



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA DENSIDAD DE
POBLACIÓN Y LA FASE DE CRECIMIENTO SOBRE LA
LETALIDAD POR PULSOS DE LUZ EN
MICROORGANISMOS ASOCIADOS A ALIMENTOS**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
Presentado ante la Ilustre Universidad
Central de Venezuela, por la bachiller
Elizabeth Cudemos para optar al título
de Licenciado en Biología

Tutora: MSc. Adriana Izquier

Caracas, Venezuela
Octubre - 2010

RESUMEN

Dentro de las nuevas tecnologías no térmicas ni químicas para procesar alimentos se encuentra el tratamiento con pulsos de luz, que se ha usado para la desinfección de superficies, aguas y podría ser aplicado para la obtención de alimentos o productos alimenticios, mínimamente procesados pero más seguros, ya que se ha demostrado que tienen efectos bactericidas. La característica más importante de la tecnología de pulsos de luz es que, aparte del número y la duración, la energía proporcionada es mayor que la obtenida por una radiación de luz continua. Mientras más corta es la duración de cada pulso, más alta es su intensidad, aumentando su capacidad de inactivación microbiana. Sin embargo, poco se sabe de su efecto de esta tecnología sobre la densidad de población y en diferentes etapas de crecimiento de un cultivo microbiano. En este estudio se evaluó, el efecto de un pulso de luz a una intensidad de $0,35 \text{ J/cm}^2$, sobre la inactivación de un cultivo de *Pseudomona fluorescens* a diferentes densidades de población (10^9 , 10^8 , 10^6 , 10^4 y 10^2 UFC/mL) y sobre las fases de crecimiento (Fase de latencia, exponencial y estacionaria) de *Pseudomona fluorescens*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Saccharomyces cerevisiae*. Para ello, estos microorganismos fueron incubados a 30° y $35-37^\circ \text{ C}$ según su temperatura de crecimiento, durante 24 horas. Los resultados fueron evaluados mediante el conteo de UFC y se realizó un análisis estadístico. Se determinó que a diferentes densidades de población y en las diferentes fases de crecimiento existe variación en su susceptibilidad por la inactivación con pulsos de luz.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE ANEXOS	VI
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
1. Principios de los pulsos de luz	3
2. Inactivación microbiana	7
2.1 Ejemplos de inactivación microbiana por pulsos de luz	7
2.1.1 Inactivación de bacterias	8
2.1.2 Inactivación de hongos	9
2.1.3 Inactivación de levaduras	10
2.1.4 Inactivación de virus	10
3. Mecanismos de acción de los pulsos de luz	11
3.1 Efecto Fotoquímico	11
3.2 Efecto Fototérmico	12
3.3 Efecto Fotofísico	14
4. Fotorreactivación y reparación en la oscuridad	15
5. Efectos de los pulsos de luz en alimentos	17
5.1 Alimentos líquidos	17
5.2 Alimentos sólidos de origen vegetal	19
5.3 Otros alimentos	19
6. Microorganismos de importancia	20

6.1 <i>Pseudomona fluorescens</i>	21
6.2 <i>Salmonella</i> spp.	22
6.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	22
6.4 <i>Bacillus cereus</i>	23
6.5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
III. OBJETIVOS	25
1. Objetivo general	25
1.1 Objetivos específicos	25
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	26
1. Equipo de trabajo y materiales	26
1.1 Lugar y equipo de trabajo	26
1.2 Preparación del material	27
1.2.1 Preparación del caldo nutritivo y caldo potato dextrosa	27
1.2.2 Preparación de agar nutritivo y agar potato dextrosa	27
1.2.3 Preparación de agua peptonada	28
1.3 Microorganismos bajo estudio	28
1.4 Activación y aislamiento de cepas	29
2. Efecto de la densidad de población sobre la efectividad antimicrobiana de los pulsos de luz	29
3. Efecto de la fase de crecimiento microbiano sobre la sensibilidad de algunos microorganismos a pulsos de luz	30
4. Análisis microbiológico	31
5. Análisis estadístico	31

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES	32
1. Efecto de la densidad de población sobre la efectividad antimicrobiana de los pulsos de luz	32
2. Efecto de la fase de crecimiento microbiano sobre la sensibilidad de algunos microorganismos a pulsos de luz	36
VI. CONCLUSIONES	54
VII. RECOMENDACIONES	56
VIII. BIBLIOGRAFÍA	57
IX. ANEXOS	65
1. Gráficos de resultados	65
1.1 Análisis estadístico para <i>P. fluorescens</i>	71
1.2 Análisis estadístico para <i>Salmonella</i> spp.	74
1.3 Análisis estadístico para <i>Listeria monocytogenes</i>	77
1.4 Análisis estadístico para <i>Bacillus cereus</i>	80
1.5 Análisis estadístico para <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	83
1.6 Análisis estadístico para Densidad de población en <i>P. fluorescens</i>	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efecto Fotoquímico sobre el ADN por acción de la luz ultravioleta	12
Figura 2. Micrografía de esporas de <i>Aspergillus niger</i> tratadas con Pulsos de Luz	13
Figura 3. Microscopia electrónica de transmisión de células de <i>Staphylococcus aureus</i> tratadas con pulsos de luz. A) Células control no tratadas. B) Células tratadas con pulsos de luz	15
Figura 4. Fotorreactivación del ADN por la enzima fotoliasa	16
Figura 5. Reparación del ADN por el mecanismo de escisión	17
Figura 6. Equipo de Pulsos de Luz modelo XeMaticA 1XL-SA (SteriBeam, Kehl, Alemania). Situado en el Laboratorio de Nuevas Tecnologías y Desarrollo de Productos del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) de la Universidad Central de Venezuela	26
Figura 7. Niveles de inactivación microbiana por pulsos de luz en diferentes densidades población para un cultivo de <i>Pseudomonas fluorescens</i> . Mediante el análisis de rangos múltiples de Duncan, letras diferentes indican diferencias significativas para $p < 0,05$	33
Figura 8. Curva de crecimiento de <i>P. fluorescens</i> , incubada a 30 °C por 8,5 h en función de la absorbancia (600 nm)	37
Figura 9. Curva de crecimiento de <i>Salmonella</i> spp., incubada a 35-37 °C por 7 h en función de absorbancia (600 nm)	38
Figura 10. Curva de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> , incubada a 35-37 °C por 9 h en función de la absorbancia (600 nm)	38
Figura 11. Curva de crecimiento de <i>Bacillus cereus</i> , incubada a 35-37 °C por 6 h en función de la absorbancia (600 nm).	39

- Figura 12.** Curva de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, incubada a 30 °C por 7,5 h en función de la absorbancia (600 nm). 40
- Figura 13.** Niveles de inactivación microbiana por pulsos de luz en tres fase de crecimiento para un cultivo de *Pseudomonas fluorescens*. Mediante el análisis de rangos múltiples de Duncan, letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Latencia (L1, L2, y L3), exponencial (Ex1, E2, y Ex3) y estacionario (Es1, Es2 y Es3). 42
- Figura 14.** Niveles de inactivación microbiana por pulsos de luz en tres fase de crecimiento para un cultivo de *Salmonella sp.* Mediante el análisis de rangos múltiples de Duncan, letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Latencia (L1, L2, y L3), exponencial (Ex1, E2, y Ex3) y estacionario (Es1, Es2 y Es3). 43
- Figura 15.** Niveles de inactivación microbiana por pulsos de luz en tres fase de crecimiento para un cultivo de *Listeria monocytogenes* Mediante el análisis de rangos múltiples de Duncan, letras iguales indican que no hay diferencias significativas para $p > 0,05$. Latencia (L1, L2, y L3), exponencial (Ex1, E2, y Ex3) y estacionario (Es1, Es2 y Es3) 45
- Figura 16.** Niveles de inactivación microbiana por pulsos de luz en tres fase de crecimiento para un cultivo de *B. cereus*. Mediante el análisis de rangos múltiples de Duncan, letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($P > 0,05$). Latencia (L1, L2, y L3), exponencial (Ex1, E2, y Ex3) y estacionario (Es1, Es2 y Es3) 46
- Figura 17.** Niveles de inactivación microbiana por pulsos de luz en tres fase de crecimiento para un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*. Mediante el análisis de rangos múltiples de Duncan, letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($P < 0,05$). Latencia (L1, L2, y L3), exponencial (Ex1, E2, y Ex3) y estacionario (Es1, Es2 y Es3) 48

ÍNDICE DE ANEXOS

Figura 18. Diferencias en la densidad de población de un cultivo de <i>P. fluorescens</i> antes y después de un tratamiento por PL	65
Figura 19. Concentración de un cultivo de <i>Pseudomonas fluorescens</i> antes y después de un tratamiento de pulsos de luz en las fases de crecimiento. Latencia (L1, L2, y L3), exponencial (Ex1, E2, y Ex3) y estacionario (Es1, Es2 y Es3)	66
Figura 20. Concentración de un cultivo de <i>Salmonella spp.</i> antes y después de un tratamiento de pulsos de luz en las fases de crecimiento. Latencia (L1, L2, y L3), exponencial (Ex1, E2, y Ex3) y estacionario (Es1, Es2 y Es3)	67
Figura 21. Concentración de un cultivo de <i>Listeria monocytogenes</i> antes y después de un tratamiento de pulsos de luz en las fases de crecimiento. Latencia (L1, L2, y L3), exponencial (Ex1, E2, y Ex3) y estacionario (Es1, Es2 y Es3)	68
Figura 22. Concentración de un cultivo de <i>B. cereus</i> antes y después de un tratamiento de pulsos de luz en las fases de crecimiento. Latencia (L1, L2, y L3), exponencial (Ex1, E2, y Ex3) y estacionario (Es1, Es2 y Es3)	69
Figura 23. Concentración de un cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> antes y después de un tratamiento de pulsos de luz en las fases de crecimiento. Latencia (L1, L2, y L3), exponencial (Ex1, E2, y Ex3) y estacionario (Es1, Es2 y Es3)	70

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por el consumo de alimentos contaminados sigue siendo una causa importante de morbilidad en todo el mundo. Claramente, el uso de métodos para reducir o eliminar los peligros microbiológicos asociados a alimentos tendrá un impacto significativo en la incidencia de dichas enfermedades. En la actualidad se usa una gran variedad de métodos de conservación y descontaminación de alimentos, incluyendo la cocción, congelación, deshidratación y la adición de conservantes (Barbosa-Cánovas y col., 1998).

Aunque estas tecnologías pueden producir alimentos seguros, la cocción y la congelación pueden contribuir a la degradación de algunos componentes, que disminuyen la calidad de alimentos. Para evitar los efectos térmicos indeseables en los alimentos, se han hecho esfuerzos importantes para el desarrollo de tecnologías no térmicas, que produzcan alimentos mínimamente procesados con cualidades nutritivas y organolépticas adecuadas (Barbosa-Cánovas y col., 1998).

Se conoce muy bien que los rayos ultravioleta (UV) tienen una gran capacidad para inactivar los microorganismos (Abad-Lozano y Rodríguez-Velera, 1984; Craik y col., 2001). En los últimos años, se ha introducido un nuevo método que usa energía eléctrica de alta potencia para generar pulsos intensos de luz. Se ha demostrado que tiene efectos bactericidas en los alimentos, superficies y entornos en donde se preparan alimentos (Mertens y Knorr, 1992).

Los pulsos de luz también han sido utilizados para la desinfección y esterilización de instrumentos médicos, procesamiento de agua y aire (Shama, 2007). El método es efectivo contra muchos microorganismos (bacterias, hongos, esporas, virus, protozoarios). Debido a sus características, el proceso es mucho más efectivo que los tratamientos convencionales que utilizan luz UV (Dunn, 2001).

Hoy en día, la literatura sobre pulsos de luz se está expandiendo rápidamente, pero sigue habiendo una brecha entre la investigación básica y aplicada con respecto a la descontaminación de alimentos (Ozer y Demirci, 2005). Sin embargo, en vista de posibles aplicaciones comerciales, esta tecnología conocida desde la década de 1980, fue aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) en 1996 y recientemente ha sido ampliamente investigada (Palmieri y Cacace, 2005).

Debido a la gran eficacia de esta tecnología sobre la destrucción microbiana, ya demostrado por ensayos *in vitro*, es importante realizar más estudios, que evalúen su eficacia a la hora de descontaminar productos. Sin embargo, muchos factores podrían influenciar la inactivación microbiana por PL en los alimentos, como la matriz del producto, la resistencia de diferentes microorganismos y su capacidad de reactivación ante esta tecnología, la densidad de población presente en un alimento y la etapa de crecimiento en la que se encuentran. Además, es importante evaluar la pérdida de propiedades sensoriales y nutricionales en un alimento tratado con pulsos de luz. Por lo anteriormente señalado en el presente trabajo, se estudiará el efecto de la densidad de población y de la fase de crecimiento microbiano sobre la efectividad microbicida de los pulsos de luz.

II. ANTECEDENTES

1. Principios de los pulsos de luz

Los pulsos de luz (PL) se generan utilizando tecnologías de ingeniería que aumentan la potencia de la energía muchas veces para convertir rápidamente impulsos eléctricos en pulsos de luz de alta intensidad. El sistema consta de tres componentes principales: la fuente de alimentación, el dispositivo de configuración de pulsos y la lámpara. La energía es almacenada en un condensador de alta potencia por un período relativamente largo (una fracción de segundo) de la que se libera a una unidad especial de lámpara de xenón en un tiempo mucho más corto (nanosegundos a milisegundos). La energía entregada a la lámpara produce un pulso de luz intenso que se concentra en el área de tratamiento, que suele durar unos pocos cientos de microsegundos. La luz producida por incluye radiaciones electromagnéticas ultravioleta de onda corta (UV-C) (Elmnasser y col., 2007). Este sistema trabaja con lámparas de xenón que pueden producir destellos varias veces por segundo (Gómez-López y col., 2007). Sólo se requieren de pocos destellos para producir un alto nivel de inactivación microbiana (Marriott, 1999).

Las radiaciones electromagnéticas son emitidas y propagadas por medio de ondas que poseen las siguientes características: longitud de onda (λ), la frecuencia (ν) y energía (E). El término “luz” se utiliza generalmente para referirse a las radiaciones del espectro electromagnético, que van de 180 a 1100 nm, que incluye a los rayos ultravioleta (UV, λ =180-400 nm aproximadamente, que a su vez se subdividen en UV-A (onda largas), de 315 a 400 nm, UV-B (onda media), de 280 a 315 nm, y UV-C (onda corta), de 180 a 280

nm), luz visible ($\lambda=400-700$ nm) y los rayos infrarrojos (IR, $\lambda =700-1100$ nm). La luz puede ser emitida por diferentes fuentes y por diferentes mecanismos, debido a la transición espontánea de algunos átomos de un estado excitado a un estado de menor energía (Palmieri y Cacace, 2005).

Cuando la energía de la luz irradiada \mathbf{E}_0 golpea la superficie de un cuerpo material, una parte de su energía (\mathbf{rE}_0 , donde \mathbf{r} es el coeficiente de reflexión del material) se refleja en la superficie, una parte de ella es absorbida por las capas de material a través de la cual penetra y la otra parte se transmite a las capas internas. La energía $\mathbf{E}(x)$ de la luz transmitida a una distancia x por debajo de la superficie a un cuerpo material disminuye con x de acuerdo con la ley de Lambert-Beer (Dunn y col., 1989) (Ecuación 1).

$$\mathbf{E}(x) = (\mathbf{1} - \mathbf{r}) \mathbf{E}_0 e^{-\alpha x} \quad (1)$$

Donde α es el coeficiente de extinción, que mide la transparencia o la opacidad del material dado. La mayoría de los sólidos son opacos ($\alpha \rightarrow \infty$) y no transmiten radiación, mientras que una gran cantidad de líquidos y todos los gases son transparentes ($\alpha \rightarrow 0$), y no absorben toda la energía. Por lo general, en la mayoría de los materiales (incluidos los alimentos), la intensidad de la luz disminuye rápidamente (Palmieri y Cacace, 2005).

