



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA APLICADA

Patrocinante

Q.F. Luis López Valladares

Departamento de Ciencia de los
Alimentos y Tecnología Química
Universidad de Chile.

Directores

Q.F. Luis López Valladares

Q. José Mario Romero Reyes
Departamento de Ciencia de los
Alimentos y Tecnología Química
Universidad de Chile.

“Efecto biocida de un desinfectante de uso industrial sobre diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*”

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO EN ALIMENTOS

TAMARA ANDREA ARRIAGADA OJEDA

SANTIAGO DE CHILE
2006

Dedicada a mis padres, porque todo lo que soy se lo debo a ellos, por su esfuerzo y apoyo incondicional durante todos estos años.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a Dios por todo lo que me ha dado, Él ha sido mi pilar fundamental, a mis papás y hermanos por su apoyo y paciencia, a mi tío Víctor por su gran apoyo en momentos difíciles y generosidad durante tantos años, a una persona que ya no está, pero sé que desde lejos siempre me acompaña, y sé que estaría orgullosa de mí, al tío Queno y familia por su gran corazón, a Orlando por todo su apoyo y consejo, a su familia por su cariño y generosidad, a mi amiga Evelyn y sus papás, por su gran corazón y porque fueron mi familia durante tanto tiempo y realmente los sentí así, a mi amiga Daniela por todos esos momentos que pasamos juntas, por su amistad y apoyo, a la profesora María Francisca Yañez por haber creído en mí, a mis profesores de memoria, Sr. Luis López y Sr. José Romero, por su tiempo y buena disposición para ayudar siempre que se los necesitaba. Muchas gracias a todos ustedes por que sin su apoyo y compañía no hubiese sido posible lograr lo que logré, estuvieron conmigo en una etapa muy importante de mi vida.

ÍNDICE

I. RESUMEN	3
II. SUMMARY	4
III. INTRODUCCIÓN	5
IV. OBJETIVOS	8
1. Objetivo General	8
2. Objetivos Específicos	8
V. MATERIALES Y MÉTODOS	9
1. MATERIALES	9
1.1 Desinfectantes	9
1.2 Neutralizante	9
1.3 Cepas	10
2 Métodos	10
2.1 Recuento inicial de las cepas	10
2.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana “ <i>in vitro</i> ”.	10
2.3 Control del neutralizante.	10
2.4 Determinación de la actividad antimicrobiana.	11
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
1. Control del neutralizante	14
2 Acción del desinfectante sobre las cepas en estudio.	15
2.1 Acción del desinfectante sobre <i>Escherichia coli</i> salvaje.	15
2.2 Acción del desinfectante sobre <i>Staphylococcus aureus</i> salvaje.	17

2.3 Acción del desinfectante sobre <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	19
2.4 Acción del desinfectante sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.	21
3. Resumen valores de k (velocidad específica de muerte) de las distintas cepas de prueba.	23
4 Valores del coeficiente de dilución (η).	25
5. Análisis Estadístico.	26
VII. DISCUSIÓN.	29
VIII. CONCLUSIONES	32
IX. BIBLIOGRAFÍA	34

I. RESUMEN.

Existe una gran oferta de productos detergentes y desinfectantes, que aplicados en adecuados programas de sanitización, ayudarían a prevenir y reducir la contaminación microbiológica presente en las plantas elaboradoras de alimentos, sin embargo en muchos casos no se ha realizado una validación experimental adecuada del efecto esperado. Es por ello que se realizó un estudio *in vitro* de la actividad germicida de un producto compuesto por cloruro de alquildimetil benzilamonio, glutaraldehído, glioxal, formaldehído, isopropanol y excipientes, a distintas concentraciones y tiempos, incluidos los recomendados por el fabricante. Se determinó la cinética de muerte de los microorganismos, calculando el % de eficiencia del desinfectante, la velocidad específica de muerte, el tiempo de reducción decimal y el coeficiente de dilución.

Las pruebas se realizaron frente a: *Escherichia coli* salvaje, *Staphylococcus aureus* salvaje, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

La eficiencia germicida *in vitro* del desinfectante en el tiempo (5 minutos) y rango de concentración recomendado por el fabricante (0,25% – 0,5%) fue para *Escherichia coli* ATCC 25922 del 99,999% a la concentración de 0,25%, mientras que para *Escherichia coli* salvaje, *Staphylococcus aureus* salvaje y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 se logró la misma eficiencia a la concentración de 0,5%, por lo que, según los resultados obtenidos cumple el Test de Chambers en cuanto a la eficiencia esperada para un buen desinfectante, pero no cumple con los 30 segundos propuestos, ya que se obtiene en tiempos mayores de acción.

Los valores de k (velocidad específica de muerte), permiten concluir que *Staphylococcus aureus* salvaje resultó ser más resistente que el resto de los microorganismos, luego sigue *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* salvaje y finalmente *Escherichia coli* ATCC 25922, quien resultó tener menor resistencia a la acción germicida del desinfectante.

II. SUMMARY.

“Biocid effect of a disinfectant of industrial use on different *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains”

There is a great offer of detergent and disinfectant products, that applied under appropriate sanitization programs, would help to prevent and reduce the microbiological contamination from the food industry. However, in the most of cases an experimental and appropriate validation of the effect of the product, has not been carried out. The present *in vitro* study was developed in order to determine the germicidal activity of a disinfectant containing alquildimetyl benzylamonium chloride, glutaraldehyde, glyoxal, formaldehyde, isopropanol and excipients, assayed at different concentrations and times, included those recommended by the manufacturer. The kinetics of death of the microorganisms, the % of efficiency of the disinfectant, the specific death rate, the time of decimal reduction and the dilution coefficient were determined.

The tests were carried out against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* wild strains, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

The germicidal efficiency *in vitro* of the disinfectant at the time (5 minutes) and concentration range recommended by manufacturer (0,25% - 0,5%) was 99,999% for *Escherichia coli* ATCC 25922, specifically at a concentration of 0,25%. For *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* wild strains and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 the same 99,999% of efficiency was achieved when using the product at 0,5%. According to the obtained results, the Chambers test is fulfilled from point of view of the obtained destruction %. Nevertheless, it does not fulfill the 30 seconds proposed, since the efficacy is obtained at other times beyond the 30 seconds.

The values of k (specific death rate), allow to conclude that the wild strain of *Staphylococcus aureus* was more resistant than the other microorganisms. In decreasing order, the resistance of the other microorganisms to the studied disinfectant was *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* wild type and finally *Escherichia coli* ATCC 25922.

III. INTRODUCCIÓN.

Cada año las enfermedades causadas por alimentos causan millones de cuadros clínicos en el mundo (Dontorou et al., 2003).

El espectro de infecciones producidas por los alimentos ha cambiado dramáticamente en un cierto período de tiempo, ya que se han controlado o eliminado los patógenos establecidos, pero han emergido otros nuevos. La cantidad de enfermedades producidas por los alimentos sigue siendo substancial, se estima que cada año uno de cuatro norteamericanos hace un cuadro clínico de este tipo (Tauxe, 2002).

Una vía de contaminación de los alimentos por patógenos es por contacto con los equipos empleados en su procesamiento (Luppens et al, 2002; Taormina & Beuchat, 2002).

La mayoría de las plantas elaboradoras de alimentos son diseñadas para ser higiénicas, pero si no se utilizan métodos adecuados de sanitización, los alimentos pueden presentar contaminación microbiológica. Esta contaminación puede o causar procesos de alteración de los alimentos o afectar la salud de los consumidores.

Los microorganismos por si solos, salvo en algunas ocasiones, no son capaces de generar daños importantes en un organismo viviente porque son susceptibles a los factores adversos del medio en que se encuentran. Sin embargo, estos seres microscópicos han evolucionado de tal forma que logran organizarse y convivir con especies diferentes, aprovechando los productos que se ofrecen dentro de su comunidad, esto es lo que observa generalmente en las denominadas biopelículas o biofilms (Betancourth et al., 2004).

