDe tiene mayor sensibilidad que Scott A, en su exposición con AEN1.

Con la realización de ese trabajo se pudo comprobar la efectividad de efecto bacteriostático y bactericida del AEN1 a diferentes concentraciones, tanto en la eliminación de *L. monocytogenes* Scott A y EGDe en células libres, en biopelículas de acero inoxidable e incluso en vegetales inoculados por esta bacteria, así mismo la eliminación de la microflora nativa, por lo cual se considera una alternativa viable para utilizarse como agente sanitizante en la limpieza y desinfección de superficies y alimentos, además que cumple con las características como agente sanitizante establecido en la NOM-120-SSA1-1994.

8 . BIBLIOGRAFIA

- Arevalos** M, Regalado C, Matin S, Domínguez J, García B. Effect of neutral electrolyzed water and nisin on *Listeria monocytogenes* biofilms and on listeriolysin O activity. *Food control* **2011**: 1-7
- Abadias** M, Usall J, Oliveira M, Alegre I, Viñas I. Efficacy of natural electrolyzed water (NEW) for reducing microbial contamination on minimally-processed vegetables. *Int J Food Microbiol* **2008**: 151-158
- Agle** M. Biofilms in the food industry. En: *Biofilms in the Food Environment* . Oxford: Blackwell Publishing Ltd, **2007**: 3-13
- Ayeba** B y Hung YC. Electrolyzed water and its corrosiveness on various surfaces material commonly found in food processing facilities. *J Food Proc Eng* **2005**; 28: 247-264
- Bishop** P. Biofilm structure and kinetics. *Water Sci Technol* **1997**; 36: 282-294
- Cadena** E. Estudio de la formación de biopelículas de *L. monocytogenes* EGDe sobre superficies de vidrio y acero inoxidable y su control. Tesis Licenciatura, Facultad de Química, UAQ **2011**: 1-82
- Callejas** T, Martínez G, Spooren R, Artés F. La desinfección con agua electrolizada preserva la calidad microbiológica nutritiva y sensorial de brotes de mizuna minimamente procesado en fresco. *Rev Iberoam Technol Post* **2010**; 11:204-213
- Canada**. Policy on *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods [monografía en internet]. Ottawa, Ontario: Health Canada Publication, **2011** [consultado 2012 agosto 09]. Disponible en: http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/legislation/pol/policy_listeria_monocytogenes_2011-eng.php
- Carpentier** B, Cerf O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J Appl Bacteriol* **1993**; 75: 499-511
- CDC**. Morbidity and mortality weekly report. **2011**; 60: 751
- Characklis** WG, Mc Feters GA, Marshall KC. Physiological ecology in biofilm systems. En: *Biofilms*. New York: John Wiley & Sons, **1990**: 341-394
- Chengchu** L, Jingyun D, Yi-Cheung S. Effects of electrolyzed oxidizing water on reducing *Listeria monocytogenes* contamination on seafood processing surfaces. *Int J Food Microbiol* **2006**; 106: 248-253

Chimielewski R, Frank J. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Compr Rev Food Sci Food Safety* **2003**; 2: 22-32

Deza M, Araujo M, Garrido M. Inactivation of *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* on the surface of tomatoes by neutral electrolyzed water. *Lett Appl Microbiol* **2003**; 37: 482-487

Donlan RM, Costerton JW. Biofilms survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Am Soc Microbiol* **2002**; 15:167-192

Donlan RM. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* **2002**; 8: 881-890

Garcia B, Cann I, Martin S, Guerrero L, Regalado C. Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control* **2008**; 19: 670-680

Gilbert P, Evans DJ, Evans E, Duguid IG, Brown M. Surface characteristics and adhesion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermis*. *J Appl Bacteriol* **1991**; 71-77

Guentzel J, Liang Lam K, Callan M, Emmons S, Dunham V. Reduction of bacteria on spinach, lettuce, and surfaces in food service areas using neutral electrolyzed oxidizing water. *Food microbiol* **2008**; 36-41

Helke DM, Somers EB, Wong A. Attachment of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* to stainless steel and Buna-N in the presence of milk and individual milk components. *J. Food Prot* **1993**; 56: 479-484