La energía absorbida \mathbf{E}_d (Ecuación 2) por una capa de profundidad d por debajo de la distancia x es:

$$\mathbf{E}_d = \mathbf{E}(x) (\mathbf{1} - \mathbf{r}) \mathbf{E}_0 e^{-\alpha d} \quad (2)$$

La energía de luz absorbida en general se disipa como calor, generando un aumento de la temperatura (ΔT) igual a:

$$\Delta T = \frac{E_d}{\rho c_p A d} \quad (3)$$

Donde ρ y c_p son la densidad y el calor específico del material respectivamente y A es el área de la superficie. T es un gradiente de temperatura entre el exterior y las capas internas del material que da lugar a una transferencia de calor por conducción dentro del material. La tasa de transferencia de calor y el aumento de la temperatura depende de la intensidad y la duración de la radiación incidente y de las propiedades térmicas del material (Palmieri y Cacace, 2005).

El efecto de la radiación sobre un cuerpo puede ser mejor evaluado mediante la densidad de energía o F fluencia, definida como la energía recibida de la lámpara por la muestra por unidad de superficie durante el tratamiento, que se mide en joule/metro² o centímetro² (J/m^2 o J/cm^2) (Gómez-López y col., 2007).

La luz puede ser irradiada de forma continua o en forma pulsada. Grandes cantidades de irradiación de luz deben ser aplicadas con el fin de comprender mejor la transferencia de energía a un material por medio de una serie de pulsos de luz. Si un proceso consiste en un número n de pulsos y cada uno de ellos tiene una duración t y densidad de energía o fluencia F , la duración total es de $T_{tot} = n * t$, definido como la

duración del tiempo del tratamiento, la frecuencia es $f = 1 / T$, la fluencia o energía total $F_{tot} = n * F$ (Palmieri y Cacace, 2005).

Finalmente, la densidad de potencia de pulso o tasa de flujo de energía $F_r = F/t$, que puede definirse como la energía recibida de la lámpara por la muestra en unidad área por segundo y es medida en Watt/metros² (W/m²) (Gómez-López y col., 2007).

La característica más importante que posee la liberación de energía por pulsos de luz es que, aparte del número y la duración, la energía proporcionada por este tratamiento es mayor que la proporcionada por una radiación continua, en cuanto a la energía total equivalente. Mientras más corta es la duración, más alta es su energía. Por esta razón, si se compara con las radiaciones continuas, los pulsos de luz muestran una capacidad de penetración mucho mayor a través de los materiales (Dunn y col., 1989). Además, los PL proporcionan enfriamiento en el periodo entre cada destello y por lo tanto reduce la acumulación de temperatura de la irradiación continua de la luz UV (Mc Donald y col., 2000).

Las características antes nombradas, han hecho que este método se haya convertido en una técnica novedosa usada en tecnología de alimentos por su rápida inactivación microbiana (Oms-Oliu y Martin-Belloso, 2008). Los términos, pulsos de luz de alta intensidad y amplio espectro (Roberts y hope 2003) y pulsos de luz blanca (Marquenie y col., 2003) son sinónimos de pulsos de luz (Rowan y col., 1999).

2. Inactivación microbiana

Se ha demostrado que la alta potencia, provista por el tratamiento con pulsos de luz, es capaz de inactivar microorganismos en diversos grados. Diferentes causas y mecanismos se han propuesto para explicar la inactivación de microorganismos por pulsos de luz (Barbosa-Cánovas y col., 2000).

Muchos científicos han realizado diversos experimentos comprobando la eficacia del tratamiento con pulsos de luz para destruir microorganismos. Sin embargo, se observa diferencias en cuanto a los materiales usados y condiciones experimentales en las que se han obtenido resultados variables, que hacen que las comparaciones entre ellos sea difícil (Elmnasser y col., 2007).

Se ha demostrado que la reducción de la población puede ser de más de 8 ciclos logarítmicos en células vegetativas, de 6 ciclos logarítmicos en esporas presentes en superficies, fluidos y bebidas y de 1 a 3 ciclos logarítmicos pueden ser alcanzados en superficies complejas o rugosas como las de la carne (Marriott, 1999).

2.1 Ejemplos de inactivación microbiana por pulsos de luz

En algunos trabajos realizados, se ha observado que las bacterias Gram-negativas son menos susceptibles a la inactivación por pulsos de luz que las bacterias Gram-positivas, mientras que las esporas de los hongos son las más susceptibles a este tratamiento. (Anderson y col., 2000). Sin embargo, algunos investigadores reportan que no han

encontrado ningún patrón de sensibilidad entre los diferentes grupos de microorganismos después de estudiar un gran número de ellos, incluyendo bacterias, levaduras y mohos (Gómez-López y col., 2005a).

2.1.1. Inactivación de bacterias

Entre los microorganismos estudiados en la inactivación microbiana por pulsos de luz se encuentra *Staphylococcus aureus*; Para este microorganismo se logró reducir la población de 7 a 8 log (UFC mL⁻¹) de células sembradas en solución tampón y placas de agar, con un tratamiento de 5,6 J/cm² por pulso durante 5 segundos, sin un aumento sustancial de la temperatura (Krishnamurthy y col., 2004).

Por otra parte, estudios realizados con *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis* mostraron una reducción de 9 ciclos log después de un tratamiento con 100 pulsos de luz de 9 J. Para *E. coli* se obtuvo una reducción de 7 ciclos log aplicando 100 pulsos de 4,5 J, registrándose también una reducción aproximada de 0,5 ciclos log después de aplicar 5 pulsos de 4,5 y 9 J (Ghasemi y col., 2003).

Otros trabajos en los que se ha aplicado 200 pulsos durante 100 nanosegundos, en placas inoculadas con *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* y *S. aureus*, se obtuvo una reducción de 6 ciclos log aproximadamente (Rowan y col., 1999). Si se aplican 64 pulsos de luz durante 1 µs a una intensidad de 3 J se logra también una inactivación de 2 ciclos log de poblaciones *L. monocytogenes* y 4 ciclos log para *E. coli* O157:H7 (Mac Gregor y col., 1998).

Con pulsos de luz también se ha logrado la inactivación de esporas de microorganismos como *Bacillus subtilis*, en donde se ha alcanzado una reducción de 7 a 8 ciclos log con una intensidad de tratamiento de $15,8 \text{ J/cm}^2$ durante un segundo (Sonenshein, 2003).

2.1.2. Inactivación de hongos

En hongos como *Aspergillus niger* y *Fusarium culmorum*, se obtiene una reducción de 4,5 ciclos log luego del tratamiento con 1000 pulsos de luz en un rango de longitud de onda de 200-300 nm (Anderson y col., 2000).

En esporas de *A. niger* también se ha logrado una reducción logarítmica de 2,95 luego del tratamiento. Cuando se aplican 5 pulsos en *A. niger* a una intensidad de 1 J/cm^2 , se logra una inactivación de 4,8 ciclos log (Wekhof y col., 2001). Incluso con un pulso adicional (6 pulsos) se logra disminuir el número de sobrevivientes hasta 6-8 ciclos log de este mismo microorganismo (Bushnell y col., 1998; Wekhof y col., 2001).

En algunos casos se ha reportado que el color de las esporas puede desempeñar un papel importante en la susceptibilidad, ya que las esporas de *A. niger* son más resistentes que las esporas de *F. culmorum*, lo que podría deberse a que el pigmento de las esporas de *A. niger* absorbe más de la longitud de onda UV-C que esporas de *F. culmorum*, dando una protección contra los rayos UV (Anderson y col., 2000).

2.1.3. Inactivación de levaduras

En los resultados reportados para la inactivación de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, se han aplicado diversos tratamientos que varían el grado de inactivación. En placas de agar inoculadas con *S. cerevisiae* se ha logrado una reducción de 5 ciclos log con 200 pulsos (Rowan y col., 1999). Mientras que al aplicar 5 pulsos de luz con una intensidad de $0,7 \text{ J/cm}^2$ se reduce 6 ciclos log. En levaduras como *Candida lambica* y *Rhodotorula mucilaginosa* se ha reportado una reducción de 3 ciclos log luego de ser tratadas con pulsos de luz (Gómez-López y col., 2005b)

2.1.4. Inactivación en virus

En virus como el de la poliomielitis y el adenovirus, los pulsos de luz han sido altamente efectivos. Aunque ambos virus mostraron susceptibilidad al tratamiento, el adenovirus es más resistente a los PL que el poliovirus. Se registraron reducciones de 4 Log (UFC/mL) de poliovirus con un tratamiento de 10 pulsos a una intensidad de 12 mJ/cm^2 , mientras que el mismo tratamiento ocasionó una reducción en adenovirus de apenas 1 ciclo logarítmico (Lamont y col., 2007).

3. Mecanismos de acción de los pulsos de luz

Los efectos de letalidad por pulsos luz, pueden ser atribuidos a su rico contenido de espectro UV-C, a su corta duración, al pico de alta potencia y la capacidad que tiene de poder regular tanto la duración del pulso como la frecuencia de los destellos emitidos por la

lámpara, que desempeñan un papel importante en la destrucción microbiana (Takeshita y col., 2003). De hecho, la región UV es esencial para la eficacia del tratamiento. Se ha confirmado que el efecto letal no se logra si se incluye en la lámpara un filtro para eliminar el rango UV de longitud inferior a 320 nm (Takeshita y col., 2002).

Varios mecanismos han sido propuestos para explicar el efecto letal por pulsos de luz, todos ellos relacionados con la zona ultravioleta del espectro y su efecto fotoquímico y fototérmico (Anderson y col., 2000; Wekhof y col., 2001; Takeshita y col., 2003; Wuytack y col., 2003).

3.1 Efecto Fotoquímico

El efecto fotoquímico se puede atribuir a la acción la luz UV sobre el ADN de las células microbianas (Farkas, 1997). El ADN es esencial para la reproducción de todos los microorganismos, éste absorbe la luz UV, principalmente a través de los dobles enlaces conjugados entre carbonos (Jay, 1996). Varios mecanismos subyacen a esta inactivación incluyendo las modificaciones químicas y la fragmentación del ADN. El efecto germicida de la luz UV se ha atribuido principalmente a la transformación fotoquímica de bases de pirimidina en el ADN de bacterias, virus y otros patógenos para formar dímeros (Mitchell y col., 1992; Giese y Darby, 2000). El dímero inhibe la formación de cadenas de ADN en el proceso de replicación celular, dando lugar a la inactivación (incapacidad para replicarse, llamada muerte clonogénica) de los microorganismos afectados por la radiación UV (Bolton y Linden, 2003) (Figura 1).

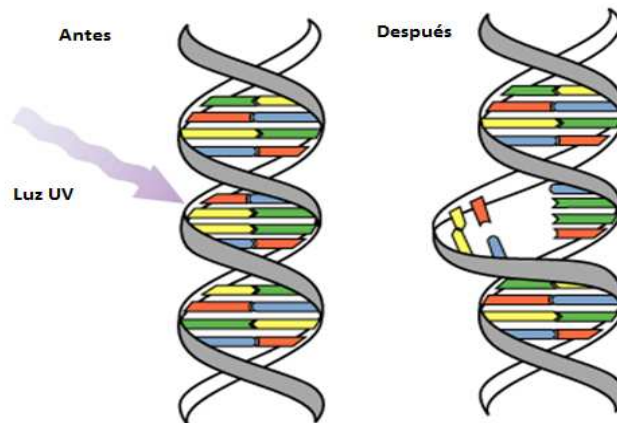


Figura 1. Efecto Fotoquímico sobre el ADN por acción de la luz ultravioleta (Tomado de www.wikimedia.org/wikipedia/DNA_UV_mutation.gi/219px-DNA_UV_mutation.gif)

3.2 Efecto Fototérmico

La acción letal de los pulsos de luz, también puede ser debida a un efecto fototérmico. Posiblemente, con una energía superior a $0,5 \text{ J/cm}^2$ se logra la desinfección, por la explosión de las bacterias durante un sobrecalentamiento temporal debido a la absorción de los rayos UV de la lámpara de pulsos. Este recalentamiento puede atribuirse a una diferencia en la absorción de la luz UV por las bacterias y del medio circundante. El contenido de agua de las bacterias se vaporiza, generando un flujo de vapor que induce a la interrupción de la membrana (Takeshita y col., 2003). Por otra parte, se ha demostrado que al tratar esporas microbianas, ocurre una perforación o ruptura en la que se escapa el contenido por efecto del recalentamiento, quedando vacía después de una explosión interna dando lugar a una evacuación del contenido (Wekhof y col., 2001) (Figura 2).



Figura 2. Micrografía de esporas de *Aspergillus niger* tratadas con Pulsos de Luz (Wekhof, 2001)

En el caso de la radiación con tratamientos ricos en UV la acción bactericida se puede atribuir al efecto fotoquímico combinado con el efecto fototérmico. Si este fuera el caso, la inactivación microbiana sería principalmente por el efecto fototérmico en ausencia de longitudes de onda UV, ya que los pulsos de luz serían simplemente un método rápido para transferir grandes cantidades de energía térmica a la superficie del producto (Mertens y Knorr, 1992).

3.3 Efecto Fotofísico

Es probable que el impacto de pulsos de luz sobre las proteínas, membranas y otros materiales celulares esté relacionado con la inactivación microbiana. Al comparar la inactivación de un microorganismo por pulsos de luz y la clásica radiación UV continua, se encuentra que la concentración de proteína eluída en las células tratadas por pulsos de luz fue mayor que la observada por tratamiento clásico de UV, esto podría indicar el daño

potencial de la membrana celular inducido por el tratamiento con pulsos de luz (Takeshita y col., 2003).

En algunos trabajos en donde se utilizó microscopía electrónica de transmisión, se observó que las células de levadura exhibieron diferentes cambios estructurales luego del tratamiento. Estos cambios incluyen expansión de las vacuolas, distorsión de la membrana celular y cambios en la forma circular, lo que indica que el daño de la membrana celular puede ser inducido por el tratamiento con luz pulsada, como se puede observar en la figura 3. Por otra parte, después del tratamiento clásico de luz UV continua, la estructura celular de la levadura fue casi la misma que la de las células no tratadas (Takeshita y col., 2003).

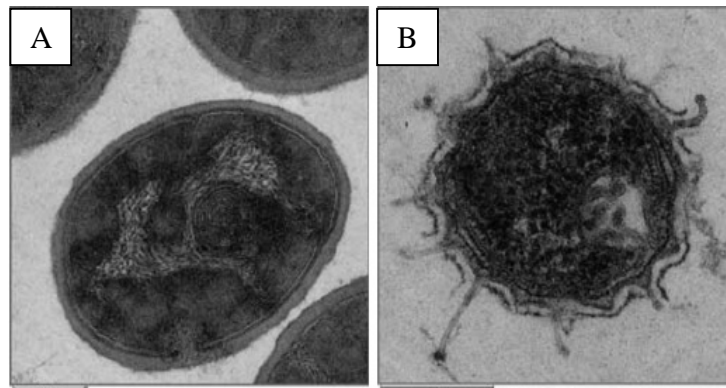


Figura 3. Microscopía electrónica de transmisión de células de *Staphylococcus aureus* tratadas con pulsos de luz. A) Células control no tratadas. B) Células tratadas con pulsos de luz (Krishnamurthy y col., 2008)

Las micrografías electrónicas de esporas tratadas con PL revelaron que se rompió la parte superior de la espora. El colapso y deformación de la espora muestra la formación de cráteres profundos, posterior al tratamiento. Por otra parte, el análisis microscópico después de tratamiento con pulsos de luz de alta energía UV, reveló que la mayoría de las esporas se había desintegrado o deformado (Wekhof y col., 2001).