Un amplio espectro de microorganismos patógenos pueden contaminar los alimentos y causar enfermedades (Griffin & Tauxe, 1991; Tauxe,2002). *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* han sido reconocidos como los principales agentes que pueden causar serias enfermedades y en algunos casos muerte en población de alto riesgo (Tauxe, 2002; Tarte et al., 1996).

Por consiguiente, es de suma importancia que los equipos sean limpiados y desinfectados en forma regular y eficiente (Luppens et al, 2002; Taormina & Beuchat, 2002).

Normalmente una adecuada limpieza e higienización es parte del programa de inactivación de microorganismos, previniendo la acumulación de células microbianas y partículas en las superficies de los equipos, así como la formación del biofilms (Peng, Tsai, & Chou, 2002), además la sanitización de los equipos empleados en el procesamiento de alimentos es fundamental para el control de la contaminación cruzada durante la producción (Rossoni M., y Gaylard C., 2000).

La higienización de los equipos que procesan alimentos se lleva a cabo regularmente, pero sólo elimina algunos microorganismos (Carpentier y Cerf, 1993).

Por lo que es necesario llevar a cabo un proceso de desinfección, el cual contribuya a reducir el número de microorganismos existentes.

La desinfección de un medio o de una superficie se realiza a través de la intoxicación de los microorganismos por medio de productos químicos (http://www.geocities.com/raydelpino_2000/desinfección.html).

Existe una gran oferta de productos detergentes y desinfectantes, que aplicados con adecuados programas de sanitización, ayudarían a prevenir y reducir la contaminación microbiológica presentes en las plantas elaboradoras de alimentos, de esta forma, un desinfectante eficaz debe ser aplicado en la concentración y tiempo apropiado, ya que a bajas concentraciones aumenta el riesgo de contaminación del alimento por microorganismos y el riesgo de resistencia al desinfectante, mientras que a altas concentraciones aumenta el costo y la posibilidad de contaminación química del alimento (Dontorou et al., 2003).

El mercado ofrece una gran variedad de productos desinfectantes de uso tradicional en la industria alimentaria, como cloro y derivados, yodóforos, amonios cuaternarios y ácidos orgánicos como ácido peracético, que ayudarían convenientemente a prevenir y reducir la contaminación microbiológica existente (López et al., 1988).

Estos productos han sido aplicados en diferentes ámbitos de la industria de alimentos, considerando para ello sólo las especificaciones técnicas que entregan sus distribuidores, sin efectuar en la mayoría de los casos una validación experimental adecuada del efecto esperado (López et al., 2002)

En el presente trabajo se comparó la acción *in vitro* de un desinfectante de uso industrial, frente a dos microorganismos Gram (-) (*Escherichia coli* salvaje y *Escherichia coli* ATCC 25922) y dos Gram (+) (*Staphylococcus aureus* salvaje y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213), representativos de la flora contaminante que puede estar presente en la mayoría de las industrias elaboradoras de alimentos.

IV. OBJETIVOS.

1. Objetivo General

Determinar el efecto biocida de un desinfectante de uso industrial sobre cepas salvajes y de colección de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* a distintos tiempos y concentraciones, incluidos los recomendados por el fabricante.

2. Objetivos Específicos

- Determinar la cinética de acción germicida mediante pruebas *in vitro* considerando distintas concentraciones del producto desinfectante y diferentes tiempos de acción.
- Determinar la eficiencia germicida (% E) y el coeficiente de dilución (η) del desinfectante.
- Determinar velocidad específica de muerte (k) y tiempo de reducción decimal (TRD) para cada microorganismo.
- Comparar la acción del desinfectante frente a los distintos microorganismos, en las distintas condiciones de trabajo estudiados.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES.

1.1 Desinfectante.

El producto usado corresponde a un desinfectante usado en la industria alimentaria, el cual fue ensayado a diferentes concentraciones y tiempos de acción, considerando las especificaciones recomendadas por el fabricante.

El producto contiene cloruro de alquildimetil benzilamonio (61,5 g/L), glutaraldehído (58,8 g/L), glioxal (19,8 g/L), formaldehído (84,0 g/L), isopropanol (40,0 g/L) y excipientes.

Se ensayó a concentraciones de 0,10%, 0,25% y 0,50%, y tiempos de 1, 5 y 10 minutos.

El fabricante recomienda una concentración entre 0,25% a 0,50% aplicada durante 5 min.

1.2 Neutralizante.

El neutralizante empleado está compuesto por:

Tween 80	30 ml
NaHSO ₃ al 40%	6,25 ml
Na ₂ S ₂ O ₃	3,92 g
Triptona c.s.p	250 ml

La triptona c.s.p se prepara a partir de:

Peptona	1 g
NaCl	8,5 g
H ₂ O	1000 ml

1.3 Cepas.

Las cepas utilizadas en este estudio fueron:

- *Escherichia coli* salvaje.
- *Staphylococcus aureus* salvaje.
- *Escherichia coli* ATCC 25922.
- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

2. MÉTODOS.

2.1. Recuento inicial de las cepas.

Los cultivos de prueba se hicieron crecer durante 24 horas en caldo nutritivo a una temperatura de 35°C, para luego ser sembrados en TSA (Tryptone Soya Agar) según las especificaciones de ICMSF (1978).

2.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana “*in vitro*”.

Las diluciones del desinfectante se prepararon de acuerdo a las especificaciones del fabricante utilizando agua destilada y a temperatura ambiente (15°C).

Cada experiencia se realizó por triplicado y los resultados corresponden al promedio de los valores obtenidos.

2.3 Control del neutralizante.

Este control se realizó con el fin de confirmar la efectiva neutralización del desinfectante y verificar que el éste no presente efecto bactericida sobre las cepas en estudio. La metodología empleada fue la recomendada por Russel (1998).

El procedimiento consiste en disponer 9 ml de la solución desinfectante a la concentración de uso, luego adicionar 1 mL de neutralizante y dejar reaccionar durante 10 minutos a una temperatura aproximada de 20°C a 25°C. Seguidamente, se inocula una concentración aproximada de 10^3 ufc/mL de microorganismos; se agita

cuidadosamente el tubo y se deja reposar durante 5 minutos. Posteriormente, se realizó recuento en placa, incubando a 35°C durante 24 horas.

2.4 Determinación de la actividad antimicrobiana.

La determinación de la actividad antimicrobiana, se efectuó de acuerdo a la metodología recomendada por la AOAC (1984), para medir efectividad de desinfectantes sobre microorganismos de prueba. Las pruebas se realizaron sobre un cultivo puro de 24 horas de incubación.

Los ensayos fueron realizados por triplicado y los resultados corresponden a la media de ellos.

Los resultados obtenidos son expresados en función de la velocidad específica de muerte (minutos^{-1}), de la eficiencia germicida porcentual (%) y del tiempo de reducción decimal (minutos).

La cinética de muerte de los microorganismos se expresa de acuerdo a la siguiente expresión, donde k es la velocidad específica de muerte y corresponde a la pendiente de la recta resultante del gráfico $\ln N_t$ vs t ; que se obtiene a partir de la siguiente expresión:

$$\ln (N_t / N_0) = - k t$$

Donde:

N_0 = número de microorganismos iniciales.

N_t = número de microorganismos sobrevivientes al tiempo t .

t = tiempo de contacto entre el desinfectante y el microorganismo.

k = velocidad específica de muerte.

La recta obtenida en el gráfico $\ln N_t$ vs t , presenta algunas desviaciones de la linealidad debido a que la velocidad específica de muerte no permanece constante, ya

que la concentración del desinfectante va disminuyendo a medida que éste actúa en el tiempo.

Valores elevados de la velocidad específica de muerte (k), implican menor resistencia de los microorganismos a la acción de un determinado desinfectante.