Hilbert L, Bagge-Ravn D, Kold J, Gram L. Influence of surface of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. *Int biodeter biodegr* **2003**: 175-185

Ho JL, Shands KN, Friedland G, Eckind P, Fraser DW. An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospital. *Arch Intern Med* **1986**; 146: 520-524

Hood SK, Zotola EA. Biofilms in food processing. *Food Control* **1995**; 6:9-18

Hsu J. Effects of flow rate, temperature and salt concentration on chemical and physical properties of EOW. *J Food Eng* **2005**; 66: 171-176

Huang Y, Hung Y, Hsu S, Huang Y, Hwang U. Application of electrolyzed water in the food industry. *Food Control* **2008**; 19: 329-345

INEGI, Información oportuna sobre la balanza comercial de México durante noviembre del **2011**. [serie en internet] 2011 [consultado 2012 marzo 15] Disponible en: www.Inegi.org.mx

Kelthariou S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity a food safety perspective. *J Food Prot* **2002**; 65: 1811-1829

Kim C, Hung Y, Brackett R. Efficacy of electrolyzed oxidizing (EO) and chemically modified water on different types of foodborne pathogens. *Int J Food microbiol* **2000**: 199-207

Kumar C, Anand S. Significance of microbial Biofilms in food industry. *Int J Food Microbiol* **1998**; 42: 9-27

Len SV, Hung YC, Chung D, Anderson JL, Erickson MC, Morita K. Effects of storage conditions and pH on chlorine loss in electrolyzed oxidizing (EO) water. *J Agri Food Chem* **2002**; 50:209-212

Liao L, Chen W, Xiao X. The generation and inactivation mechanism of oxidation-reduction potential of electrolyzed oxidizing water. *J Food Eng* **2007**; 1326-1332

Liu C, Duan J, Su Y. Effects of electrolyzed oxidizing water on reducing *Listeria monocytogenes* contamination on seafood processing surfaces. *Int J Food Microbiol* **2006**: 248-253

Martin S, Fisher C. *Listeria monocytogenes*. *Enc Food Microbiol* **1999**: 1228-1238

Marriot NG, Gravani RB. Principles of Food Sanitation. New York: Springer, **2006**; 132-139

McPherson L. Understanding ORP's in the disinfection process. *Water Eng Man* **1993**; 140:29-31

Miles A, Misra S. The estimation of the bactericidal power of the blood. *J Hyg-Cambridge* **1938**; 38: 732-749

Montana State University. Center for biofilm engineering [monografía en internet] 2008 [consultado 2012 marzo 23]. Disponible en: www.biofilm.montana.edu/biofilm-basics.html

Moretro T y Langsrud S. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms* **2004**; 1: 107-121

Mori Y., Komatsu S., Hata Y. Toxicity of electrolyzed strong acid aqueous solution-subacute toxicity test and effect on oral tissue in rats. *Odontology* **1997**; 84:619-626

Navia DP, Villada HS, Mosquera SA. Las biopelículas en industria de alimentos. *Rev Bio Agro* **2010**; 8:118-128

NOM-092-SSA1-1994 Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

NOM-111-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

NOM-112-SSA1-1994. Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable

NOM-120-SSA1-1994. Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad para el proceso de alimentos, bebidas no alcohólicas y alcohólicas

Park H, Hung YC, Chung D. Effects of chlorine and pH on efficacy of electrolyzed water for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **2004**; 91: 13-18

Pedersen K. Electrostatic interaction chromatography a method for assaying the relative surface charges of bacteria. *Lett Microbiol* **1980**; 12: 365-367

Siller J, Báez M, Sañudo A, Báez R. Manual de buenas prácticas agrícolas. Comisión mexicana para la cooperación con Centroamérica **2002**: 6-9

Sutherland W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiol* **2001**;147:3-9

Tompkin RB. Control of *Listeria monocytogenes* in the food processing environment. *J Food Prot* **2002**; 65: 709-795

Zhang T, Bishop P. Structure, activity and composition of biofilm. *Water Sci Technol* **1994**; 29: 335-344