4. Fotorreactivación y reparación en la oscuridad

La fotorreactivación es la reparación de los daños ultravioleta en bacterias por la iluminación con luz visible (Cleaver, 2003). Es un fenómeno bien conocido en el campo del tratamiento con luz ultravioleta de onda corta (UV-CW). Es catalizado por la enzima fotoliasa, que reconoce los dímeros de pirimidina producidos con la radiación UV y, tras acoplarse a ellos utiliza la energía de la luz visible (entre 310 nm y 400 nm) para romper los enlaces del anillo de ciclobutano que unían a las dos pirimidinas con lo que el ADN dañado recupera su conformación normal (Jiménez-Sánchez y Guerrero, 1982) (Figura 4). La fotoliasa es una flavoproteína que contiene dos cromóforos ligados no covalentemente. Un cromóforo es el FAHD⁻, el cofactor catalizador que lleva a cabo la función de reparación a la excitación ya sea por la absorción directa de fotones o por la transferencia de energía de resonancia del segundo cromóforo (metiltetrahidrofolato (MTHF) o 8-hidroxi-5-deazaflavin (8-HDF)) que absorbe luz del sol y aumenta la eficiencia de reparación. El cofactor de flavina excitado transfiere un electrón al dímero de pirimidina para generar un par de radicales cargados. El anillo aniónico del dímero es dividido, y los electrones en exceso retornan al radical de flavina para restaurar la forma de FAHD⁻ catalíticamente competente y cerrar el fotociclo catalítico (Kao y col., 2005).



Figura 4. Fotorreactivación del ADN por la enzima fotoliasa (Tomado de www.synergyworldwide.com)

Existen otros dos mecanismos que podría reactivar las células tratadas con PL. Uno de ellos es el mecanismo de reparación en oscuridad, que no requiere de la luz, como en la fotorreactivación. El otro se refiere específicamente a las esporas, las cuales pueden repararse a sí mismas por un sistema común de reparación por escisión (Setlow, 1992) (Figura 5).



Figura 5. Reparación del ADN por el mecanismo de escisión (Tomado de www.synergyworldwide.com)

5. Efectos de los pulsos de luz en alimentos

5.1 Alimentos líquidos

Muchos líquidos como el agua, tiene un alto grado de transparencia a amplios rangos de longitudes de onda incluyendo la luz visible y UV, mientras que otros, tales como soluciones de azúcar y los vinos, presentan una transparencia limitada. El aumento de sólidos disminuirá la intensidad de penetración de la luz UV (Shama y col., 1999; Bintsis y col., 2000). En soluciones acuosas, mientras menor es la transparencia, la eficacia del tratamiento con PL es menor (Tonon y Agoulon, 2003). Los líquidos con alta absorción de luz UV, deben ser tratados en una capa delgada con el fin de reducir la absorción de la radiación (Wright y col., 2000). De esta manera, la absorción de luz UV por el líquido disminuye y las bacterias son más propensas a ser sometidos a dosis letales (Shama, 1992). La absorbancia de jugos naturales clarificados y jugos que contienen pulpa varía considerablemente. Un jugo de manzana clarificado tiene una absorción baja, con coeficientes de absorción de unos 11 cm^{-1} , mientras que la absorción de zumo de naranja puede alcanzar valores cercanos a 50 cm^{-1} (Koutchma y col., 2004). Además, se observó una correlación positiva entre el contenido de vitamina C y el coeficiente de absorción de los jugos de manzana (Koutchma, 2008).

En otros estudios, con leche está fue eficientemente pasteurizada en frío por la exposición a PL con una dosis de $12,6 \text{ J/cm}^2$ en 56 s (Smith y col., 2002). Se alcanzó una completa inactivación de *S. aureus* por tratamientos con PL (Krishnamurthy y col., 2007). Estos autores concluyeron que un diseño correcto de un sistema de PL para el flujo continuo de pasteurización de leche requiere reducir los tiempos de tratamiento para evitar

un aumento excesivo de temperatura, que puede causar algunos cambios en la calidad. La calidad y los cambios sensoriales durante los tratamientos con PL no han sido estudiados todavía. En comparación a la luz UV continua, PL puede limitar las reacciones de oxidación debido a la corta duración de pulso, por lo general 300 ns a 1 ms (Fine y Gervais, 2004). Los tratamientos de PL no parecen afectar a las proteínas o componentes lipídicos de la leche. Elmnasser y col., (2008) no observaron cambios en la composición de aminoácidos de las proteínas y la oxidación de los lípidos después del tratamiento de la leche.

5.2 Alimentos sólidos de origen vegetal

En vegetales mínimamente procesados, como la espinaca, el apio, pimentón verde, brotes de soya, zanahoria, lechuga, repollo blanco se lograron obtener reducciones logarítmicas entre 0,21 y 1,67 ciclos log después de un tratamiento con PL a una intensidad de 7J en un tiempo de 0,56 y entre 0,21 y 1,67 a 45 segundos/lado, y entre 0,56 y 2,04 a 180 segundos/lado (Gómez-López y col., 2005b). Los resultados de este estudio también indican que el tratamiento con PL indujo un aumento del 80% en la tasa de respiración de la lechuga, mientras que la frecuencia respiratoria de la col no se vio afectada. Las reducciones en el recuento de aerobios fue de 1,6 log (UFC mL⁻¹) para las zanahorias y más de 2,6 log (UFC mL⁻¹) para pimentón utilizando sólo 2 pulsos de 0,15 J/cm². (Hoornstra y col., 2002). Según estos autores, la reducción de casi 2 ciclos log extendió la vida útil de las verduras cortadas a 7 ° C aproximadamente, en cuatro días adicionales.

PL también han sido estudiados para evaluar la desinfección de superficies de frutas frescas (Lagunas-Solar y col., 2006; Bialka y Demirci 2007, 2008). Microorganismos estudiados por Lagunas-Solar y col., (2006), *Alternaria suplentes*, *A. niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium roseum*, *Monilinia fructicola*, *Penicillium expansum*, *Penicillium digitatum* y *Rhizopus stolonifer*, fueron parcial o completamente inactivados después de la exposición de la superficie de la fruta a tratamientos con PL. Con la excepción de *A. niger*, la mayoría de los hongos fueron controlados con menos de 0,5 J/cm².

5.3 Otros alimentos

Como reportó Dunn y col., (1995), los tratamientos de PL logran alta inactivación microbiana en superficies relativamente simples, mientras que por otra parte, se obtienen sólo de 1-3 reducciones logarítmicas en superficies complejas, como las de la carne. Parte de la radiación puede haber sido absorbida por las proteínas y los lípidos, lo que disminuye la dosis efectiva en los microorganismos (Gómez-López y col., 2005b). Las proteínas tienen una fuerte absorción de la luz UV alrededor de 280 nm, así como en longitudes de onda más alta de la región UV-B, mientras que los lípidos con dobles enlaces conjugados aislados también absorben UV (Hollósy, 2002). Dunn y col., (1997) demostraron que los filetes de carne de vacuno tratados a cada lado con PL de 5 J/cm² y almacenados en 3 días a 4-5°C mostraron reducción de 2 ciclos log en el recuento microbiano. Estos mismos autores también evaluaron camarones y obtuvieron que los tratados con PL y almacenado en refrigeración durante 7 días, seguían siendo comestibles, mientras que los camarones no tratados mostraron degradación microbiana extensa.

La tecnología de PL es aplicable para esterilizar o reducir la población microbiana de material de embalaje o material de las superficies en contacto con alimentos en plantas de procesamiento (Dunn, 1996).

6. Microorganismos de importancia

Los microorganismos son ubicuos en nuestro ambiente, pudiéndose encontrar en el agua, aire y especialmente en los alimentos. Los alimentos frescos, la mayoría de los preparados e incluso algunas veces los preservados, se contaminan, ya que proporcionan un medio apto para que los microorganismos colonicen y crezcan, ocasionando un deterioro en el alimento que produce una reducción en la alta calidad y disponibilidad de los mismos. Además, el fallo en la adecuada descontaminación y conservación puede permitir el crecimiento de microorganismos patógenos, resultado en enfermedades con alta morbilidad y mortalidad (Mandigan y col., 2006). En el presente trabajo se estudió la inactivación por pulsos de luz de microorganismos deteriorativos y patógenos, como: *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Saccharomyces cerevisiae* que ponen en riesgo la calidad e inocuidad de los alimentos y la salud pública.

5.1 *Pseudomona fluorescens*

Pseudomona fluorescens, es un organismo importante de deterioro de los alimentos. Es un bacilo Gram-negativo, flagelado, incapaz de formar esporas y crece aeróbicamente. La temperatura óptima para su funcionamiento es de 25 a 30 °C. Posee fluoresceína que es

un pigmento fluorescente que la hace reaccionar frente a la luz ultravioleta. Este microorganismo tiene la habilidad de formar de biopelículas (Sillankorva y col., 2008). Las biopelículas son comunidades de bacterias adheridas a una superficie y embebidas en una matriz biopolimérica (Parsek y Singh, 2003)

6.2 *Salmonella* spp.

Salmonella es un género bacteriano perteneciente a la Familia *Enterobacteriaceae*. Son Gram-negativos y aerobios-anaerobios facultativos, poseen forma bacilar, no esporulados, móviles por flagelación peritrica. Este microorganismo causa una enfermedad común llamada Salmonelosis. Se puede afirmar que todos los productos crudos de origen animal y el ambiente en que se preparan, pueden estar contaminados con *Salmonella*. De aquí que los alimentos que con más frecuencia dan lugar a casos de salmonelosis son: carnes y productos cárnicos, algunos productos de charcutería, carnes de aves y subproductos, huevos y ovoproductos, leche y productos derivados de la leche. Puestos que, a veces, un bajo número de *Salmonella* puede causar enfermedad, lo más importante es asegurar su ausencia en los alimentos listos para el consumo (Anderson, P., 2005).

6.3 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes, por su interés para la salud pública y su impacto económico, es uno de los microorganismos de origen alimentario más importantes en los últimos 20 años. Es un microorganismo Gram-positivo, de forma bacilar, aerobio y no

presenta cápsula ni espora. Es móvil a 25 °C pero inmóvil a 37 °C por inactivación del flagelo, es psicrotrófico y su temperatura óptima es entre 30 °C - 37 °C. Se transmite por alimentos, sobre todo leche, derivados lácteos, carnes mal preparadas y por el consumo de verduras sin lavar bien (Anderson y Calderón, 2000).

Este microorganismo produce una enfermedad llamada Listeriosis, que es una infección intestinal que puede producir septicemia, abortos y meningitis (Mandigan, Martinko y Parker, 2006). La listeriosis transmitida por alimentos es relativamente poco común, pero grave, con tasas de letalidad altas, comparadas con las de otros microorganismos patógenos transmitidos por alimentos. Esta afecta principalmente a segmentos específicos de la población cuya vulnerabilidad es mayor (Anderson y Calderón, 2000).

6.4 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus, es una especie microbiana integrada por bacilos voluminosos, Gram⁺, esporulado, aerobio o anaerobio facultativo y móvil mediante flagelos peritricos. La espora es ovoidea, central y no deformante. Su Temperatura óptima es de 30°C a 37°C, la de crecimiento es 5°C a 55°C y su temperatura de germinación 5°C a 8°C. Puesto que es esporulado, su amplia distribución en el ambiente da lugar a su acceso a varios alimentos crudos: leche y productos lácteos, superficies de carnes crudas, incluida la de pollo, cereales y derivados, especias, etc. Este microorganismo produce dos tipos de toxinas

causando dos enfermedades diferentes: una diarreica y otra emética (Anderson y Calderón, 2000).

6.5 *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo ascomiceto, que ha sido ampliamente estudiado dada su importancia en la industria panadera y vitivinícola, así como por su capacidad de producir etanol (Folch-Mallol y col., 2004).

III. OBJETIVOS

1. Objetivo general:

- Determinar el efecto de algunas variables críticas en la susceptibilidad de microorganismos a los pulsos de luz.

1.1 Objetivos específicos:

- 1 Determinar el efecto de la densidad de población microbiana sobre la efectividad microbicida de los pulsos de luz.
- 2 Determinar el efecto de la fase de crecimiento microbiano sobre la sensibilidad de algunos microorganismos a pulsos de luz.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Equipo de trabajo y materiales

1.1 Lugar y equipo de Trabajo

El Sistema de Pulsos de Luz Ultravioleta (UV-C) se encuentra ubicado en el Laboratorio de Nuevas Tecnologías y Desarrollo de Productos del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) de la Universidad Central de Venezuela, ubicado en Colinas de Bello Monte, Caracas-Venezuela. Además, es en este mismo lugar donde se suministran los materiales, equipos, reactivos y medios de cultivo que se usaron para este trabajo. El equipo de pulsos de luz que se usó en este proyecto es modelo XeMaticA 1XL-SA (SteriBeam, Kehl, Alemania) (Figura 6). El tratamiento que se aplicó para los experimentos fue de un único pulso de luz a una intensidad de $0,35 \text{ J/cm}^2$.



Figura 6: Equipo de Pulsos de Luz modelo XeMaticA 1XL-SA (SteriBeam, Kehl, Alemania). Situado en el Laboratorio de Nuevas Tecnologías y Desarrollo de Productos del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) de la Universidad Central de Venezuela

1.2 Preparación del material

1.2.1 Preparación de caldo nutritivo y caldo potato dextrosa

Para preparar caldo nutritivo (Hi Media, Mumbai, India), se disolvió 8 gr de caldo nutritivo por cada 1000 mL en agua destilada, se calentó y se agitó para evitar la formación de grumos en el fondo del Erlenmeyer. Se esterilizó, ya sea en una fiola o en tubos de ensayo en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

En el caso del caldo potato dextrosa (Hi Media, Mumbai, India), se disolvió 24 gr en 1000 mL.

1.2.2 Preparación de agar nutritivo y agar potato dextrosa

Se disolvió 23 gr de agar nutritivo (Hi Media, Mumbai, India), por cada 1000 mL de agua destilada. Se llevó a ebullición durante 1-2 minutos para disolver totalmente y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Luego de esterilizar, se sirvieron en las placas de petri entre 13-15 mL del medio atemperado junto al mechero para evitar contaminación. Finalmente, se dejó enfriar para que solidificara.

En el caso de agar potato dextrosa (Hi Media, Mumbai, India), se disolvió 39 gr en 1000 mL.