El valor de la eficiencia germicida (%) corresponde al porcentaje de microorganismos que son destruidos por la acción del desinfectante, y se obtiene a partir de la siguiente expresión:

$$\text{Eficiencia (\%)} = \frac{N_0 - N_t}{N_0} \times 100$$

Donde:

N_0 = número de microorganismos iniciales.

N_t = número de microorganismos sobrevivientes al tiempo t.

Como criterio de eficacia, se utilizó el test de Chambers, el cual estipula que un buen desinfectante es un producto, que a la concentración recomendada, provoque un 99.999% de muerte en una cantidad inicial entre 7.5×10^7 y 1.3×10^8 células/mL, en 30 segundos. (Ayres, 1980).

El tiempo de reducción decimal indica, el tiempo necesario para disminuir en un ciclo logarítmico la cantidad de microorganismos presentes en una muestra de ensayo. (Ureta, 1997).

El tiempo de reducción decimal (TRD) queda determinado por la siguiente expresión:

$$\text{TRD} = \frac{2.3}{k}$$

Donde: k = velocidad específica de muerte.

El coeficiente de dilución (η) expresa la relación entre la actividad y la concentración del desinfectante frente a un determinado microorganismo, de acuerdo a la siguiente expresión:

$$C^n t = \text{constante}$$

Donde:

C = concentración del desinfectante.

t = tiempo de acción para disminuir en un determinado porcentaje la contaminación inicial de microorganismo.

η = coeficiente de dilución.

Luego, el coeficiente de dilución se obtiene a partir de la siguiente expresión:

$$\eta = \frac{(\log t_2 - \log t_1)}{(\log c_1 - \log c_2)}$$

Donde: t = tiempo.

c = concentración.

Un valor elevado del coeficiente de dilución (η) significa una gran dependencia de la acción del desinfectante con la concentración del producto. (Hugo, 1971).

Los resultados se analizaron a través de un análisis de varianza multifactorial mediante el software Statgraphics 4.0, con un nivel de confianza del 90%.

VI. RESULTADOS.

1. Control del Neutralizante.

Tabla 1. Efecto del neutralizante sobre los microorganismos.

Recuento	<i>Escherichia coli</i> salvaje	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> salvaje	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> ATCC 29213
Inicial	3,3x 10 ³ ufc/mL	2,4x 10 ³ ufc/mL	3,4 x 10 ³ ufc/mL	3,7 x 10 ³ ufc/mL
Sobrevivientes	3,1 x 10 ³ ufc/mL	2,4x 10 ³ ufc/mL	3,3 x 10 ³ ufc/mL	3,5 x 10 ³ ufc/mL

La tabla 1 muestra los valores promedios del recuento de microorganismos iniciales y sobrevivientes luego del uso del neutralizante.

Los recuentos de los microorganismos iniciales y de los sobrevivientes resultaron similares. Esto demuestra que el neutralizante efectivamente inactiva al desinfectante y no presenta actividad bactericida frente a las cepas.

2. Acción del desinfectante sobre las cepas en estudio.

En todos los casos estudiados la cantidad inicial de microorganismos fue del orden de 10^7 ufc/ml.

2.1 Acción del desinfectante sobre *Escherichia coli* salvaje.

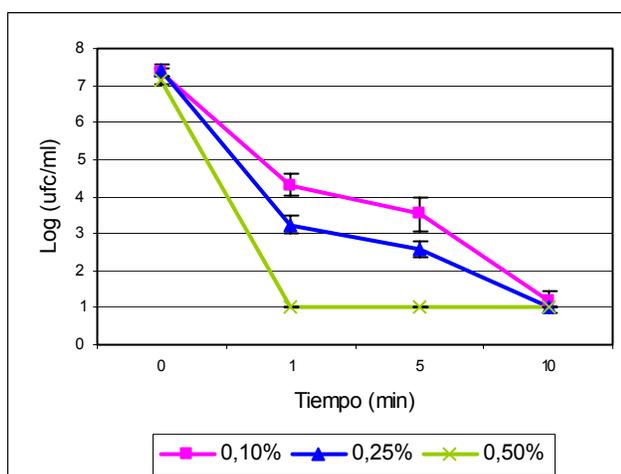


Figura 1: Efecto *in vitro* del desinfectante a 0,10%, 0,25% y 0,50%, sobre *Escherichia coli* salvaje.

La figura 1 presenta la cinética de muerte de *Escherichia coli* salvaje. A las tres concentraciones usadas, es posible observar que al primer minuto de acción se logra la reducción más significativa, ya que a la concentración de 0,1% hay una disminución de casi 3 ciclos logarítmicos, mientras que a 0,25% disminuye 4 ciclos y al doblar dicha concentración (0,5%) disminuye más de 6 ciclos.

A 0,1 % y 0,25 %, por sobre los 5 min la reducción es progresiva hasta los 10 minutos, tiempo en que la reducción alcanza 6 ciclos.

Tabla 2. Actividad antimicrobiana del desinfectante sobre *Escherichia coli* salvaje a distintas concentraciones.

Concentración %	Tiempo (min)	N (ufc/mL)	E (%)	k (min ⁻¹)	TRD (min)
0,1	0	2,31*10 ⁷	-	-	-
	1	2,39*10 ⁴	99,898	7	0,33
	*5	4,56*10 ³	99,980	1,76	1,31
	10	1,66*10	99,99987	1,42	1,61
**0,25	0	2,76*10 ⁷	-	-	-
	1	1,96*10 ³	99,9916	9,58	0,24
	* 5	4,03*10 ²	99,9981	2,22	1,03
	10	< 10 ufc	99,99999	1,64	1,40
**0,5	0	1,43*10 ⁷	-	-	-
	1	< 10 ufc	99,99999	16,45	0,14
	* 5	< 10 ufc	99,99999	3,29	0,70
	10	< 10 ufc	99,99999	1,71	1,34

* Tiempo recomendado por el fabricante.

** Rango de concentraciones recomendadas por el fabricante.

Los datos presentados en la tabla 2 muestran la E(%), k y TRD para *Escherichia coli* salvaje, a las diferentes concentraciones y tiempos estudiados, incluyendo los recomendados por el fabricante.

Eficiencias del 99,999% se logra para las concentraciones del 0,1 y 0,25% a los diez minutos de acción, mientras que para la concentración del 0,5% se logra a partir del primer minuto.

El valor de k aumenta con la concentración desde 7 (0,1%); 9,58 (0,25%) y 16,5 (0,5%), es posible observar que el valor de k aumenta de manera proporcional a la concentración, sin embargo a medida que pasa el tiempo el valor de k disminuye, esto se explica con el hecho de que la concentración del desinfectante va disminuyendo con el tiempo.

El TRD disminuye con la concentración desde 0,33 (0,1%); 0,24 (0,25%) y 0,14 (0,5%), lo cual indica que a mayor concentración del desinfectante, menor tiempo en conseguir igual reducción.

2.2 Acción del desinfectante sobre *Staphylococcus aureus* salvaje.

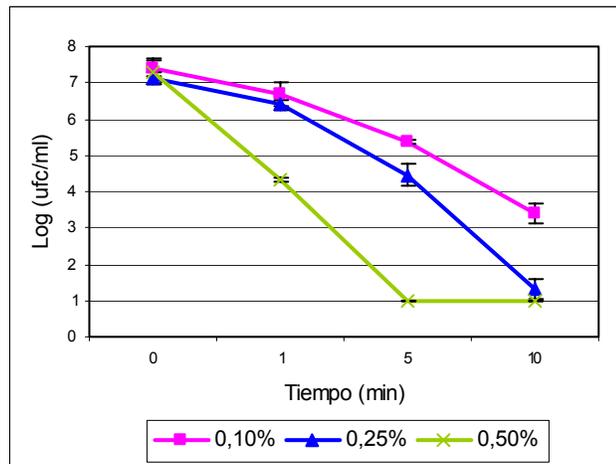


Figura 2: Efecto *in vitro* del desinfectante a 0,10%, 0,25% y 0,50%, sobre *Staphylococcus aureus* salvaje.