ANEXOS

Células libres *Listeria monocytogenes* Scott A

Tratamiento	3 minutos			10 minutos		
	UFC/mL	logUFC/mL	SD	UFC/mL	logUFC/mL	SD
Agua	6650000000	9.8	0.012	5650000000	9.7	0.021
	10100000000	10		6250000000	9.7	
	5900000000	9.7		5900000000	9.7	
30 ppm AEN1	500	2.6	0.275	4500	3.6	0.238
	500	2.6		2500	3.3	
	1500	3.1		1500	3.1	
70 ppm AEN1	11500	4	0.076	1000	3	0.199
	9500	3.9		2500	3.3	
	13500	4.1		1500	3.1	
150 ppm AEN1	0	0	0	0	0	0
	0	0		0	0	
	0	0		0	0	

Células libres *Listeria monocytogenes* EGDe

Tratamiento	3 minutos			10 minutos		
	UFC/mL	logUFC/mL	SD	UFC/mL	logUFC/mL	SD
Agua	155000000	8.1	0.1	170000000	8.2	0.08
	230000000	8.3		160000000	8.2	
	250000000	8.3		225000000	8.3	
30 ppm AEN1	0	0	0	0	0	0
	0	0		0	0	
	0	0		0	0	
70 ppm AEN1	0	0	0	0	0	0
	0	0		0	0	
	0	0		0	0	
150 ppm AEN1	0	0	0	0	0	0
	0	0		0	0	
	0	0		0	0	

Biopelículas *Listeria monocytogenes* Scott A

Tratamiento	3 minutos			10 minutos		
	UFC/cm ²	logUFC/cm ²	SD	UFC/cm ²	logUFC/cm ²	SD
Agua	496800	5.6	0.012	288000	5.4	0.069
	511200	5.7		208800	5.3	
	482400	5.6		244800	5.3	
40 ppm AEN1	331200	5.5	0.074	273600	5.4	0.058
	237600	5.3		208800	5.3	
	302400	5.4		237600	5.3	
100 ppm AEN1	28800	4.4	0.055	21600	4.3	0.101
	28800	4.4		21600	4.3	
	36000	4.5		14400	4.1	
400 ppm AEN1	0	0	0	0	0	0
	0	0		0	0	
	0	0		0	0	

Biopelículas *Listeria monocytogenes* EGDe

Tratamiento	3 minutos			10 minutos		
	UFC/cm ²	logUFC/cm ²	SD	UFC/cm ²	logUFC/cm ²	SD
Agua	381600	5.5	0.026	51840	4.7	0.041
	424800	5.6		43920	4.6	
	424800	5.6		43920	4.6	
40 ppm AEN1	7200	3.8	0	0	0	0
	7200	3.8		0	0	
	7200	3.8		0	0	
70 ppm AEN1	0	0	0	0	0	0
	0	0		0	0	
	0	0		0	0	
150 ppm AEN1	0	0	0	0	0	0
	0	0		0	0	
	0	0		0	0	

JITOMATE										
Experimento	FACTORES				RESPUESTA				Coliformes Totales	
	Concentración		Tiempo	BMA		HONGOS Y LEVADURAS		SD		NMP/unidad
				Log UFC/unidad	SD	Log UFC/unidad	SD			
1	Agua		5 min	4.3	4.3	0	0	0	0	3.6
2	100 ppm Desy		5 min	0	0	0	0	0	0	0
3	120 ppm NaClO		3 min	0	0	0	0	0	0	0
4	100 ppm Desy		3 min	0	0	0	0	0	0	460
5	60 ppm Desy		5 min	3.3	3.4	0.071	0	0	0	0
6	Agua		3 min	2.5	2.1	0.283	0	0	0	0
7	120 ppm NaClO		5 min	0	0	0	0	0	0	0
8	60 ppm Desy		3 min	0	0	0	0	0	0	0
9	200 ppm AEN1		5 min	0	0	0	0	0	0	0
10	70 ppm AEN1		3 min	0	0	0	0	0	0	15
11	70 ppm AEN1		5 min	0	0	0	0	0	0	0
12	100 ppm AEN1		3 min	0	0	0	0	0	0	0
13	200 ppm AEN1		3 min	0	0	0	0	0	0	0
14	100 ppm AEN1		5 min	0	0	0	0	0	0	0