1.2.3 Preparación de agua peptonada

Se preparó agua peptonada al 0,1%, para esto se pesó 1 gramo de peptona (Hi Media, Mumbai, India), en 1 L de agua destilada y se colocó en tubos con tapa y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

1.3 Microorganismos bajo estudio

Para la realización del siguiente trabajo se utilizaron los siguientes microorganismos:

- *Pseudomonas fluorescens*, CVCM 627. ATCC 13525 (Catálogo de 1996), DSM 50090, NCTC 10038. Origen: Tanques de prefiltro, Inglaterra. Cepa Tipo
- *Salmonella* spp. Fue donada por la Escuela de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, por la Profesora María Stella Medina.
- *Listeria monocytogenes*, CVCM 446. Proviene del Laboratorio de Microbiología (ICTA), UCV, vía Rojas B. Identificación en ATB Plus: Buena identificación (99%)
- *Bacillus cereus*, CVCM 461, Aislada en el CVCM. Identificación en ATB Plus: Muy buena identificación (coincidencia 99,5 %).
- *Saccharomyces cerevisiae*, CVCM 1629. ATCC 26422, DPL-14, UFA 0026. Derivada de ATCC. Servicio de liofilización y cepa en depósito para cepario de la UFA II Polar. Donación de UFA al CVCM.

1.4 Activación y aislamiento de las cepas

Las cepas almacenadas bajo refrigeración, se activaron mediante 3 repiques sucesivos en caldo nutritivo excepto para *Saccharomyces cerevisiae* que se cultiva en caldo potato dextrosa (Hi Media, Mumbai, India). Luego se incubaron durante aproximadamente 12 horas dependiendo de su velocidad de crecimiento, para poder trabajar con las diferentes fases de crecimiento.

Las temperaturas de incubación para cada microorganismo fueron:

Pseudomonas fluorescens a 30 °C.

Salmonella spp. a 35-37 °C.

Listeria monocytogenes a 35-37 °C.

Bacillus cereus a 35-37 °C.

Saccharomyces cerevisiae a 30 °C.

2. Efecto de la densidad de población sobre la efectividad antimicrobiana de los pulsos de luz

Para este experimento se hizo crecer un cultivo de *Pseudomonas fluorescens* hasta fase estacionaria (aproximadamente 10^9 UFC/ml). A partir de este cultivo se realizaron diluciones seriadas hasta 10^2 UFC/mL. De los cultivos con 10^2 , 10^4 , 10^6 , 10^8 y 10^9 UFC/mL, se tomó 6 mL y se sembraron en una placa de petri estéril. Dos placas por cada dilución sirvieron como controles, y dos fueron tratadas a $0,35 \text{ J/cm}^2$. Luego, del mismo medio de cultivo se tomó 1 mL para realizar las diluciones seriadas requeridas para que al sembrar e incubar se pudieran

obtener resultados contables (Gómez-López y col, 2005a). El experimento se realizó tres veces y cada uno se realizó por duplicado, para seguir las reglas de contaje en la que se estimó las placas entre 25-250 colonias (FDA, 2001).

3. Efecto de la fase de crecimiento microbiano sobre la sensibilidad de algunos microorganismos a pulsos de luz.

Para la determinación de las curvas de crecimiento se inoculó 1 ml del microorganismo en 100 ml de su respectivo caldo y se cultivó a la temperatura correspondiente en agitación. A partir del momento en el que se inoculó el caldo se tomó una medida de la densidad óptica en un espectrofotómetro (Shimadzu, UV-2501PC, Japón) a $\lambda=600$ nm (DO_{600}). Para esto se extrajo una muestra de 3 mL del cultivo y se transfirió asépticamente a una cubeta de lectura del espectrofotómetro y se leyó la densidad óptica en el tiempo, con referencia a un blanco constituido por el medio de cultivo estéril. Durante la primera hora se tomaron muestras cada 15 minutos, luego cada media hora durante aproximadamente 4-5 horas hasta alcanzar la fase estacionaria en el medio de cultivo. Los tiempos de medición dependían de la duración de crecimiento de cada microorganismo.

Al mismo tiempo que se midió la DO_{600} , se inoculó 0,1 ml del cultivo sobre placas de agar nutritivo (potato dextrosa para *S. cerevisiae*) en superficie. Todas las placas se incubaron en superficie porque con la siembra en profundidad el efecto de los pulsos de luz se atenúa. Para esto se realizaron diluciones del cultivo antes de ser sembrado en placa según la fase de crecimiento en la que se encuentre, ya que un excesivo número de células microbianas podía interferir con la acción de los pulsos de luz e impediría el conteo de las placas control. Cuando

el cultivo se encontraba en fase de latencia se realizaron diluciones en agua peptonada al 0,1% hasta 10^{-3} . Durante la fase exponencial de crecimiento se realizó diluciones hasta 10^{-5} . Por último, cuando se alcanzó la fase estacionaria se diluyó hasta 10^{-6} . Para las diluciones se tomó 1 mL y se transfirió a 9 mL de agua peptonada y luego se tomó 0,1 mL para la siembra en superficie. Se inocularon 4 placas por cada punto de medición, dos sirvieron como control y dos fueron tratadas con un pulso a $0,35 \text{ J/cm}^2$. Finalmente, se realizó un conteo de UFC/mL y se graficó las curvas de crecimiento en el tiempo. El experimento se realizó tres veces y cada uno se realizó por duplicado. Se contaron las placas que se hallaron entre 25-250 colonias (FDA, 2001).

4. Análisis microbiológico

Se observó y se realizó un recuento en placa de microorganismos. Estos valores se graficaron para obtener las curvas de inactivación (Control Log (UFC/mL) – Tratamiento Log (UFC/mL)) en función de la densidad de población y en función de la fase de crecimiento.

5. Análisis estadístico

Los resultados son los promedios y desviaciones estándar obtenidas utilizando Microsoft Office Excel 2007. Se aplicó un análisis estadístico ANOVA de una vía para la comparación de medias de inactivación y prueba de contraste de Duncan a posteriori utilizando Statgraphics Centurión XVI, Versión 16.0.09 (USA), con un nivel de significancia de 0,05.

X. RESULTADOS Y DISCUSIONES

1. Efecto de la densidad de población sobre la efectividad antimicrobiana de los pulsos de luz

La eficacia de inactivación de los pulsos de luz disminuye a altos niveles de densidad de población, que se relaciona con un efecto de atenuación de la luz dado por la superposición de los microorganismos (Gómez-López y col, 2005a). Al evaluar el efecto de un pulso de luz a una fluencia de $0,35 \text{ J/cm}^2$ respecto a la densidad de población de un cultivo de *Pseudomonas fluorescens*, se encuentra que a mayor densidad de población disminuye la eficacia de PL para la inactivación microbiana. Cuando el cultivo se encuentra a una densidad de 10^9 y 10^8 UFC/mL, se observa claramente que luego del tratamiento la inactivación oscila entre 0,5 y 0,6 ciclos log. Mientras que, a una densidad de población de 10^6 y 10^4 UFC/mL la inactivación microbiana alcanza 1 ciclo log. A una densidad de población de 10^2 UFC/mL la inactivación microbiana fue letal por lo que luego de la aplicación del tratamiento no se obtuvieron resultados contables y en consecuencia esta concentración de la población no se tomó en cuenta a la hora de graficar los resultados (Anexo figura 18).

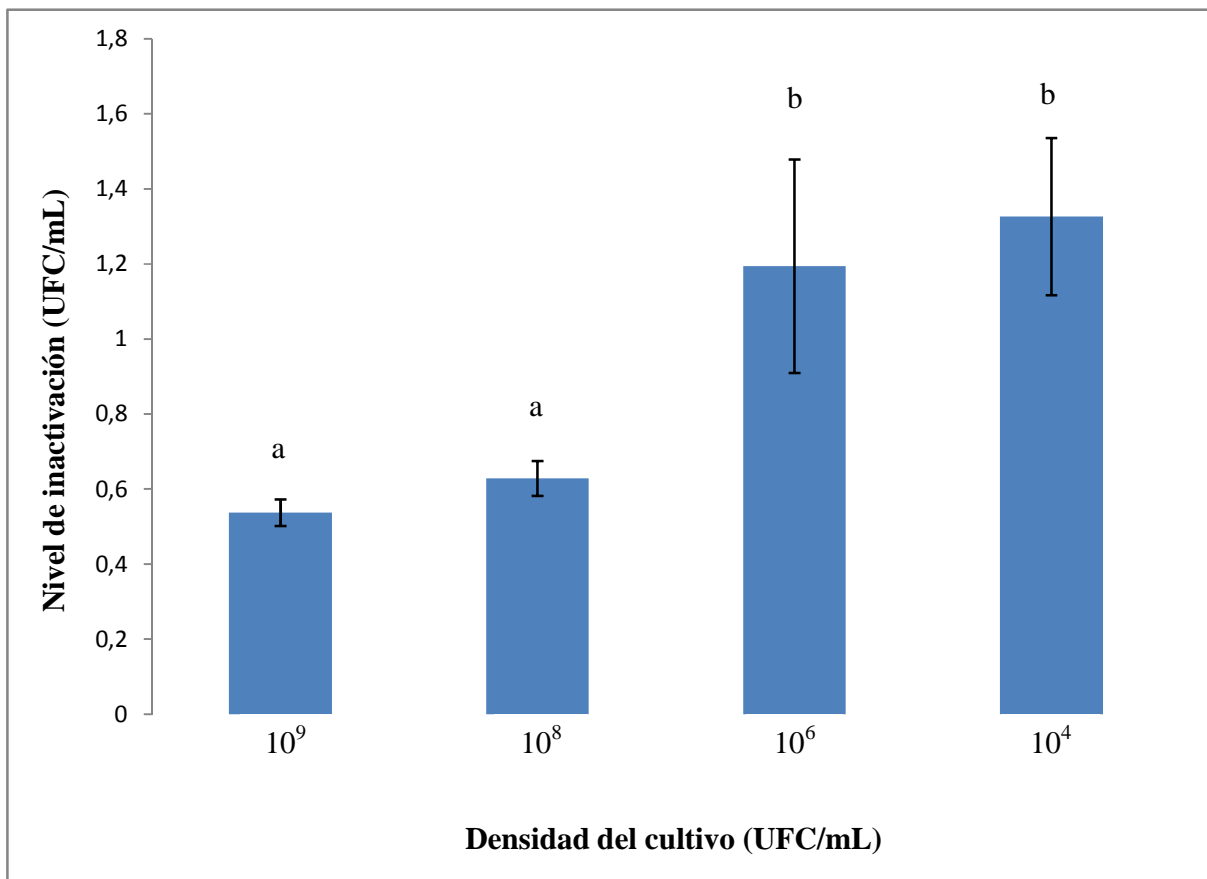


Figura 7. Niveles de inactivación microbiana por pulsos de luz en diferentes densidades de población para un cultivo de *Pseudomonas fluorescens*. Mediante el análisis de rangos múltiples de Duncan, letras diferentes indican diferencias significativas $P < 0,05$

La disminución en la eficiencia de la inactivación de una densidad específica de los microorganismos, puede explicarse por el efecto de sombreado ya que a menores densidades (10^4 y 10^6 UFC/mL) no hay superposición de los microorganismos por lo que la luz es recibida directamente por las bacterias, logrando una mayor inactivación. Mientras, que a mayores densidades, las bacterias que se encuentran en las capas superiores reciben la luz directa y se inactivan pero a su vez protegen a las bacterias de las capas inferiores de la luz incidente produciendo un efecto de sombra. En consecuencia, las cifras de supervivencia son más altas

cuando hay mayor concentración de células en un cultivo (Gómez-López y col, 2005a). Sillankorva y col. (2008) señalaron que *P. fluorescens* era un microorganismo formador de películas, la cual podría contribuir a la resistencia al tratamiento a mayor densidad de población.

Como se muestra en esta investigación este microorganismo, puede reaccionar de manera diferente a los PL en función del tamaño de la población. En la Figura 7, se muestran los cambios en el nivel de inactivación, en función de la densidad de población presente en la superficie del caldo nutritivo. El análisis de varianza, determinó que existe una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$) entre la media de inactivación por efecto del tamaño de la población, para un P de $0,0013 < 0,05$. Posteriormente, se aplicó una prueba de rangos múltiples lo que permitió observar la diferencia en el nivel de inactivación por efecto de la densidad de población. Resultando, que hay diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre las densidades de población (Figura 7).

Para llevar a cabo la presente investigación, se utilizó un medio líquido para el cultivo de *P. fluorescens*. El tratamiento por PL es más efectivo en superficies sólidas que en líquidos (Marquinie y col., 2003b; Krishnamurthy y col., 2004). La eficacia de los PL en la inactivación de las células en suspensión de medios puede incrementarse al minimizar la profundidad del líquido y/o aumentar el tiempo de tratamiento (Uesugi y col., 2007). Por esta razón, al estudiar la inactivación por efecto de la densidad de población, se realizó el tratamiento tomando solo una pequeña muestra del cultivo (6 mL de caldo), así la profundidad del líquido en la placa de petri no afecta la penetración del pulso.

Los estudios llevados a cabo por Uesugi y col. (2007) demostraron que los PL son capaces de ofrecer el mismo nivel de reducción microbiana en líquidos claros, sin importar el nivel de contaminación. Según estos autores, esto solo se aplica sobre líquidos claros y no sobre los productos donde la influencia de diferentes propiedades del sustrato en la inactivación es significativa. Gashemi y col., (2003), señalaron que en medios líquidos, se puede esperar el mismo efecto de sombreado en las poblaciones de células de alta densidad (10^{6-9} UFC/mL). De acuerdo con estas observaciones se puede destacar que en este caso el hecho de que el tratamiento se realizara en caldo nutritivo no influyó en la inactivación de población.

Otro factor importante que interviene en la inactivación microbiana es la fluencia y el número de pulso de luz (Anderson y col., 2000 y MacGregor y col., 1998). A mayor fluencia mayor será la letalidad de la bacteria. En este caso se aplicó un pulso de 0,35 J/cm². Se pudiera considerar que es una intensidad baja con respecto a otros experimentos en los que se usó 200 pulsos de luz a una intensidad de 7 J, logrando inactivar 6,8 ciclos log de *P. fluorescens* (Gómez-López y col, 2005a). Sin embargo, en este caso se logra la inactivación microbiana, obteniendo resultados contables que facilitan el análisis microbiológico. De haberse aplicado un pulso a una mayor intensidad se hubiera alcanzado la letalidad del microorganismo evitando obtener resultados contables. Stermer y col. (1987), lograron disminuir la densidad de población de *P. fluorescens* en carne de cordero utilizando pulsos con una intensidad de tan solo 0,004 J/cm².

2. Efecto de la fase de crecimiento microbiano sobre la sensibilidad de algunos microorganismos a pulsos de luz.

Para la realización de este experimento se evaluaron 3 fases de crecimiento, la fase de latencia, exponencial y estacionaria. Las células microbianas en la latencia y estacionaria, son más resistentes a tratamientos físicos de inactivación en comparación con la logarítmica (Damar y col., 2002). En fase de latencia, las células provenientes de otro medio de cultivo, entran en una fase de adaptación al medio fresco antes de comenzar a duplicarse, mientras que en la estacionaria es la etapa en la que los nutrientes se agotan y el crecimiento exponencial cesa. Hay actividad metabólica de síntesis y energía pero el número de bacterias se mantiene estable (De La Rosa y Prieto, 2003). Durante la fase logarítmica existe una mayor proporción de células en división, momento en el cual la membrana celular es más susceptible al estrés ambiental (Damar y col., 2002).

En las figuras 8, 9, 10, y 11 se observan las curvas de crecimiento de las diferentes bacterias utilizadas en este estudio: *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*, respectivamente, mediante la medición de la absorbancia a 600 nm. Cada cepa alcanzó su fase estacionaria en diversos tiempos.