La figura 2 presenta la cinética de muerte de *Staphylococcus aureus* salvaje. A la concentración de 0,5% y después de 5 min de contacto, se disminuye en 6 ciclos la población inicial. Al igual que en el caso de *E. coli* presentado anteriormente, a esta concentración la acción del producto es drástica. Al usar el desinfectante al 0,25% y a los 10 min se logra una reducción similar, es decir 6 ciclos. Cuando la concentración es de 0,1 % y a los 10 min de acción, solo se disminuye en 3 ciclos. Esta cepa de *S. aureus* salvaje, parecería ser más resistente que la de *E. coli* salvaje, si se considera el perfil diferente que presentan las curvas de las figuras 1 y 2.

Tabla 3. Actividad antimicrobiana del desinfectante sobre *Staphylococcus aureus* salvaje a distintas concentraciones.

Concentración %	Tiempo (min)	N (ufc/mL)	E (%)	k (min ⁻¹)	TRD (min)
0,1	0	2,72*10 ⁷	-	-	-
	1	5,69*10 ⁶	79,080	1,64	1,40
	* 5	2,45*10 ⁵	98,975	0,92	2,50
	10	2,81*10 ³	99,986	0,91	2,52
**0,25	0	1,36*10 ⁷	-	-	-
	1	2,49*10 ⁶	81,691	1,69	1,36
	* 5	3,36*10 ⁴	99,7011	1,35	1,70
	10	2,33*10	99,9998	1,33	1,73
**0,5	0	2,65*10 ⁷	-	-	-
	1	2,22*10 ⁴	99,8666	7,08	0,32
	*5	< 10 ufc	99,99999	2,95	0,78
	10	< 10 ufc	99,99999	1,48	1,55

* Tiempo recomendado por el fabricante.

** Rango de concentraciones recomendadas por el fabricante.

Los datos presentados en la tabla 3 muestran la E (%), k y TRD para *Staphylococcus aureus* salvaje a las distintas concentraciones y tiempos.

Para la concentración de 0,1 %, la máxima eficiencia se logra a partir de los diez minutos obteniéndose solamente un 99,9% de destrucción, mientras que para 0,25% la eficiencia es de 99,999% a partir del mismo período de tiempo de contacto, 10 minutos. Diferente es el caso cuando el producto se usa al 0,5%, donde ya a los 5 min se alcanza una eficiencia del 99,999%.

La velocidad específica de muerte, aumenta con la concentración, sin embargo los valores obtenidos a la concentración de 0,1% y 0,25% son similares al primer minuto, siendo de 1,64 y 1,69, respectivamente. Esto permite suponer que la cinética de muerte es similar para ambas concentraciones, siendo sin embargo ligeramente

mayor a la concentración de 0,25%. Los valores de k obtenidos a la concentración de 0,5%, son superiores a los de las otras concentraciones, en todos los tiempos ensayados.

El TRD disminuye con la concentración y aumenta al transcurrir el tiempo. Es así como a la concentración de 0,5% los TRD son significativamente menores que a 0,25%. Al primer minuto de acción del producto, la relación de los valores de TRD es de 1:4, a los 5 minutos es 1:2 y a los 10 minutos es casi de 1:1.

2.3 Acción del desinfectante sobre *Escherichia coli* ATCC 25922.

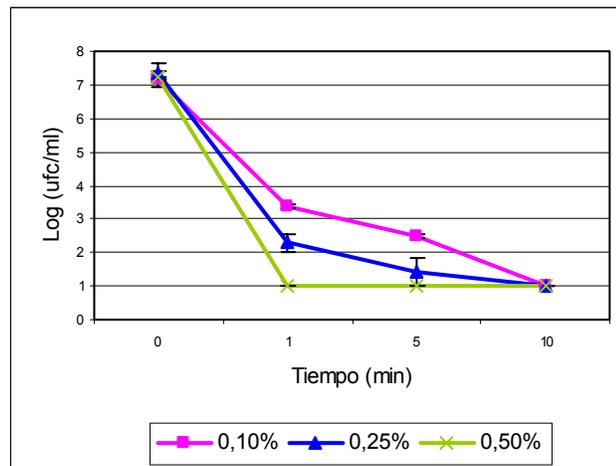


Figura 3: Efecto *in vitro* del desinfectante a 0,10%, 0,25% y 0,50% sobre *Escherichia coli* ATCC 25922.

La figura 3 representa la cinética de muerte de *Escherichia coli* ATCC 25922.

Se observa que durante el primer minuto de acción del producto, ocurre la disminución más significativa, Para las concentraciones de 0,1% y 0,25% después de 1 min de contacto, la velocidad de reducción disminuye considerablemente, sin embargo se observa una reducción de 6 ciclos logarítmicos a partir de los 10 minutos. Al usar el producto al 0,5% la reducción en el recuento de la cepa en estudio es de más de 6 ciclos logarítmicos a partir del primer minuto de acción.

Tabla 4. Actividad antimicrobiana del desinfectante sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 a distintas concentraciones.

Concentración %	Tiempo (min)	N (ufc/mL)	E (%)	k (min ⁻¹)	TRD (min)
0,1	0	1,61*10 ⁷	-	-	-
	1	2,44*10 ³	99,9803	7,89	0,3
	*5	3,28*10 ²	99,9976	1,98	1,18
	10	< 10 ufc	99,99999	1,64	1,39
**0,25	0	2,65*10 ⁷	-	-	-
	1	2,2*10 ²	99,9989	11,63	0,19
	* 5	3,5*10	99,9998	2,75	0,84
	10	< 10 ufc	99,99999	1,69	1,36
**0,5	0	1,64*10 ⁷	-	-	-
	1	< 10 ufc	99,99999	16,60	0,13
	*5	< 10 ufc	99,99999	3,32	0,69
	10	< 10 ufc	99,99999	1,66	1,38

* Tiempo recomendado por el fabricante.

** Rango de concentraciones recomendadas por el fabricante.

Los datos presentados en la tabla 4 muestran la E(%), K y TRD para *Escherichia coli* ATCC 25922, a diferentes concentraciones y tiempos.

Eficiencias mayores del 99,999% se lograron para 0,1% luego de los 10 minutos de acción, mientras que a 0,25% y 0,5% la misma eficacia se obtuvo luego de 5 y 1 minutos, respectivamente.

La velocidad específica de muerte es mayor a medida que aumenta la concentración. Sin embargo los resultados obtenidos a los diez minutos a las tres concentraciones ensayadas, resultaron ser similares (1,64; 1,69; 1,66), por lo que se puede deducir que pasado cierto tiempo, la velocidad específica de muerte llega a un valor constante independiente de la concentración con la cual se trabaje.

El TRD aumenta con el tiempo de contacto, siendo menor a la mayor concentración. Sin embargo a los 10 minutos, los valores observados son similares para las tres concentraciones (1,39; 1,36; 1,38).

2.4 Acción del desinfectante sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

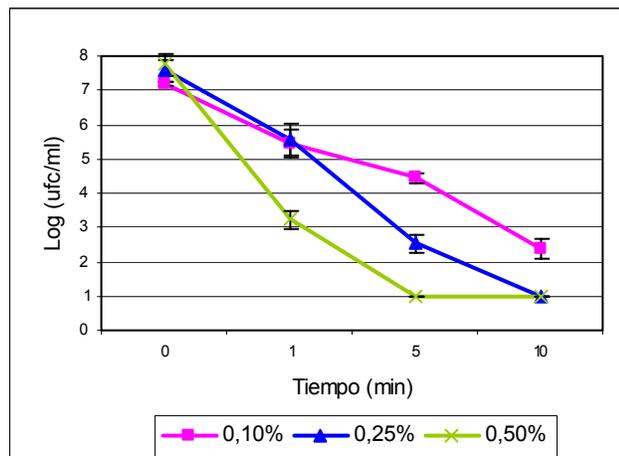


Figura 4: Efecto *in vitro* del desinfectante a 0,10%, 0,25% y 0,50% sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

En este caso cabe destacar que la cinética de muerte del microorganismo, es diferente a la observada en las cepas presentadas anteriormente. No se produce una reducción tan drástica dentro del primer minuto de acción del producto desinfectante, ni siquiera al utilizar una concentración de 0,5%.