Diseño Experimental con jitomate

AGUACATE										
Tratamiento	FACTORES			RESPUESTA						
	Concentración	Tiempo	BMA			Hongos y Levaduras			Coliformes Totales	
			Log UFC/unidad	SD	Log UFC/unidad	SD	Log UFC/unidad	SD	NMP/unidad	
1	Agua	5 min	3.3	0.052	3.2	0	0	0	0	9.2
2	100 ppm Desy	5 min	0	0	0	0	0	0	0	0
3	120 ppm NaClO	3 min	0	0	0	0	0	0	0	1100
4	100 ppm Desy	3 min	0	0	0	0	0	0	0	0
5	60 ppm Desy	5 min	2.3	0.099	2.1	0	0	0	0	0
6	Agua	3 min	4.3	0.024	4.4	0	0	0	0	0
7	120 ppm NaClO	5 min	0	0	0	0	0	0	0	0
8	60 ppm Desy	3 min	0	0	0	2.3	2.3	0.015	0	0
9	200 ppm AEN1	5 min	0	0	0	0	0	0	0	0
10	70 ppm AEN1	3 min	0	0	0	0	0	0	0	0
11	70 ppm AEN1	5 min	0	0	0	2.1	2.3	0.157	150	0
12	100 ppm AEN1	3 min	2.3	0.156	2.1	0	0	0	0	11
13	200 ppm AEN1	3 min	0	0	0	0	0	0	0	0
14	100 ppm AEN1	5 min	0	0	0	0	0	0	0	1100

Diseño Experimental con jitomate

Tiempo de adhesión de *L. monocytogenes* en jitomate

Jitomate				
Tiempo	<i>L. monocytogenes</i> Scott A		<i>L. monocytogenes</i> EGDe	
	Log UFC/unidad	DS	Log UFC/unidad	DS
60 min	5.5	0.058	4.9	0.139
	5.4		5.1	
	5.4		4.9	
30 min	6.1	0.045	4.7	0.279
	6		4.3	
	6.1		4.8	

Tiempo de adhesión de *L. monocytogenes* en aguacate

Aguacate				
Tiempo	<i>L. monocytogenes</i> Scott A		<i>L. monocytogenes</i> EGDe	
	Log UFC/unidad	DS	Log UFC/unidad	DS
60 min	6.3	0.046	6	0.036
	6.3		6	
	6.3		5.9	
30 min	6.2	0.035	4.6	0.137
	6.3		4.9	
	6.2		4.8	

Tratamiento con AEN1 en jitomate inoculado con *Listeria monocytogenes*

Jitomate				
Tratamiento	<i>L. monocytogenes</i> ScottA		<i>L. monocytogenes</i> EGDe	
	Log UFC/unidad	DS	Log UFC/unidad	DS
Adhesión	6.1	0.045	4.7	0.279
	6		4.3	
	6.1		4.8	
70 ppm	3.3	0.271	2	0
	3		2	
	3.5		2	
100 ppm	3.6	0.693	2	0
	4.8		2	
	3.6		2	
200 ppm	2	0	2	0
	2		2	
	2		2	

Tratamiento con AEN1 en aguacate inoculado con *Listeria monocytogenes*

AGUACATE				
Tratamiento	<i>L. monocytogenes</i> Scott A		<i>L. monocytogenes</i> EGDe	
	Log UFC/unidad	DS	Log UFC/unidad	DS
Adhesión	6.2	0.035	4.6	0.137
	6.3		4.9	
	6.2		4.8	
70 ppm	3.7	0.085	3	0.179
	3.8		3	
			2.7	
100 ppm	4.3	0.067	3.8	0.083
	4.4		3.8	
	4.4		3.7	
200 ppm	3.4	0.127	3.3	0.65
	3.2		2.7	
	3.2		2	
300 ppm	3.3	0.352	0	0
	2.7		0	
	2.7		0	
500 ppm	0	0	0	0
	0		0	
	0		0	