Estas curvas de crecimiento corresponden a una curva de crecimiento típica. En la que se observan claramente las tres fases de estudio. El tiempo de crecimiento varía ya que cada uno tiene características propias que producen estas diferencias a la hora de hacerlas crecer. Esto posiblemente tenga que ver con la capacidad de aprovechar los recursos nutritivos,

capacidad de adaptarse a un medio fresco luego de ser repicadas anteriormente, la capacidad de sobrevivir a condiciones de estrés, entre otros.

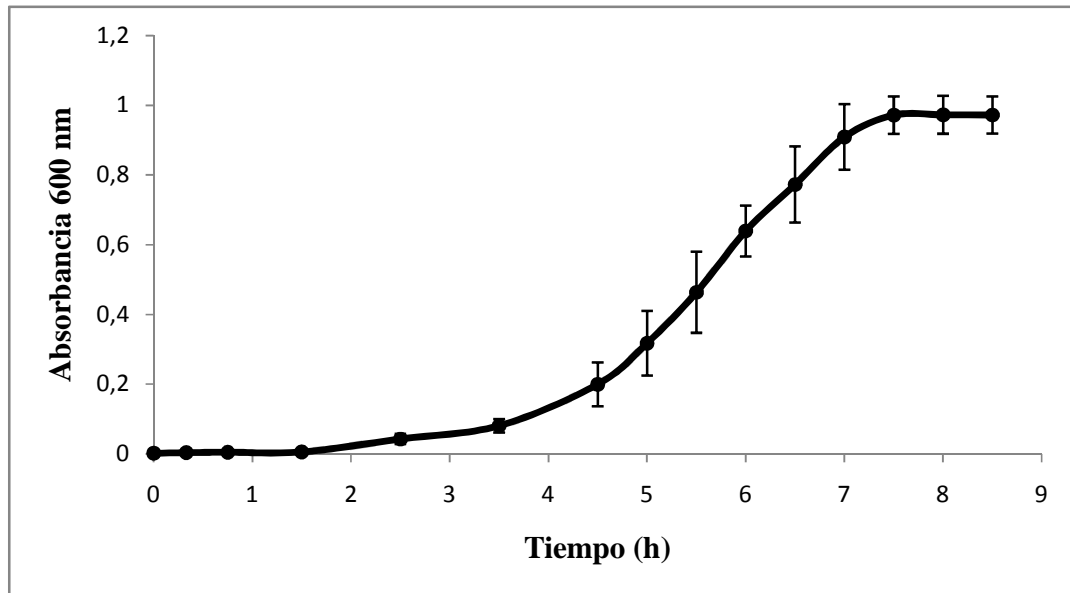


Figura 8. Curva de crecimiento de *P. fluorescens*, incubada a 30 °C por 8,5 h en función de la absorbancia (600 nm)

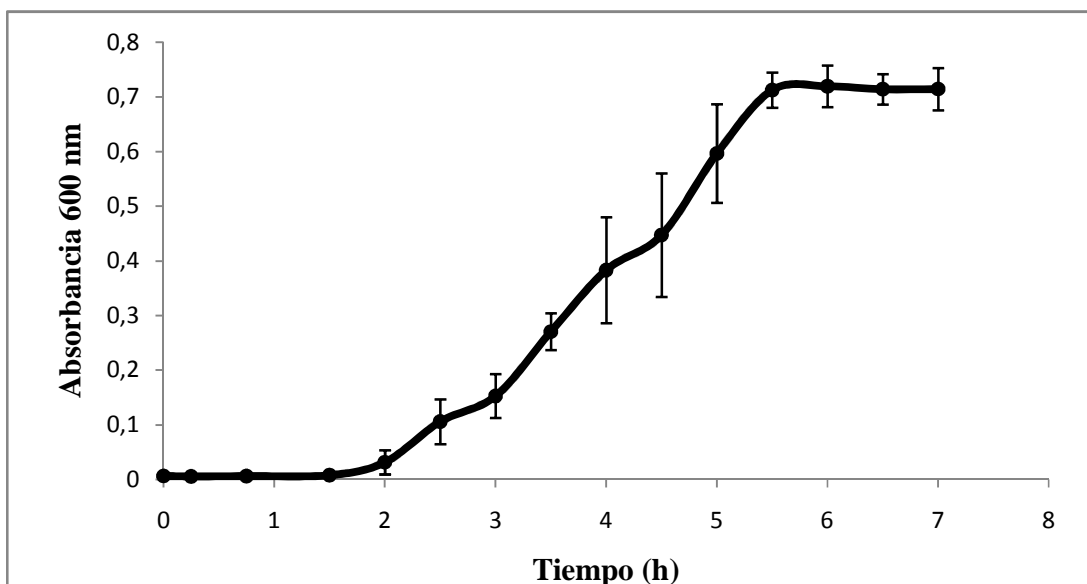


Figura 9. Curva de crecimiento de *Salmonella* spp., incubada a 35-37 °C por 7 h en función de la absorbancia (600 nm)

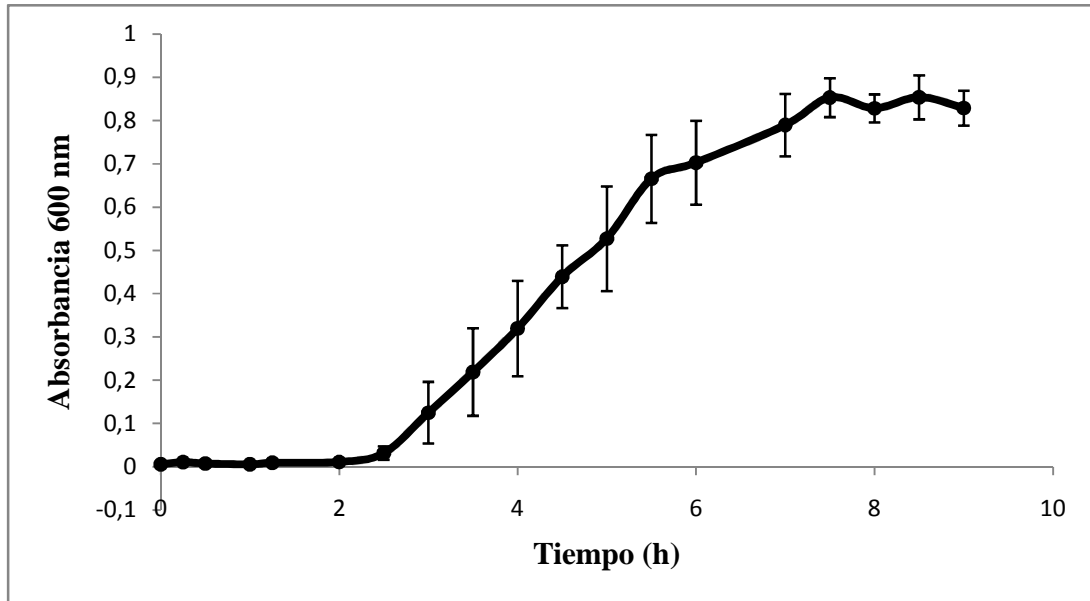


Figura 10. Curva de crecimiento de *Listeria monocytogenes*, incubada a 35-37 °C por 9 h en función de la absorbancia (600 nm)

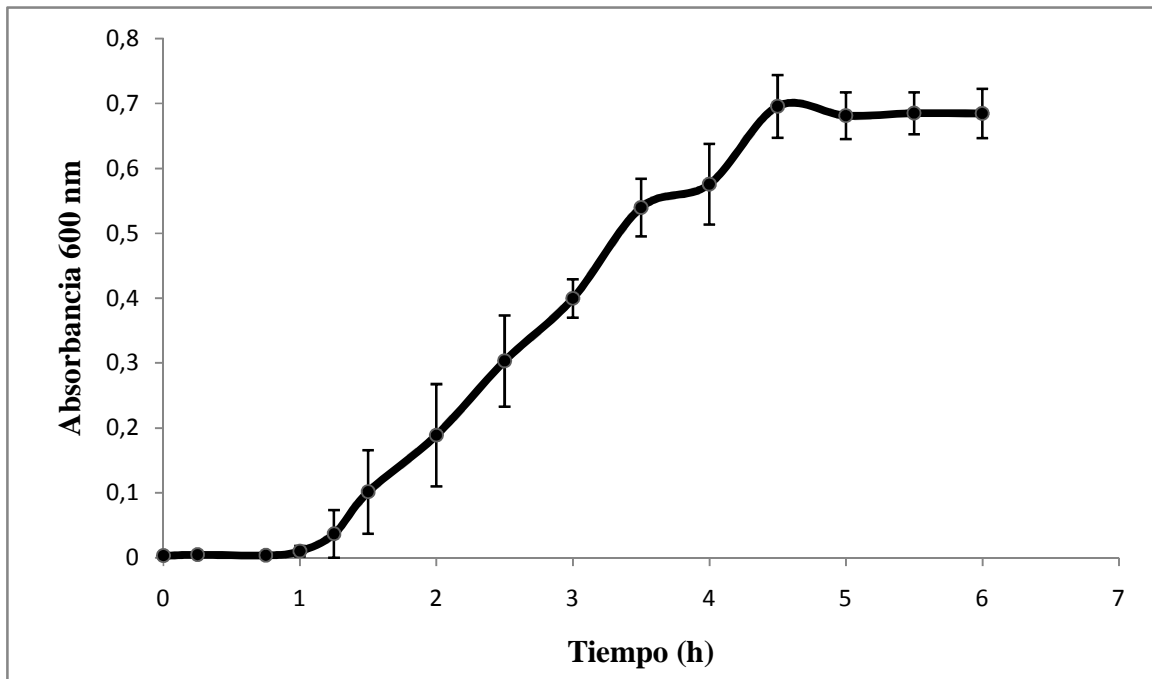


Figura 11. Curva de crecimiento de *Bacillus cereus*, incubada a 35-37 °C por 6 h en función de la absorbancia (600 nm)

Para caso de las levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, autores como Werner-Washburne y col. (1993), describen 5 fases de crecimiento cuando es cultivada en medios líquidos con glucosa como fuente de carbono: la fase de latencia, la logarítmica, el cambio diáuxico, la postdiáuxica y la estacionaria. Sin embargo, estas fases no se observan claramente en la curva de crecimiento de *S. cerevisiae* (Figura 12)

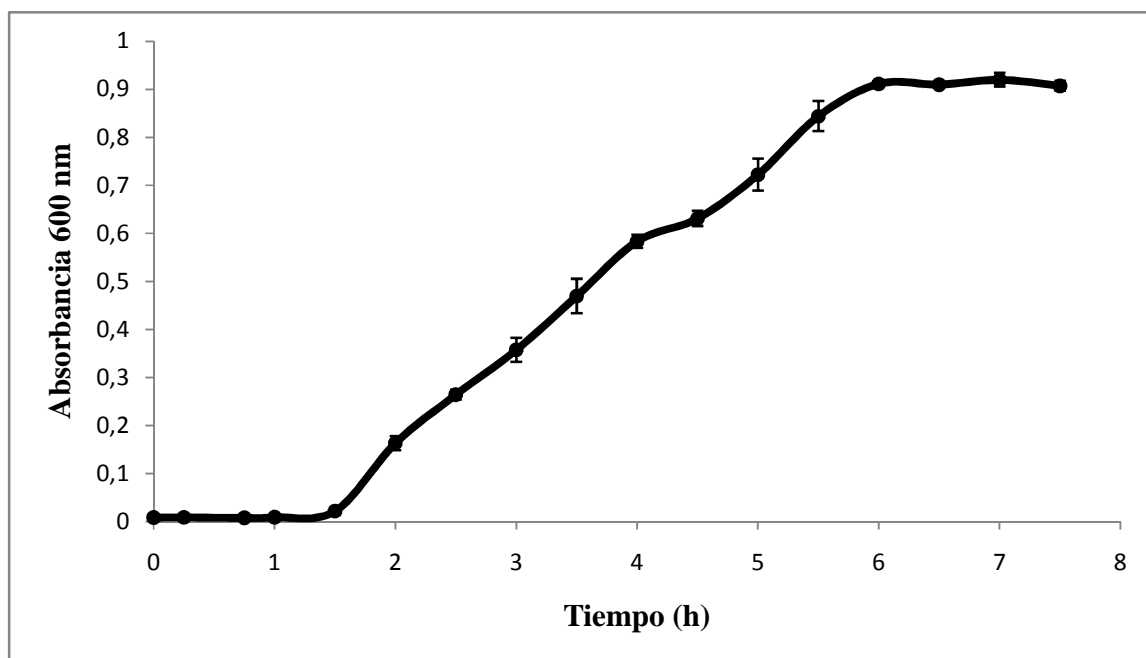


Figura 12. Curva de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, incubada a 30 °C por 7,5 h en función de la absorbancia (600 nm).

Las células de levadura, durante la fase logarítmica alcanzan su máxima velocidad de duplicación y llevan a cabo un metabolismo fermentativo del que se produce etanol. Al disminuir la concentración de glucosa, atraviesan por el cambio diáuxico, un breve periodo de tiempo en el cual no hay división, y la célula cambia de un metabolismo fermentativo a uno

respiratorio. En la fase postdiáuxica usan como fuente de carbono el etanol producido durante la fase logarítmica e incrementan gradualmente su resistencia al estrés; en tanto que la fase estacionaria se presenta cuando los nutrientes del medio se han agotado y no hay división celular. En esta fase, las células acumulan carbohidratos de reserva como trehalosa y glucógeno, alcanzan el máximo nivel de resistencia a estrés y su pared celular se vuelve más gruesa y resistente a la digestión por liticasa (Werner-Washburne y col., 1993).

Para evaluar la sensibilidad de estas cepas de estudio a los pulsos de luz en las 3 fases de crecimiento, se tomó un inóculo que fue diluido hasta una concentración de 10^{-3} en la fase de latencia, 10^{-5} durante el crecimiento logarítmico y 10^{-6} en la fase estacionaria y sembrado en agar por superficie. Posteriormente, se le aplicó un pulso a una intensidad de $0,35 \text{ J/cm}^2$.

En el caso de *P. fluorescens*, se obtuvo una reducción logarítmica de 0,5-0,6 ciclos log en la fase de latencia, 0,8 ciclos log en la exponencial y 0,3 en la estacionaria (Anexo figura 19). Esto concuerda con las investigaciones realizadas por Damar y col. (2002), ellos observaron que hay una mayor inactivación de *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* luego del tratamiento en la fase logarítmica seguida de la latencia y por último se obtiene la menor reducción de microorganismos en la estacionaria.