Este hecho podría estar indicando una mayor resistencia a la acción biocida del producto, si se lo compara con las otras cepas estudiadas.

Al usar una concentración de 0,1%, en ningún momento se alcanza una reducción de 6 ciclos logarítmicos, como se observó en los casos anteriores. Sólo se disminuye en 6 ciclos a los 5 y 10 min para las concentraciones de 0,5% y 0,25%, respectivamente.

Tabla 5. Actividad antimicrobiana del desinfectante sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 a distintas concentraciones.

Concentración %	Tiempo (min)	N (ufc/mL)	E (%)	k (min ⁻¹)	TRD (min)
0,1	0	1,53*10 ⁷	-	-	-
	1	3,82*10 ⁵	97,5568	4,14	0,56
	* 5	2,96*10 ⁴	99,8012	1,25	1,84
	10	2,68*10 ²	99,9981	1,10	2,09
**0,25	0	4,57*10 ⁷	-	-	-
	1	4,84*10 ⁵	98,2692	4,66	0,53
	* 5	3,85*10 ²	99,9985	2,33	0,99
	10	< 10 ufc	99,99999	1,75	1,31
**0,5	0	6,64*10 ⁷	-	-	-
	1	1,89*10 ³	99,9963	10,43	0,21
	*5	< 10 ufc	99,99999	3,57	0,64
	10	< 10 ufc	99,99999	1,78	1,29

* Tiempo recomendado por el fabricante.

** Rango de concentraciones recomendadas por el fabricante.

Los datos presentados en la tabla 5 muestran la E (%), k y TRD para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Para la concentración de 0,1% la mayor eficiencia se logra a los 10 minutos, siendo ésta solamente de 99,99%. Sin embargo es notable la reducción de la población microbiana, evidenciada con una eficacia del 99,99999% luego de 10 y 5 min de contacto a las concentraciones de 0,25% y 0,5%, respectivamente.

El valor de k es mayor a medida que aumenta la concentración. Sin embargo para las concentraciones de 0,1% y 0,25% al minuto de acción, estos valores son similares. A partir de los 5 minutos existe una diferenciación siendo mayor el valor de k a 0,25%. Al usar el producto al 0,5%, a los 10 min se observa una similitud con el valor obtenido para la concentración de 0,25%.

Los valores de TRD disminuyen desde el primer minuto desde 0,56 para la concentración de 0,1% hasta 0,21 al usar el producto al 0,5%. No existe mayor diferencia a este tiempo, entre los valores resultantes para las concentraciones de 0,1% y 0,25%.

3. Resumen de los valores de k (velocidad específica de muerte) de las distintas cepas de prueba.

Tabla 6. Valores de k para los distintos microorganismos estudiados.

Concentración	Tiempo (minutos)	k			
		<i>Escherichia coli</i> salvaje	<i>Staphylococcus aureus</i> salvaje	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213
0,1%	1	7	1,64	7,89	4,14
	5	1,76	0,92	1,98	1,25
	10	1,42	0,91	1,64	1,10
** 0,25%	1	9,58	1,69	11,63	4,66
	*5	2,22	1,35	2,75	2,33
	10	1,71	1,33	1,69	1,75
** 0,50%	1	16,45	7,08	16,60	10,43
	*5	3,29	2,95	3,32	3,57
	10	1,64	1,48	1,66	1,78

* Tiempo recomendado por el fabricante

** Rango de concentraciones recomendadas por el fabricante

Los datos de la tabla 6 muestran los valores de k obtenidos para las distintas cepas frente a la acción del desinfectante. Se calcularon para cada concentración en base al recuento en tiempo cero y al obtenido en cada tiempo ensayado.

Se observa que tanto para *Escherichia coli* salvaje y *Escherichia coli* ATCC 25922 los valores obtenidos son similares. Sin embargo, para *Escherichia coli* ATCC

25922, k presenta valores ligeramente más elevados, lo que estaría indicando una mayor sensibilidad al compararlo con la cepa salvaje.

De igual forma, al comparar los resultados obtenidos para las dos cepas de *Staphylococcus aureus*, la cepa salvaje es más resistente que la cepa de colección.

Al comparar entre cepas salvajes, el *Staphylococcus aureus* resultó ser más resistente que *Escherichia coli*, ya que se observa claramente una diferencia notable en los valores de k.

Con respecto a las cepas de colección, por presentar menores valores de k, el *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 es más resistente que *Escherichia coli* ATCC 25922. Sin embargo existe una mayor cercanía entre los valores de k que el observado en las cepas salvajes.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede establecer en orden decreciente la resistencia de las cepas estudiadas: *Staphylococcus aureus* salvaje > *Staphylococcus aureus* ATC 29213 > *Escherichia coli* salvaje > *Escherichia coli* ATCC 25922.

4. Valores de coeficiente de dilución (η).

Tabla 7. Valores de coeficiente de dilución (η) para el desinfectante.

<i>Escherichia coli</i> salvaje	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> salvaje	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> ATCC 29213
0,65	0,37	0,30	0,77

Un valor del coeficiente de dilución igual a 1 implica que la actividad del desinfectante varía en potencia de 1 con la concentración (Hugo, 1971).

Entre los valores de coeficiente de dilución presentados en la tabla 7, no se observan mayores diferencias, ya que todos resultaron ser menores a 1.

Esto estaría indicando que no se logran cambios sustantivos en la acción desinfectante al variar la concentración del producto.

5. Análisis estadístico.

Para determinar la existencia o no, de diferencias significativas con un intervalo de confianza del 90%, se realizó un análisis de varianza multifactorial con los valores del recuento de microorganismos sobrevivientes, considerando como factores la concentración y el tiempo de contacto (ANEXO 1).

Tabla 8. Resumen de ANOVA.

<i>Escherichia coli</i> salvaje					
Factor concentración			Factor tiempo de contacto		
Concentración	Recuento promedio (ufc/mL)	p-value	Tiempo	Recuento promedio (ufc/mL)	p-value
0,10% ^a	9,49*10 ³	0,2961	1 ^a	8,62*10 ³	0,3755
0,25% ^a	7,9*10 ²		5 ^a	1,66*10 ³	
0,50% ^a	10		10 ^a	1,22*10 ¹	
<i>Staphylococcus aureus</i> salvaje					
FACTOR CONCENTRACIÓN			FACTOR TIEMPO DE CONTACTO		
Concentración	Recuento promedio (ufc/mL)	p-value	Tiempo	Recuento promedio (ufc/mL)	p-value
0,10% ^a	9,26*10 ²	0,3371	1 ^a	8,9*10 ²	0,3711
0,25% ^a	8,83*10		5 ^a	1,16*10 ²	
0,50% ^a	10		10 ^a	10	

Tabla 9. Resumen de ANOVA.

<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.					
FACTOR CONCENTRACIÓN			FACTOR TIEMPO DE CONTACTO		
Concentración	Recuento promedio (ufc/mL)	p-value	Tiempo	Recuento promedio (ufc/mL)	p-value
0,10% ^a	1,97*10 ⁶	0,4055	1 ^a	2,73*10 ⁶	0,1733
0,25% ^a	8,41*10 ⁵		5 ^a	9,28*10 ⁴	
0,50% ^a	7,4*10 ⁵		10 ^a	9,47*10 ²	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.					
FACTOR CONCENTRACIÓN			FACTOR TIEMPO DE CONTACTO		
Concentración	Recuento promedio (ufc/mL)	p-value	Tiempo	Recuento promedio (ufc/mL)	p-value
0,10% ^a	1,37*10 ⁵	0,4252	1 ^a	2,89*10 ⁵	0,1179
0,25% ^a	1,61*10 ⁵		5 ^a	9,99*10 ³	
0,50% ^a	6,36*10 ²		10 ^b	9,6*10	

* p-value ≤ 0,10 indica diferencia estadísticamente significativa.

Superíndices distintos en una misma columna indican diferencia estadísticamente significativa.

Las tablas 8 y 9 presentan un resumen del estadígrafo ANOVA para *Escherichia coli* salvaje, *Staphylococcus aureus* salvaje, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, tanto para el factor concentración como para el factor tiempo de contacto. Se realizó el test de rangos múltiples de Duncan y se estableció la existencia de diferencias significativas con un nivel de confianza del 90%.

Al realizar el test de rangos múltiples de Duncan para *Escherichia coli* salvaje, *Staphylococcus aureus* salvaje y *Escherichia coli* ATCC 25922 con respecto al factor concentración, no se observó la existencia de diferencias significativas entre las concentraciones 0,1%, 0,25% y 0,50%, pues el p-value fue en todos los casos mayor a 0,1 y los superíndices fueron iguales. Tampoco se observó diferencias respecto al

recuento obtenido a los diferentes tiempos de contacto, los cuales fueron 1, 5 y 10 minutos.

Sin embargo en el caso de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, si bien no se observaron diferencias significativas con respecto de la acción del desinfectante a las distintas concentraciones usadas, si se observó diferencias significativas respecto a la acción del desinfectante a los distintos tiempos. Esto se evidencia por los distintos superíndices obtenidos, difiriendo la acción del desinfectante de 1 y 5 minutos, respecto de la acción a los 10 minutos.

VII. DISCUSIÓN.

Tabla 10. Resumen de Eficiencia germicida porcentual del desinfectante frente a diversos microorganismos.

Concentración	Tiempo (minutos)	% Eficiencia			
		<i>Escherichia coli</i> salvaje	<i>Staphylococcus aureus</i> salvaje	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213
0,1%	1	99,898	79,080	99,980	97,556
	5	99,816	98,975	99,997	99,801
	10	99,999	99,986	99,999	99,996
** 0,25%	1	99,991	81,691	99,998	98,269
	*5	99,998	99,701	99,999	99,998
	10	99,999	99,999	99,999	99,999
** 0,50%	1	99,999	99,866	99,999	99,996
	*5	99,999	99,999	99,999	99,999
	10	99,999	99,999	99,999	99,999

* Tiempo recomendado por el fabricante.

** Rango de concentraciones recomendadas por el fabricante.

Considerando las concentraciones y tiempos recomendados por el fabricante, se determinó que para todas las cepas en estudio, se obtuvieron eficiencias del 99,999%, con lo cual se podría considerar que se cumple con lo establecido por el test de Chambers respecto a la reducción de 5 ciclos logarítmicos de la población microbiana inicial, pero no así con la premisa de que esta reducción debe realizarse una vez transcurridos 30 seg de contacto con el producto.

En el estudio utilizando el mismo desinfectante, realizado por Acevedo (2006) pero frente a *Escherichia coli* O157:H7, se logra una eficacia del 99,999% a partir de

los 10 min de acción a una concentración de 0,5%. En el presente estudio tal eficiencia se observa utilizando la misma concentración, pero a partir de 1 min de acción, esto demuestra la influencia que presenta en los resultados la variedad de las cepas estudiadas.

Investigaciones realizadas en el Stadslaboratorium Gent (1988), frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 10536, reportan eficiencias de 99,999% a los 5 minutos de acción del mismo producto a una concentración de 1%. Dicha eficacia se logró en el presente estudio, frente a todas las cepas ensayadas, al mismo tiempo pero a una menor concentración del producto, 0,5%.

Estudios realizados por Vessoni et al (2001), evaluaron la eficacia de agentes químicos frente a diversos microorganismos, determinando para cada uno de ellos la concentración mínima inhibitoria (CMI). Al usar glutaraldehído, la CMI para *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fue de 0,325% y 0,1875% respectivamente, sin embargo al usar formaldehído sobre las mismas cepas, la CMI fue de 0,0156% en ambos casos, ambos forman parte del producto ensayado en esta memoria, siendo el formaldehído más eficiente, puesto que se necesita una concentración menor para destruir la misma cantidad de microorganismos, el producto usado en este estudio contiene mayor cantidad de formaldehído (84 g/l) que glutaraldehído (58 g/L), siendo el formaldehído el compuesto que se encuentra en mayor proporción en la formulación, hecho que podría explicar el buen efecto germicida que el producto ensayado manifiesta.

En un estudio realizado por Hidalgo et al (2000) en donde se comparaba la acción de peróxido de hidrógeno al 7% y glutaraldehído al 2% sobre *Escherichia coli* ATCC 10536 Y *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 obtuvo que en ambos casos y sobre ambas cepas, se obtuvo un recuento de 0 ufc/ml, con un 100% de inhibición luego de 20 minutos de acción.

Briñez et al (2006) determinó la eficacia germicida del ácido peracético en combinación con el peróxido de hidrógeno sobre *Escherichia coli* ATCC 10536 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, resultando que el *Staphylococcus aureus* fue más

resistente a bajas concentraciones del desinfectante (0,05%), sin embargo a 0,1% y 10 minutos de acción, ambas cepas mostraron igual comportamiento frente a la acción del desinfectante. Esto coincide con lo obtenido en este estudio, puesto que a bajas concentraciones y corto tiempo de acción, *Staphylococcus aureus* resultó ser más resistente, sin embargo a mayores concentraciones las eficiencias obtenida entre ambas cepas resultaron ser similares.

Sobre acero inoxidable, Rossoni et al (2000), determinó la acción del ácido peracético, usado entre 250 y 1000 mg/l con un tiempo de acción de 10 minutos, sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* aislados de carcasas de pollo. El número de células adheridas de *Escherichia coli* se redujo en más del 90% al usar 250 mg/l, no obstante para *Staphylococcus aureus* la reducción fue sólo del 50%. Sin embargo para este último microorganismo, al usar ácido peracético a una concentración de 1000 mg/l se logra una reducción del 90% de células adheridas.

Diez de Medina (1983), reporta datos de eficiencia al usar un compuesto anfolítico a 1500 ppm y 10 min de acción frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* de 79,81% y 93,918%, respectivamente. Al usar un compuesto yodóforo, obtuvo eficiencias para *Escherichia coli* de 99,999% y para *Staphylococcus aureus* de 99,998% a una concentración de 80 ppm a los 3 minutos de acción.

De acuerdo a los datos mencionados, es posible apreciar que no existe una tendencia definida del comportamiento de cada una de las cepas, ya que va a depender del producto utilizado, entre otros factores. Sin embargo, a través de la información recolectada y considerando la variedad de cepas y productos, se puede apreciar que en general *Staphylococcus aureus* presenta una mayor resistencia que *Escherichia coli*.

VIII. CONCLUSIONES.

El desinfectante usado a las condiciones de concentración y tiempo recomendadas por el fabricante, presenta *in vitro* una reducción de 5 ciclos logarítmicos frente a *Escherichia coli* salvaje, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* salvaje y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

La cepa que resultó ser más sensible fue *Escherichia coli* ATCC 25922 y la más resistente *Staphylococcus aureus* salvaje.

El neutralizante empleado inactiva adecuadamente al desinfectante y no presentó actividad bactericida sobre las cepas bacterianas probadas en este estudio.

De acuerdo a los valores de k, la resistencia presentada por los microorganismos estudiados fue en orden decreciente: *Staphylococcus aureus* salvaje > *Staphylococcus aureus* ATC 29213 > *Escherichia coli* salvaje > *Escherichia coli* ATCC 25922.