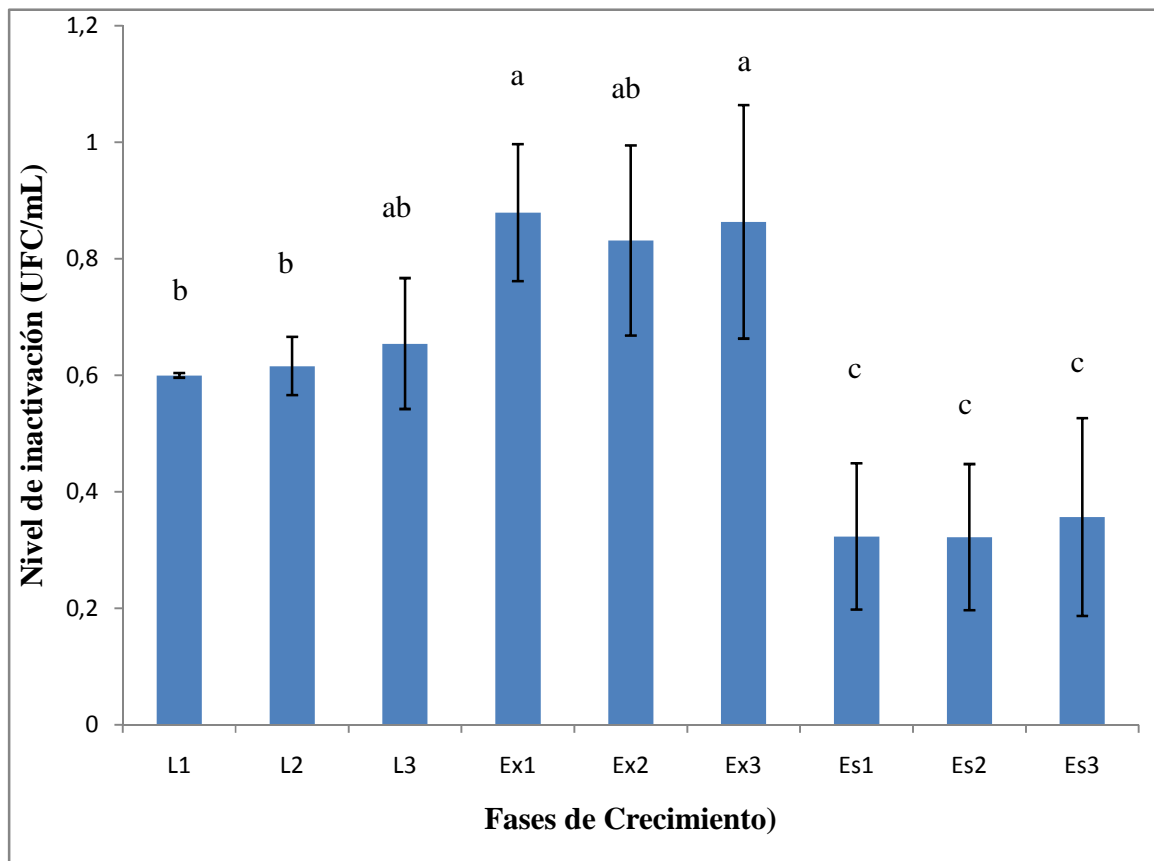


Figura 13. Niveles de inactivación microbiana por pulsos de luz en tres fase de crecimiento para un cultivo de *Pseudomonas fluorescens*. Mediante el análisis de rangos múltiples de Duncan, letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Latencia (L1, L2, y L3), exponencial (Ex1, E2, y Ex3) y estacionario (Es1, Es2 y Es3)

El análisis de varianza realizado, demostró la existencia de diferencias estadísticamente significativa ($P < 0,05$) entre la media de inactivación y las diferentes fases de crecimiento ($P < 0,0001 < 0,05$). Posteriormente, se aplicó la prueba de rangos múltiples de Duncan, para determinar entre cuales había diferencias, resultando que, hay diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) indicadas en el grafico con letras diferentes a, b y c (Figura 13).

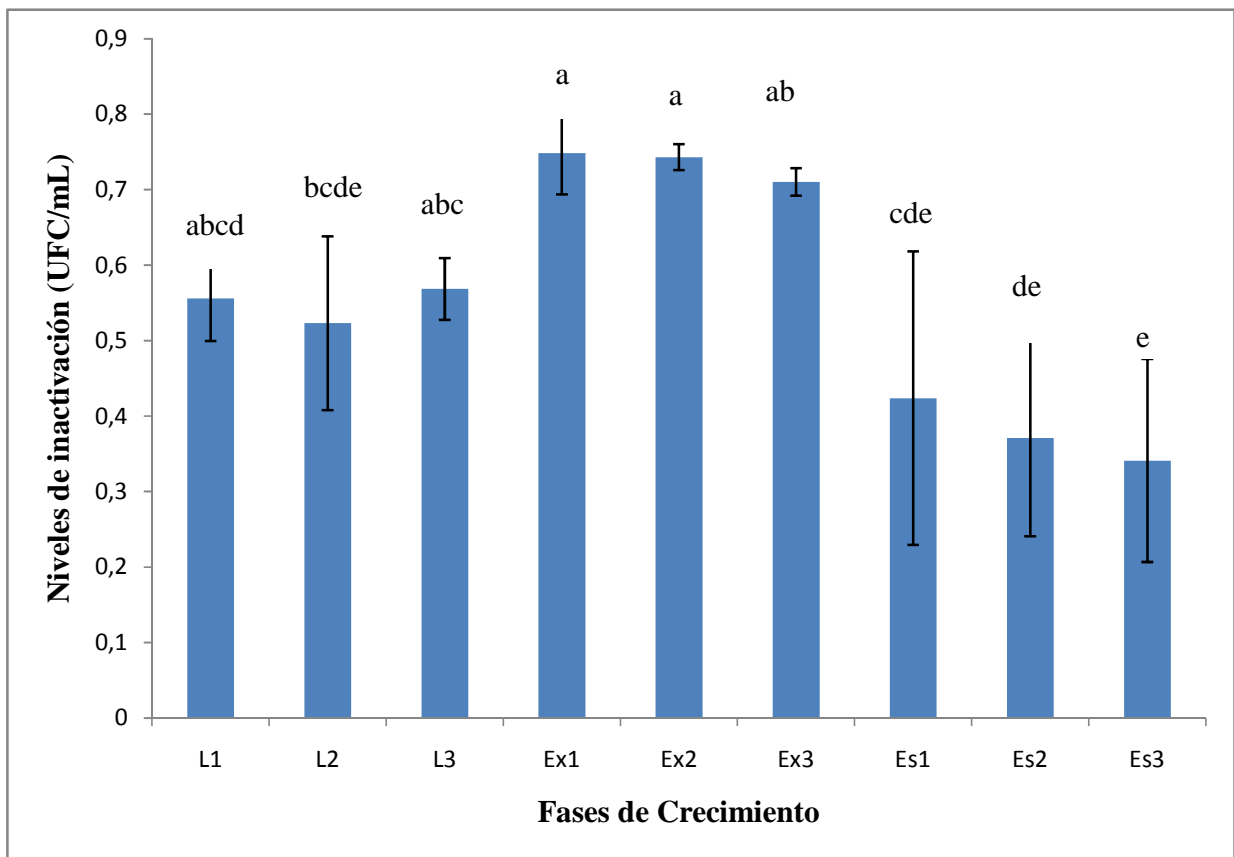


Figura 14. Niveles de inactivación microbiana por pulsos de luz en tres fase de crecimiento para un cultivo de *Salmonella spp.* Mediante el análisis de rangos múltiples de Duncan, letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Latencia (L1, L2, y L3), exponencial (Ex1, E2, y Ex3) y estacionario (Es1, Es2 y Es3)

Al evaluar la inactivación por pulsos de luz en la fase de crecimiento de *Salmonella spp.*, se obtuvo una reducción logarítmica de 0,5 ciclos log en la fase de latencia, 0,7 ciclos log en la fase exponencial y 0,4 en la fase estacionaria (Anexo figura 20). El microorganismo sigue un patrón similar al de *P. fluorescens* ante la sensibilidad a tratamiento con pulsos de luz, a pesar de que no forma biopelículas. Nuevamente se puede observar la mayor inactivación en la fase exponencial seguida de la fase de latencia y por último la fase estacionaria.

De acuerdo a los resultados de análisis de varianza, se obtuvo un P de $0,0003 < 0,05$, determinando que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de inactivación por efecto del tratamiento. Posteriormente, la prueba de rangos múltiples Duncan permitió observar cuales puntos de la curva son diferentes entre sí por efecto del tratamiento, mediante diferentes letras a, b, c, d y e (Figura 14).

En el caso de *Listeria monocytogenes*, se observó una inactivación en las fases de crecimiento de 0,3 ciclos log en la latencia, en la fase exponencial 0,5 ciclos log y en la fase logarítmica y 0,39-0,4 ciclos log en la fase estacionaria (Anexo figura 21).

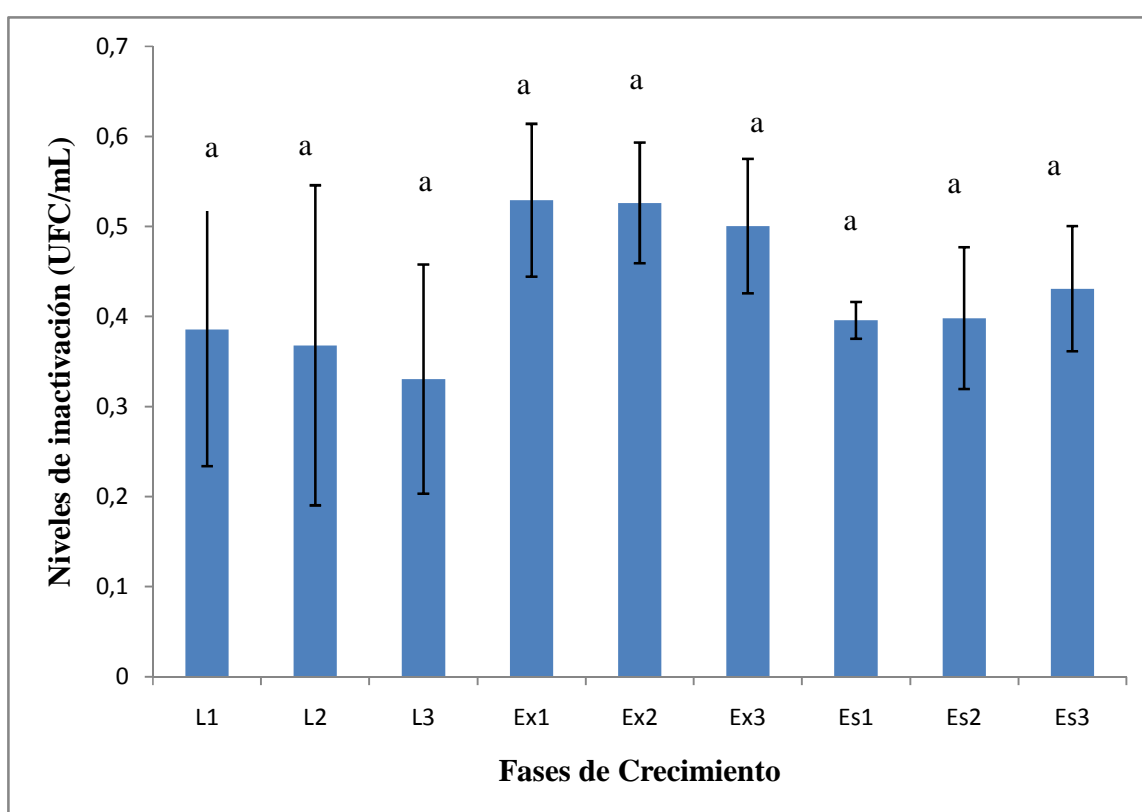


Figura 15. Niveles de inactivación microbiana por pulsos de luz en tres fase de crecimiento para un cultivo de *Listeria monocytogenes* Mediante el análisis de rangos múltiples de Duncan, letras iguales indican que no hay diferencias significativas para $p > 0,05$. Latencia (L1, L2, y L3), exponencial (Ex1, E2, y Ex3) y estacionario (Es1, Es2 y Es3)

De acuerdo a los resultados de análisis de varianza, se obtuvo un P de $0,9790 > 0,05$. No existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de inactivación por efecto del tratamiento. Por lo que la inactivación en cada fase es similar (Figura 15).

En *B. cereus*, se obtuvo una reducción de 0,5 ciclos log en la fase de latencia, 0,6 ciclos log en la exponencial y 0,2 ciclos log en la estacionaria. Se observa nuevamente la menor inactivación en la fase estacionaria, mientras que, la inactivación en la latencia y exponencial son muy similares (Anexo figura 22).

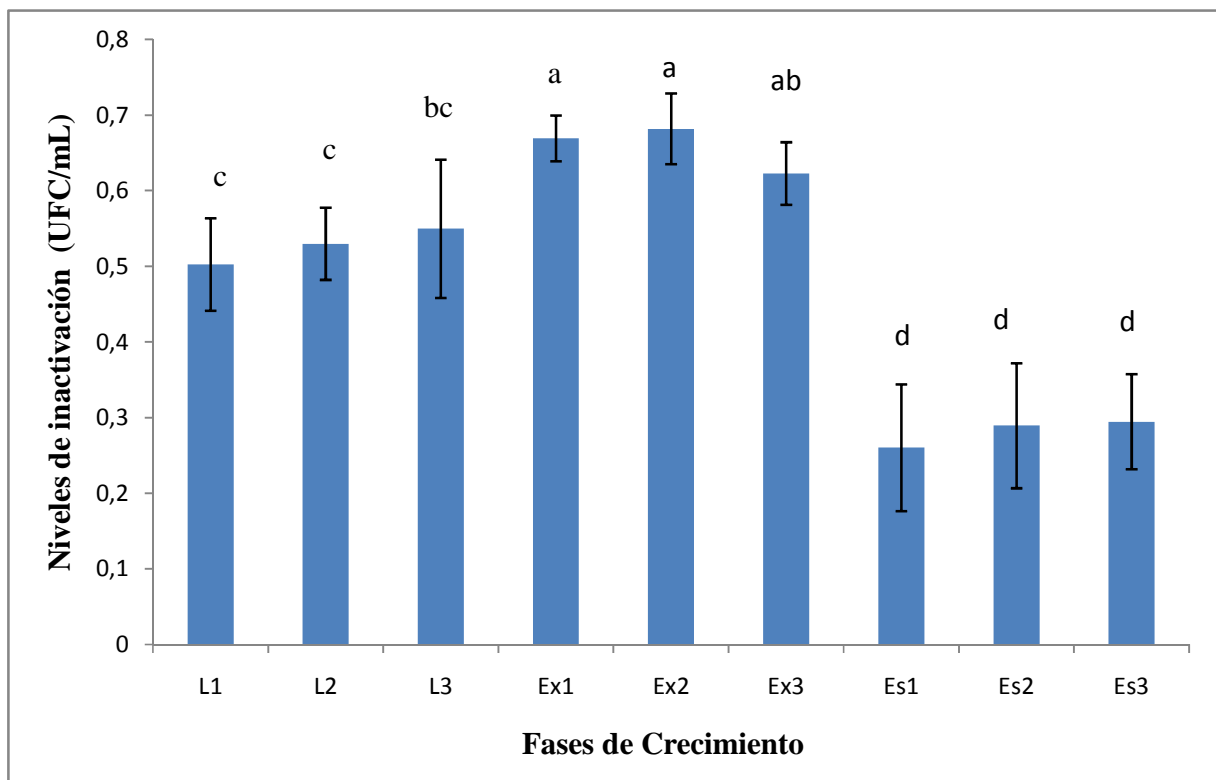


Figura 16. Niveles de inactivación microbiana por pulsos de luz en tres fase de crecimiento para un cultivo de *B. cereus*. Mediante el análisis de rangos múltiples de Duncan, letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($P > 0,05$). Latencia (L1, L2, y L3), exponencial (Ex1, E2, y Ex3) y estacionario (Es1, Es2 y Es3)

De acuerdo a los resultados de análisis de varianza, se obtuvo un P de $0,0000 < 0,05$, determinando que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de inactivación por efecto del tratamiento. Posteriormente, la prueba de rangos múltiples Duncan permitió observar cuales puntos de la curva son diferentes entre sí por efecto del tratamiento, mediante diferentes letras a, b, c y d (Figura 16).

En este trabajo experimental también se evaluó la inactivación por PL en la fase de crecimiento de una levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), en la que se obtuvo una reducción logarítmica de 0,3 ciclos log en la latencia, 0,2 ciclos log en la exponencial y 0,1 ciclos log en la estacionaria (Figura 23).