En todas las cepas estudiadas, no se observó diferencias estadísticamente significativas, entre la mayor y la menor concentración del desinfectante estudiado. Tampoco se observó diferencias respecto al recuento obtenido a los diferentes tiempos de contacto para *Escherichia coli* salvaje, *Staphylococcus aureus* salvaje y *Escherichia coli* ATCC 25922. Sólo para el caso de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, se observó diferencias significativas entre la acción a los 1 y 5 minutos y la acción a los 10 minutos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en ningún caso se cumple con lo establecido por el test de Chambers, ya que no se obtiene la eficacia requerida al tiempo de contacto de 0,5 min.

Los coeficientes de dilución determinados indican que no se logran cambios sustantivos en la acción desinfectante al variar la concentración del producto.

Los resultados de este trabajo señalan, que es necesario efectuar un estudio específico de la efectividad de los productos desinfectantes, frente a las cepas características de la microflora propia de las plantas elaboradoras de alimentos, a fin de que en forma experimental se llegue a determinar las condiciones adecuadas de uso de estos productos para lograr un resultado efectivo al aplicar programas de desinfección.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Acevedo, (2006). "Estudio comparativo de la eficacia de desinfectantes de uso industrial sobre *Listeria innocua* ATCC 33090 y *Escherichia coli* O157:H7-VT(N) NCTC 12900" Memoria para optar al título de Ingeniero en Alimentos, Universidad de Chile. Santiago de Chile.
2. AOAC, (1984). "Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists". 12th Ed. Washington. USA.
3. Ayres, J., Mundt, J., Sandine, W., (1980) "Microbiology of Foods" W.H.Freeman & Co. San Francisco, USA.
4. Betancourth, M., Botero, J. y Rivera, S., (2004). "Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo". Colombia Médica. 35 (3) Supl1: 35-39.
5. Briñez. J., Roig-Sagues A., Hernández, Tomas López T., (2006) "Bactericidal efficacy of peracetic acid in combination with hydrogen peroxide against pathogenic and non pathogenic strains of Staphylococcus spp., *Listeria* spp. and *Escherichia coli* ".Food Control 17:516–552.
6. Carpentier, B., y O. Cerf. (1993) "Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry". J. Appl. Bacteriol. 75:499–511.
7. Diez de Medina, Dafne (1983). "Evaluación de la Eficacia Germicida de Desinfectantes". Memoria para optar al título de Ingeniero en Alimentos, Universidad de Chile. Santiago de Chile.
8. Dontorou, C., Papadopoulou, C., Filioussis, G., Economou, V., Apostolou, I., Zakkas, G., et al. (2003). Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods in Greece. Internl. J. of Food Microbiol. 82: 273–279.
9. Griffin, P. M., Tauxe, R. V. (1991). "The Epidemiology infection caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *Escherichia coli*, and associated hemolytic uremic syndrome". Epidemiological Review, 13:60-96.

10. Hidalgo, R. ,1 Castellanos, V., Chiroles, S., Villavicencio, O., (2000)” Estudio químico-microbiológico comparativo de dos soluciones propuestas para la desinfección de endoscopios” Rev. Cubana Hig. Epidemiol. 38(3):210-4.
11. http://www.geocities.com/raydelpino_2000/desinfección.htm
12. <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/1/16>
13. Hugo, W.B., (1971) Chemical Disinfectants, Antiseptics and Preservatives. Department of Pharmacy. University of Nottingham England. Academic Press. London. New York.
14. ICMSF, (1978). “Microorganisms in Foods, their significance and methods of enumeration”. 2nd edition. University of Toronto Press. Toronto/Buffalo/London
15. López, L., Romero, J. y Urbina, J. (1988).” Eficiencia de desinfectantes en vegetales y frutas”. Alimentos 13(1):25-30.
16. López, L., Romero, J. y Ureta, F. (2002).”Acción germicida *in vitro* de productos desinfectantes de uso en la industria de Alimentos”. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 52(1):74-76.
17. Luppens, S., Reij, M., Van der Heijden, R., Rombouts,F., & Abee, T. (2002). Development of a Standard test to assess the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectant. Appl. and Environ. Microb. 68(9), 4194–4200.
18. Peng, J., Tsai, W., & Chou, C. (2002). Inactivation and removal of bacillus cereus by sanitizer and detergent. Internl. J. of Food Microbiol, 77, 11–18.
19. Rossoni, M., y Gaylard C, “Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy” (2000). Internl. J. of Food Microbiol, 61:81–85.
20. Russel, A.D.,(1998). Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. J Hosp infect. Supl 43: 57- 68.
21. Stadslaboratorium Gent, (1988). “Determination of the anti-microbial power of the formulation CID-20 (according to the European Suspension Test – method (EST)”. Belgium.
22. Taormina, P. J., & Beuchat, L. R. (2002). Survival of *Listeria monocytogenes* in commercial food-processing equipment cleaning solutions and subsequent sensitivity to sanitizers and heat. J. Appl. Bacteriol 92, 71–80.

23. Tarte, R., Murano, E. A., & Olson, D. G. (1996). Survival and injury of *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* and *Listeria ivanovii* in ground pork following electron beam irradiation. *J Food Prot*, 59, 596–600.
24. Tauxe, R., (2002). Emerging Foodborne pathogens. *Internl. J. of Food Microbiol*, 78, 31–41.
25. Ureta, F., (1997). "Evaluación de la actividad germicida de ácido láctico, ácido peracético y extracto de semilla de toronja". Memoria para optar al título de Ingeniero en Alimentos, Universidad de Chile. Santiago de Chile.
26. Vessoni, T., Gava, P., y Silva, A., (2001) "The efficacy of chemical agents in cleaning and disinfection programs". *BMC Infectious Diseases* 1:16.

ANEXO 1

Escherichia coli salvaje

Analysis of Variance for *E coli* salvaje - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Concentracion	1,66233E8	2	8,31165E7	1,68	0,2961
B:Tiempo	1,2538E8	2	6,26898E7	1,26	0,3755
RESIDUAL	1,98446E8	4	4,96114E7		
TOTAL (CORRECTED)	4,90058E8	8			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variability of *E coli* salvaje into contributions due to various factors. Since Type III sums of squares (the default) have been chosen, the contribution of each factor is measured having removed the effects of all other factors. The P-values test the statistical significance of each of the factors. Since no P-values are less than 0,05, none of the factors have a statistically significant effect on *E coli* salvaje at the 90,0% confidence level.

Multiple Range Tests for *E coli* salvaje by Tiempo

Method: 90,0 percent Duncan			
Tiempo	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
10	3	12,2	X
5	3	1657,67	X
1	3	8623,33	X
Contrast		Difference	
1 - 5		6965,67	
1 - 10		8611,13	
5 - 10		1645,47	

* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor

This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. There are no statistically significant differences between any pair of means at the 90,0% confidence level. At the top of the page, one homogenous group is identified by a column of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Duncan's multiple comparison procedure. With this method, there is a 10,0% risk of calling one or more pairs significantly different when their actual difference equals 0.

Multiple Range Tests for E coli salvaje by Concentracion

```

-----
Method: 95,0 percent LSD
Concentracion  Count      Mean                Homogeneous Groups
-----
0,5            3           10,0                X
0,25           3          791,0                X
0,1            3         9492,2                X
-----
Contrast                Difference            +/- Limits
-----
0,1 - 0,25              8701,2                14677,6
0,1 - 0,5                9482,2                14677,6
0,25 - 0,5              781,0                 14677,6
-----

```

* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor

```

-----
This table applies a multiple comparison procedure to determine
which means are significantly different from which others. The bottom
half of the output shows the estimated difference between each pair of
means. There are no statistically significant differences between any
pair of means at the 90,0% confidence level. At the top of the page,
one homogenous group is identified by a column of X's. Within each
column, the levels containing X's form a group of means within which
there are no statistically significant differences. The method
currently being used to discriminate among the means is Fisher's least
significant difference (LSD) procedure. With this method, there is a
10,0% risk of calling each pair of means significantly different when
the actual difference equals 0.

```

Escherichia coli ATCC 25922

Analysis of Variance for E coli ATCC 25922 - Type III Sums of Squares

```

-----
Source                Sum of Squares      Df    Mean Square      F-Ratio    P-Value
-----
MAIN EFFECTS
A:Concentracion        5,87865E12          2     2,93933E12        1,14       0,4055
B:Tiempo               1,44543E13          2     7,22715E12        2,80       0,1733
RESIDUAL                1,0308E13           4     2,57699E12
-----
TOTAL (CORRECTED)      3,06409E13          8
-----

```

All F-ratios are based on the residual mean square error.

The StatAdvisor

```

-----
The ANOVA table decomposes the variability of E coli ATCC 25922
into contributions due to various factors. Since Type III sums of
squares (the default) have been chosen, the contribution of each
factor is measured having removed the effects of all other factors.
The P-values test the statistical significance of each of the factors.
Since no P-values are less than 0,05, none of the factors have a
statistically significant effect on E coli ATCC 25922 at the 90,0%
confidence level.

```

Multiple Range Tests for E coli ATCC 25922 by Concentracion

```

-----
Method: 90,0 percent Duncan
Concentracion  Count      LS Mean      Homogeneous Groups
-----
0,5            3            7406,67      X
0,25           3            841208,0     X
0,1            3            1,97927E6    X
-----
Contrast                               Difference
-----
0,1 - 0,25                               1,13806E6
0,1 - 0,5                                 1,97186E6
0,25 - 0,5                                833801,0
-----

```

* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor

```

-----
This table applies a multiple comparison procedure to determine
which means are significantly different from which others. The bottom
half of the output shows the estimated difference between each pair of
means. There are no statistically significant differences between any
pair of means at the 90,0% confidence level. At the top of the page,
one homogenous group is identified by a column of X's. Within each
column, the levels containing X's form a group of means within which
there are no statistically significant differences. The method
currently being used to discriminate among the means is Duncan's
multiple comparison procedure. With this method, there is a 10,0%
risk of calling one or more pairs significantly different when their
actual difference equals 0.
-----

```

Multiple Range Tests for E coli ATCC 25922 by Tiempo

```

-----
Method: 95,0 percent LSD
Tiempo        Count      LS Mean      Homogeneous Groups
-----
10            3            947,767      X
5             3            92870,0     X
1             3            2,73407E6    X
-----
Contrast                               Difference      +/- Limits
-----
1 - 5                               2,6412E6        3,28153E6
1 - 10                              2,73312E6       3,28153E6
5 - 10                              91922,2         3,28153E6
-----

```

* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor

```

-----
This table applies a multiple comparison procedure to determine
which means are significantly different from which others. The bottom
half of the output shows the estimated difference between each pair of
means. There are no statistically significant differences between any
pair of means at the 90,0% confidence level. At the top of the page,
one homogenous group is identified by a column of X's. Within each
column, the levels containing X's form a group of means within which
there are no statistically significant differences. The method
currently being used to discriminate among the means is Fisher's least
significant difference (LSD) procedure. With this method, there is a
5,0% risk of calling each pair of means significantly different when
the actual difference equals 0.
-----

```

Staphylococcus aureus salvaje

Analysis of Variance for S aureus salvaje - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value

MAIN EFFECTS					
A:Concentracion	1,54688E6	2	773439,0	1,44	0,3371
B:Tiempo	1,37372E6	2	686859,0	1,28	0,3711
RESIDUAL	2,14146E6	4	535364,0		

TOTAL (CORRECTED)	5,06205E6	8			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variability of S aureus salvaje into contributions due to various factors. Since Type III sums of squares (the default) have been chosen, the contribution of each factor is measured having removed the effects of all other factors. The P-values test the statistical significance of each of the factors. Since no P-values are less than 0,05, none of the factors have a statistically significant effect on S aureus salvaje at the 90,0% confidence level.

Multiple Range Tests for S aureus salvaje by Concentracion

Method: 90,0 percent Duncan			
Concentracion	Count	LS Mean	Homogeneous Groups

0,5	3	10,0	X
0,25	3	88,3333	X
0,1	3	926,0	X

Contrast		Difference	

0,1 - 0,25		837,667	
0,1 - 0,5		916,0	
0,25 - 0,5		78,3333	

* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor

This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. There are no statistically significant differences between any pair of means at the 90,0% confidence level. At the top of the page, one homogenous group is identified by a column of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Duncan's multiple comparison procedure. With this method, there is a 10,0% risk of calling one or more pairs significantly different when their actual difference equals 0.

Multiple Range Tests for S aureus salvaje by Tiempo

```

-----
Method: 90,0 percent Duncan
Tiempo      Count      LS Mean      Homogeneous Groups
-----
10           3           10,0         X
5            3          124,333     X
1            3           890,0         X
-----
Contrast                Difference
-----
1 - 5                    765,667
1 - 10                   880,0
5 - 10                   114,333
-----

```

* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor

This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. There are no statistically significant differences between any pair of means at the 90,0% confidence level. At the top of the page, one homogenous group is identified by a column of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Duncan's multiple comparison procedure. With this method, there is a 10,0% risk of calling one or more pairs significantly different when their actual difference equals 0.

Staphylococcus aureus ATCC 29213

Analysis of Variance for S aureus ATCC 29213 - Type III Sums of Squares

```

-----
Source                Sum of Squares      Df      Mean Square      F-Ratio      P-Value
-----
MAIN EFFECTS
A:Concentracion      4,51242E10           2        2,25621E10         1,07         0,4252
B:Tiempo              1,61743E11           2        8,08713E10         3,83         0,1179
RESIDUAL              8,45582E10           4        2,11395E10
-----
TOTAL (CORRECTED)    2,91425E11           8
-----

```

All F-ratios are based on the residual mean square error.

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variability of S aureus ATCC 29213 into contributions due to various factors. Since Type III sums of squares (the default) have been chosen, the contribution of each factor is measured having removed the effects of all other factors. The P-values test the statistical significance of each of the factors. Since no P-values are less than 0,05, none of the factors have a statistically significant effect on S aureus ATCC 29213 at the 90,0% confidence level.

Multiple Range Tests for S aureus ATCC 29213 by Tiempo

```

-----
Method: 90,0 percent Duncan
Tiempo      Count      LS Mean      Homogeneous Groups
-----
10           3           96,0         X
5            3           9998,33      X
1            3           289297,0     X
-----
Contrast      Difference
-----
1 - 5         *279298,0
1 - 10        *289201,0
5 - 10        9902,33
-----

```

* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor

```

-----
This table applies a multiple comparison procedure to determine
which means are significantly different from which others. The bottom
half of the output shows the estimated difference between each pair of
means. An asterisk has been placed next to 2 pairs, indicating that
these pairs show statistically significant differences at the 90,0%
confidence level. At the top of the page, 2 homogenous groups are
identified using columns of X's. Within each column, the levels
containing X's form a group of means within which there are no
statistically significant differences. The method currently being
used to discriminate among the means is Duncan's multiple comparison
procedure. With this method, there is a 10,0% risk of calling one or
more pairs significantly different when their actual difference equals
0.

```

Multiple Range Tests for S aureus ATCC 29213 by Concentracion

```

-----
Method: 90,0 percent Duncan
Concentracion Count      LS Mean      Homogeneous Groups
-----
0,5           3           636,667      X
0,1           3           137289,0     X
0,25          3           161465,0     X
-----
Contrast      Difference
-----
0,1 - 0,25    -24175,7
0,1 - 0,5     136653,0
0,25 - 0,5    160828,0
-----

```

* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor

```

-----
This table applies a multiple comparison procedure to determine
which means are significantly different from which others. The bottom
half of the output shows the estimated difference between each pair of
means. There are no statistically significant differences between any
pair of means at the 90,0% confidence level. At the top of the page,
one homogenous group is identified by a column of X's. Within each
column, the levels containing X's form a group of means within which
there are no statistically significant differences. The method
currently being used to discriminate among the means is Duncan's
multiple comparison procedure. With this method, there is a 10,0%
risk of calling one or more pairs significantly different when their
actual difference equals 0.

```