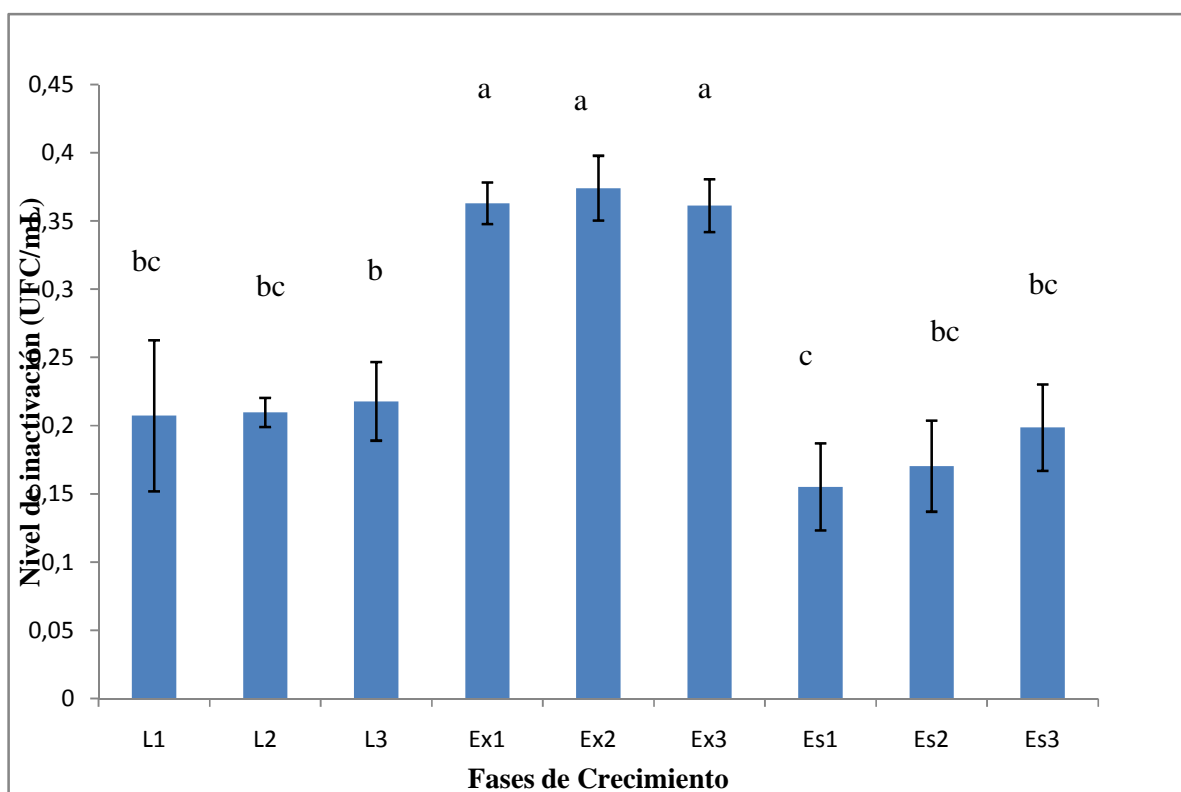


Figura 17. Niveles de inactivación microbiana por pulsos de luz en tres fase de crecimiento para un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*. Mediante el análisis de rangos múltiples de Duncan, letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($P < 0,05$). Latencia (L1, L2, y L3), exponencial (Ex1, E2, y Ex3) y estacionario (Es1, Es2 y Es3)

De acuerdo a los resultados de análisis de varianza y la prueba de rangos múltiples, se obtuvo un valor P de $0,0000 < 0,05$. Por lo que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Inactivación por efecto del tratamiento. Por lo tanto, se observa una diferencia entre la inactivación en cada fase con letras diferentes, a, b y c (Figura 17).

Como se observa en los resultados, para los microorganismos *Pseudomona fluorescens*, *Salmonella* spp., *Bacillus cereus* y *Saccharomyces cerevisiae*, existe una diferencia significativa en la inactivación por pulsos de luz por efecto de las fases de crecimiento, siendo mayor la inactivación en la fase exponencial en todos los casos, luego latencia y por último estacionaria. Esto pudo haber ocurrido, por lo que sucede en el momento en que las células están en cada fase pero también, debe recordarse que la eficiencia de inactivación se debe a la concentración del cultivo y a la intensidad del PL, siendo la fase estacionaria la que tiene mayor densidad de población. Por lo tanto efecto del tamaño de la población y las fases de crecimiento microbiano no pueden ser separados (Gómez-López y col, 2005a). Solo en la cepa de *Listeria monocytogenes* no hay una diferencia significativa de la inactivación en las fases de crecimiento, sin embargo existe una mayor inactivación en la fase exponencial, luego en la fase estacionaria y por último en la fase de latencia; siendo este el único microorganismo con este orden de inactivación.

Un cultivo en fase de latencia tiene una menor densidad de población, por lo que la inactivación en esta fase se debe a que las células están desprotegidas. Sin embargo, en este trabajo no se alcanzó una inactivación total en el caso de estos experimentos, esto se debe a que las células no están gastando energía para el metabolismo y la división celular,

pudiendo utilizar su energía para recuperarse. A partir del momento en que el cultivo empieza a crecer en la fase exponencial aumenta dicha densidad de población pero las células no son capaces de protegerse debido a que la membrana celular es más susceptible, por lo que es en esta fase donde todos los microorganismos estudiados resultaron ser más susceptibles al tratamiento con pulsos de luz. Finalmente, los cultivos alcanzan su mayor concentración en la fase estacionaria, momento en el cual hay mayor densidad de población, por lo que los microorganismos estudiados fueron más resistentes al tratamiento con pulsos de luz en la fase estacionaria, ya que se genera el mismo efecto de atenuación de la luz por las células en las capas superiores, protegiendo a las células de las capas inferiores. Este efecto que evita una eficacia en la inactivación de los microorganismos en la fase estacionaria también fue explicado por McDonald, Curry, Clevenger, Brazos, y col. (2000). Durante la etapa de crecimiento estacionario las células tampoco usan su energía para la división, por lo que pueden recuperarse como en la fase de latencia.

Los resultados de los experimentos de este proyecto, de acuerdo a la susceptibilidad de los microorganismos a los PL, en la fase estacionaria en orden decreciente es: *Salmonella* spp. (Gram⁻), *Listeria monocytogenes* (Gram⁺), *Pseudomonas fluorescens* (Gram⁻), *Bacillus cereus* (Gram⁺) y *Saccharomyces cerevisiae* (Hongo levaduriforme). Estos resultados concuerdan con los obtenidos Gómez-López y col, 2005b, en el que se evaluó una gran gama de microorganismos obteniendo como resultados que no hay reglas claras que se puedan establecer con respecto a la sensibilidad de los diferentes grupos de microorganismos investigados. Sin embargo entre los microorganismos evaluados *Saccharomyces cerevisiae*, es el más resistente a PL. Con respecto a *P. fluorescens*, como

ya se ha mencionado, produce biopelículas, lo que le confiere resistencia en la fase estacionaria pudiendo alterar el orden de inactivación entre cada cepa.

Al evaluar la susceptibilidad de los microorganismos a los PL en la fase exponencial, el patrón de susceptibilidad en orden decreciente es: *Pseudomona fluorescens* (Gram⁻), *Salmonella* spp. (Gram⁻), *Bacillus cereus* (Gram⁺), *Listeria monocytogenes* (Gram⁺) y *Saccharomyces cerevisiae* (hongo levaduriforme). Esto concuerda con los resultados obtenidos por autores como Anderson y col., (2000) y Rowan y col., (1999).

Ellos demostraron que los microorganismos tienen diferencias a la susceptibilidad por PL. Reportaron que en fase estacionaria las bacterias Gram⁺ como *B. cereus*, son más resistentes a los efectos de PL que las bacterias Gram⁻, como *Salmonella enteritidis* y *Escherichia coli*. Además, en experimentos *in vitro* reportaron que los hongos son más resistentes a este tratamiento que las bacterias (Rowan y col., 1999). Estos autores sugieren que la variación en la sensibilidad a los PL por los microorganismos puede estar relacionada con las diferencias en la composición celular de las bacterias, así como sus mecanismos de protección y reparación contra el daño.

La diferencia de sensibilidad en las bacterias se debe a la envoltura de la pared celular de bacterias Gram⁺, que comprende la membrana citoplasmática y una pared celular compuesta por una capa gruesa de peptidoglicano, que rodea a la anterior. La capa de peptidoglicano confiere una gran resistencia a estas bacterias. A diferencia de las Gram⁻, las Gram⁺ no presentan una segunda membrana lipídica externa a la pared celular y esta pared es mucho más gruesa (Mandigan y col., 2006).

Es importante mencionar que la resistencia de hongos a los PL puede estar ligada a la capacidad que tienen de formar esporas y a su pigmentación. Las esporas de *Aspergillus niger* y *Fusarium culmorum*, han demostrado ser más resistentes a los PL comparados en pruebas de bacterias (Anderson y col., 2000). De acuerdo a estos autores, esta resistencia puede ser atribuida a la presencia de pigmentos oscuros de protección en las capas de la pared que rodea la forma de la espora. Se comprobó que los pigmentos de *A. niger* absorben fuertemente en el rango de los rayos UV. Esta característica de absorción de radiación UV, parece desempeñar un papel importante en el mecanismo de defensa de este tipo de microorganismo contra los efectos nocivos de la PL. En contraste con esto, Turtoi y Nicolau (2007) consideran que fialosporos de color oscuro producido por *A. niger* (negro) y *Aspergillus cinnamomeus* (marrón) podrían absorber más energía de luz y, por tanto, ser destruidas más rápidamente a los de PL.

En la presente investigación no se evaluó el daño en las células con microscopía electrónica. Sin embargo, podría decirse que la inactivación de los microorganismos evaluados en las diferentes fases de crecimiento, podría ser por daños en las estructuras celulares. Estos daños podrían deberse a los efectos fotofísico, fotoquímico y fototérmico.

El efecto fototérmico en el daño en las células de los microorganismos evaluados queda descartado, ya que en este caso solo se aplicó un tratamiento de un PL, por lo que no se observaría una diferencia significativa en el aumento de la temperatura en la superficie del agar que fue inoculado con los microorganismos y luego tratado. Esto concuerda con los experimentos realizados por Krishnamurthy y col. (2008), en el que evaluaron en la fase estacionaria los daños causados por tratamientos de PL en células de *Staphylococcus*

aureus, ellos observaron que aunque el efecto térmico juega un papel vital durante un tiempo prolongado de tratamiento con PL (> 5 segundos), es insignificante para los tratamientos más cortos, como en el de la presente investigación.

Krishnamurthy y col. (2008), evidenció en sus trabajos que el daño en las células de *Staphylococcus aureus*, podría deberse a un efecto fotofísico, ya que al observar con microscopia electrónica se evidencian daños en las membranas citoplasmáticas, luego del tratamiento con PL. Lo que conlleva a las fuga del contenido celular y finalmente a la inactivación del microorganismo. También, atribuyen los daños causados al efecto fotoquímico que tiene los tratamientos por PL sobre el ADN de las células microbianas, ya que al observar mediante microscopia electrónica encontraron algunas células sin alteraciones en sus estructuras, pero al ser enriquecidas y nuevamente sembradas, no hubo crecimiento, ya que hay formación de dímeros de pirimidina en el ADN, lo que impide la replicación celular, generando letalidad en las células de *Staphylococcus aureus*. Los ensayos realizados en los trabajos de Krishnamurthy y col. (2008), podrían explicar la inactivación de los microorganismos en las fases de crecimiento en este proyecto.

XI. CONCLUSIONES

- La inactivación por pulsos de luz de un cultivo de *Pseudomonas fluorescens*, se ve afectada por la densidad de población del cultivo. A mayor densidad de población menor es el nivel de destrucción microbiana
- La determinación de la curva de crecimiento microbiano de *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Saccharomyces cerevisiae* bajo las condiciones utilizadas en este estudio, permite observar las tres fases de crecimiento típicas, la fase de latencia, estacionaria y exponencial.
- El nivel de inactivación de *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* spp., *Bacillus cereus* y *Saccharomyces cerevisiae* por efecto de pulsos de luz, se ve afectado por las fases de crecimiento. Estos microorganismos son más resistentes a los pulsos de luz en la fase estacionaria y más sensible en la exponencial. Sin embargo, para el caso de *Listeria monocytogenes* el nivel de inactivación por los pulsos, no se ve afectado por las fases de crecimiento.
- La capacidad de *Pseudomonas fluorescens* de formar biopelículas, posiblemente le confiere mayor resistencia al tratamiento con pulsos de luz, en comparación con *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Saccharomyces cerevisiae*.

- En la fase estacionaria y exponencial, hay un orden de inactivación de microorganismos que concuerda con otras investigaciones, siendo las bacterias Gram-positivas como *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes* más resistentes a los pulsos de luz que las bacterias Gram- negativas como, *Pseudomona fluorescens*. Los hongos como *Saccharomyces cerevisiae* (hongo levaduriforme), son más resistentes a los pulsos de luz que las bacterias.

XII. RECOMENDACIONES

- Al realizar los futuros estudios, se sugiere considerar más réplicas y evaluar un mayor grupo de microorganismos.
- Evaluar el efecto de los Pulsos de Luz en la densidad de población en medios sólidos, para comparar los resultados obtenidos en este proyecto.
- Evaluar el efecto de los PL en la densidad de población en alimentos.
- Se recomienda realizar un estudio en el que se evalúa el daño de las células mediante microscopía electrónica.
- Evaluar la capacidad de reparación de los microorganismos luego de un tratamiento con pulsos de luz.
- Realizar un estudio en el que se considere aplicaciones de pulsos de luz a diferentes intensidades y tiempos.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abad-Lozano, J. L., Rodríguez-Velera, F. 1984. Photodynamic inactivation of *Bacillus subtilis* spores. *J. Appl. Bacteriol.* **57**: 339-343.
- Anderson, J. G., Rowan, N. J., Mac Gregor, S. J., Fouracre, R. A., Farish, O. 2000. Inactivation of food-borne enteropathogenic bacteria and spoilage fungi using pulsed-light. *IEEE Trans. Plasma Sci.* **28**: 83-88.
- Anderson, M. R., Calderon, V. 2000. Microbiología Alimentaria. Metodología Analítica para alimentos y bebidas. Editorial Díaz de Santos. Segunda Edición. Madrid, España.
- Anderson, P., M. R. 2005. Enfermedades de origen alimentario. Su prevención. Primera Edición. Editorial Díaz de Santos. Madrid, España.
- Barbosa-Cánovas, G. V., Góngora-Nieto, M. M., Swanson, B. G. 1998. Nonthermal electrical methods in food preservation. *J. Food Sci. Int.* **4**: 363-370
- Barbosa-Cánovas, G. V., Schaffner, D. W., Pierson, M. D., Zhang, Q. H. 2000. Pulsed light technology. *J. Food Sci, Supplement.* **65**: 82-85.
- Bintsis, T., Litopoulou-Tzanetaki, E., Robinson, R. 2000. Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry: A critical review. *J Sci Food Agr.* **80**: 637-645.
- Bushnell, A., Cooper, J. R., Dunn, J., Leo, F., May, R. 1998. Pulsed Light sterilization tunnels and sterile-pass-through. *Pharm. Eng.* **18**: 48-48
- Cleaver, J. E. 2003. Photoreactivation. *DNA Repair.* **2**: 629-638.

- Craik, S. A., Weldon, D., Finich, G. R., Bolton, J. R., Belosevic, M. 2001. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts using medium- and low- pressure ultraviolet radiation. *Water Res.* **35**: 1387-1398
- Damar, S., Bozoglu, F., Hizal, M., Bayindirli, M. 2002. Inactivation and injury of *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* by pulsed electric field. *World J Microb Biot.* **18**: 1-6
- De La Rosa, M., Prieto, J. 2003. Microbiología para Ciencias de la salud. Editorial Elsevier. Segunda edición. España
- Dunn, J. 1996. Pulsed light and pulsed electric field for foods and eggs. *Poultry Sci.* **9**: 1133–1136.
- Dunn, J. 2001. Disinfection, sterilization and preservation. Lippincott Williams & Wilkins. Quinta Edition. Philadelphia, E.U.A.
- Dunn, J. E., Clark, W. R., Asmus, J. F. 1989. Methods for preservation of foodstuffs. Maxwell Laboratories Inc., San Diego, USA.
- Dunn, J., Bushnell, A., Ott, T., Clark, W. 1997. Pulsed white light food processing. *Cereal Food World.* **42**: 510–515.
- Dunn, J., Ott, T., Clark, W. 1995. Pulsed light treatment of food and packaging. *Food Technol-Chicago.* **9**: 95–98.
- Elmnasser, N., Dalgalarrrondo, M., Orange, N., Bakhrouf, A., Haertlé, T., Federighi, M., y col. 2008. Effect of pulsed-light treatment on milk proteins and lipids. *J Sci Food Agr Chem.* **56**: 1984–1991.

- Elmnasser, N., Guillou, S., Leroi, F., Orange, N., Bakhrouf, A., Federighi, M. 2007. Pulsed-light system as a novel food decontamination technology: A review. *Can. J. Microbiol.* **53**: 813–821.
- Farkas, J. 1997. Physical methods of food preservation. In *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. Doyle MP, Beauchat LR, Montville TJ, Eds. Washington. USA.
- FDA. 2001. Bacteriological Analytical Manual [En línea]. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM063346>. [Consulta: 14 de Abril de 2010].
- Fine, F., y Gervais, P. 2004. Efficiency of pulsed UV light for microbial decontamination of food powders. *J. Food Prot.* **67**: 787–792.
- Folch-Mallol, J. L., Garay-Arroyo, A., Lledías, F., Covarrubias, A. 2004. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología.* **46**: 24-46
- Ghasemi, Z., Mc Gregor, S., Anderson, J., Lamont, Y. 2003. Development of an integrated solid-state generator for light inactivation of food-related pathogenic bacteria. *Meas. Sci. Technol.* **14**: 26-32.
- Giese, N., Darby, J. 2000. Sensitivity of microorganisms to different wavelengths of UV light: implications on modeling of medium pressure UV systems. *Water Res.* **34**: 4007-4013.
- Gómez-López, V. M., Devlieghere, F., Bonduelle, V., Debevere, J. 2005a. Factors affecting the inactivation of microorganisms by intense light pulses. *J. Appl. Microbiol.* **99**: 460-470.

- Gómez-López, V. M., Devlieghere, F., Bonduelle, V., Debevere, J. 2005b. Intense light pulses decontamination of minimally processed vegetables and their shelf-life. *Int. J. Food Microbiol.* **103**: 79–89.
- Gómez-López, V. M., Ragaert, P., Debevere, J., Devlieghere, F. 2007. Pulsed Light for food decontamination: a review. *Trends Food Sci. Technol.* **18**: 464-473.
- Hollósy, F. 2002. Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron.* **33**: 179–197.
- Hoornstra, E., de Jong, G. Notermans, S. 2002. Preservation of vegetables by light. In Conference frontiers in microbial fermentation and preservation. Pag. 75–77. The Netherlands, Wageningen.
- Jay, J. J. 1996. Modern food microbiology. New York: Chapman & Hall.
- Jiménez-Sánchez, A., Guerrero, R. 1982. Serie de Biología Fundamental: Genética Molecular Bacteriana. Editorial Reverté. Primera Edición. Barcelona, España.
- Kao, Y. T., Saxena, C., Wang, L., Sancar, A., Zhong, D. 2005. Direct observation of thymine dimer repair in DNA photolyase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**: 16128-16132.
- Koutchma, T. 2008. UV light for processing foods. *Ozone-Sci Eng.* **30**: 93–98.
- Koutchma, T., Keller, S., Parisi, B., Chirtel, S. 2004. Ultraviolet disinfection of juice products in laminar and turbulent flow reactors. *Innov Food Sci Emerg.* **5**: 179–189.
- Krishnamurthy, K., Demirci, A., Irudayaraj, J. 2004. Inactivation of *Staphylococcus aureus* by pulsed UV-light sterilization. *J. Food Prot.* **67**: 1027–1030.
- Krishnamurthy, K., Demirci, A., Irudayaraj, J. M. 2007. Inactivation of *Staphylococcus aureus* in milk using flow-through pulsed UV-light treatment system. *J Food Sci.* **7**: 233–239.

- Krishnamurthy, K., Tewari, J. C., Irudayaraj, J., Demirci, A. 2008. Microscopic and spectroscopic evaluation of inactivation of *Staphylococcus aureus* by pulsed UV light and infrared heating. *Food Bioprocess Technol.*
- Lagunas-Solar, M.C., Piña, C., MacDonald, J. D., Bolkan, L. 2006. Development of pulsed UV light processes for surface fungal disinfection of fresh fruits. *J. Food Prot.* **2**: 376–384.
- Lamont, Y., Rzezutka, A., Anderson, J. G., Mac Gregor, S. J., Given, M. J., Deppe, C. 2007. Pulsed UV-light inactivation of poliovirus and adenovirus. *Lett. Appl. Microbiol.* **5**: 564–567
- MacGregor, S. J., Rowan, N. J., Mc Ilvaney, L., Anderson, J. G., Fouracre, R. A., Farish, O. 1998. Light inactivation of food-related pathogenic bacteria using a pulsed power source. *Lett. Appl. Microbiol.* **27**: 67–70.
- Mandigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. 2006. Brock. Biología de microorganismos. Editorial Pearson Prentice Hall. Decima Edición. España.
- Marquenie, D., Michiels, C. W., Van Impe, J. F., Schrevens, E., Nicolaï, B. N. 2003. Pulsed white light in combination with UV-C and heat to reduce storage rot of strawberry. *Postharvest Biol. Technol.* **28**: 455-461.
- Marriott, N. 1999. Principles of food sanitation. AN Aspen publication. Four Editions. Gaithersburg, USA.
- McDonald, K. F., Curry R. D., Clevenger T. E., Unklesbay K., Eisenstrack A., Golden J., Morgan R. D. 2000. A comparison of pulsed and continuous ultraviolet light sources for the decontamination of surfaces. *IEEE Trans. Plasma Sci.* **28**: 1581–1587.

- Mertens, B., Knorr, D. 1992. Developments of non-thermal processes for food preservation. *Food Technol.* **46**: 124-133.
- Mitchell, D. L., Jen, J., Cleaver, J. E. 1992. Sequence specificity of cyclobutane pyrimidine dimers in DNA treated with solar (ultraviolet B) radiation. *Nucleic Acids Res.* **20**: 225-229.
- Oms-oliu, G., Martín-Belloso, O. 2008. Pulsed Light Treatments for Food Preservation. A Review. *Food Bioprocess Technol.*
- Ozer, N. P., Demirci, A. 2005. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* inoculated on raw salmon fillets by pulsed UV-light treatment. *Int. J. Food Sci. Technol.* **40**: 1-7
- Palmieri, L., Cacace, D. 2005. Emerging Technologies for Food Processing. Editorial Elsevier. First Edition. California, USA
- Parsek, M.R., Singh, P.K. 2003. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* **57**: 677–701
- Roberts, P., Hope, A. 2003. Virus inactivation by high intensity broad spectrum pulsed light. *J. Virol. Methods.* **110**: 61-65.
- Rowan, N. J., Mac Gregor, S. J., Anderson, J. G., Fouracre, R. A., Mc Ilvaney, L., Farish, O. 1999. Pulsed-light inactivation of food-related microorganisms. *Appl. Environ. Microb.* **65**: 1312-1315.
- Setlow, P. 1992. I will survive: protecting and repairing spore DNA. *J. Bacteriol.* **174**: 2737-2741.
- Shama, G. 1992. Ultraviolet irradiation apparatus for disinfecting liquids of high ultraviolet absorptivities. *Lett. Appl. Microbiol.* **15**: 69–72.

- Shama, G. 1999. Encyclopedia of food microbiology. Ultraviolet light 3: Pag. 2208–2214. In R. K. Robinson, C. Batt, & P. Editorial Pates. London: Academic.
- Shama, G. 2007. Process challenges in applying low doses of ultraviolet light to fresh produce for eliciting beneficial hermetic responses. *Postharvest Biol. Technol.* **44**: 1–8.
- Sillankorva, S., Neubauer, P., Azeredo, A. 2008. *Pseudomonas fluorescens* biofilms subjected to phage phiIBB-PF7A. *BMC Biotechnol.* 2008. **8**: 79.
- Slieman, T. A., Nicholson, W. L. 2000. Artificial and solar UV radiation induces strand breaks and cyclobutane dimers in *Bacillus subtilis* spore DNA. *Appl. Environ. Microb.* **66**: 199-205
- Smith, W., Lagunas-Solar, C., Cullor, J.S. 2002. Use of pulsed ultraviolet laser light for the cold pasteurization of bovine milk. *J. Food Prot.* **9**: 1480–1482.
- Sonenshein, A. L. 2003. Killing of *Bacillus* spores by high-intensity ultraviolet light. In Sterilization and decontamination using high energy light. Xenon Corporation, Woburn, E.U.A.
- Stermer, R. A., Lasater-Smith, M. and Brasington, C. F. 1987. Ultraviolet radiation an effective bactericide for fresh meat. *J. Food Prot.* **50**:108–111.
- Takeshita, K., Shibato, J., Sameshima, T., Fukunaga, S., Isobe, S., Arihara, K. 2003. Damage of yeast cells induced by pulsed light irradiation. *Int. J. Food Microbiol.* **85**: 151–158
- Takeshita, K., Yamanaka, H., Sameshima, T., Fukunaga, S., Isobe, S., Arihara, K. 2002. Sterilization effect of pulsed light on various microorganisms. *Bokin Bobai.* **30**: 277-284.

- Tonon, F., Agoulon, A. 2003. Lumiere pulse, principe et application au cas des solutions liquides. Industries Agro-alimentaires, la conservation de demain, Cuarta edición. Talence, France.
- Turtoi, M., Nicolau, A. 2007. Intense light pulse treatment as alternative method for mould spores destruction on paper-polyethylene packaging material. *J Food Eng.* **83**: 47–53.
- Wekhof, A., Trompeter, F. J., Franken, O. 2001. Pulse UV disintegration (PUVD): A new sterilization mechanism for packaging and broad medical-hospital applications. In: Proceedings of the First International Conference on Ultraviolet Technologies. Washington, DC, USA.
- Werner-Washburne M., B. E., Johnston G.C., & R.A, Singer. 1993. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev.* **57**: 383-401
- Wright, J. R., Summer, S., Hackney, C., Pierson, D., Zoeklein, B.W. 2000. Efficacy of ultraviolet light for reducing *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized apple cider. *J. Food. Prot.* **6-35**: 563–567.
- Wuytack, E. Y., Phuong, L. D. T., Aertsen, A., Reyns, K. M., Marquenie, D., De Ketelaere, B. 2003. Comparison of sublethal injury induced en *Salmonella enteric* serovar *Typhimurium* by heat and by different nonthermal treatment. *J. Food. Prot.* **66**: 31-37

Consultas en línea:

- www.wikimedia.org/wikipedia/DNA_UV_mutation.gif/219px-DNA_UV_mutation.gif
[Consuta: 22 de marzo de 2010]
- www.synergyworldwide.com [Consuta: 22 de marzo de 2010]

XIV. ANEXOS

1. Gráficos de resultados

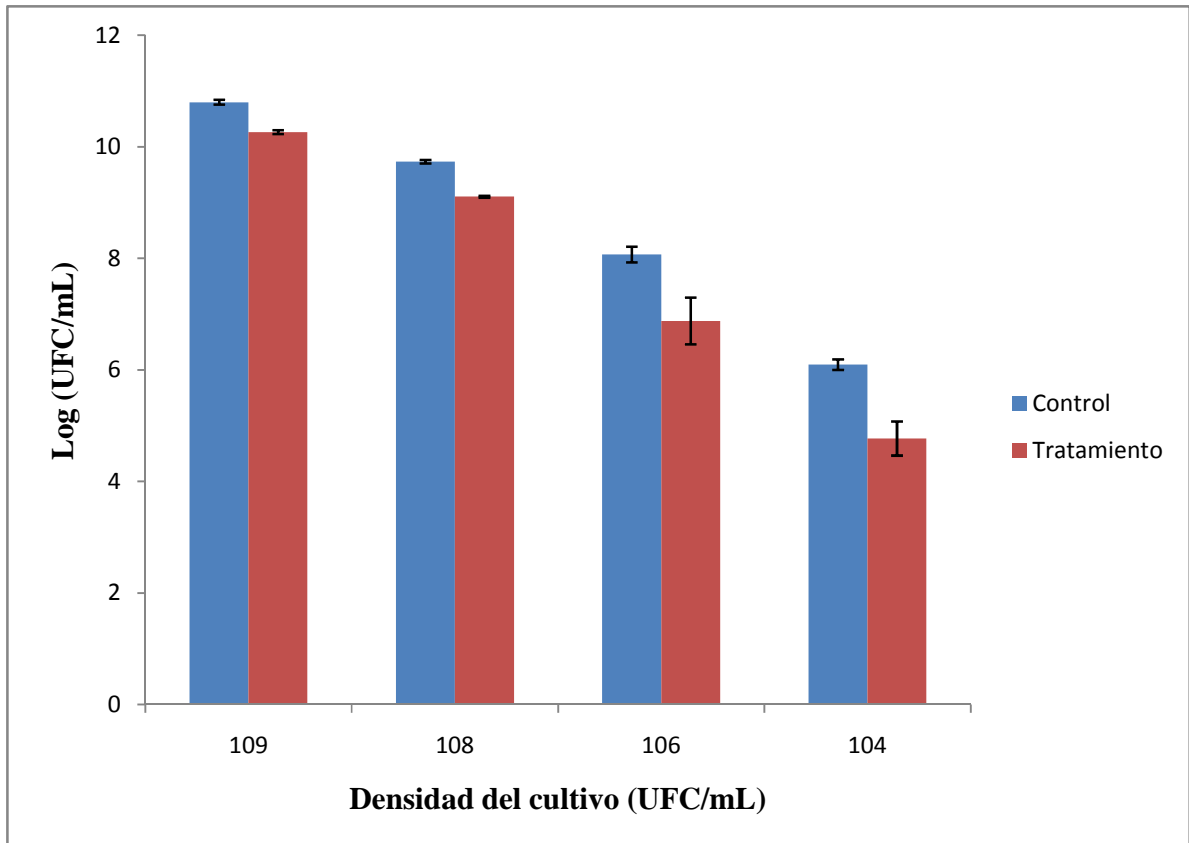


Figura 18. Diferencias en la densidad de población de un cultivo de *P. fluorescens* antes y después de un tratamiento por PL.

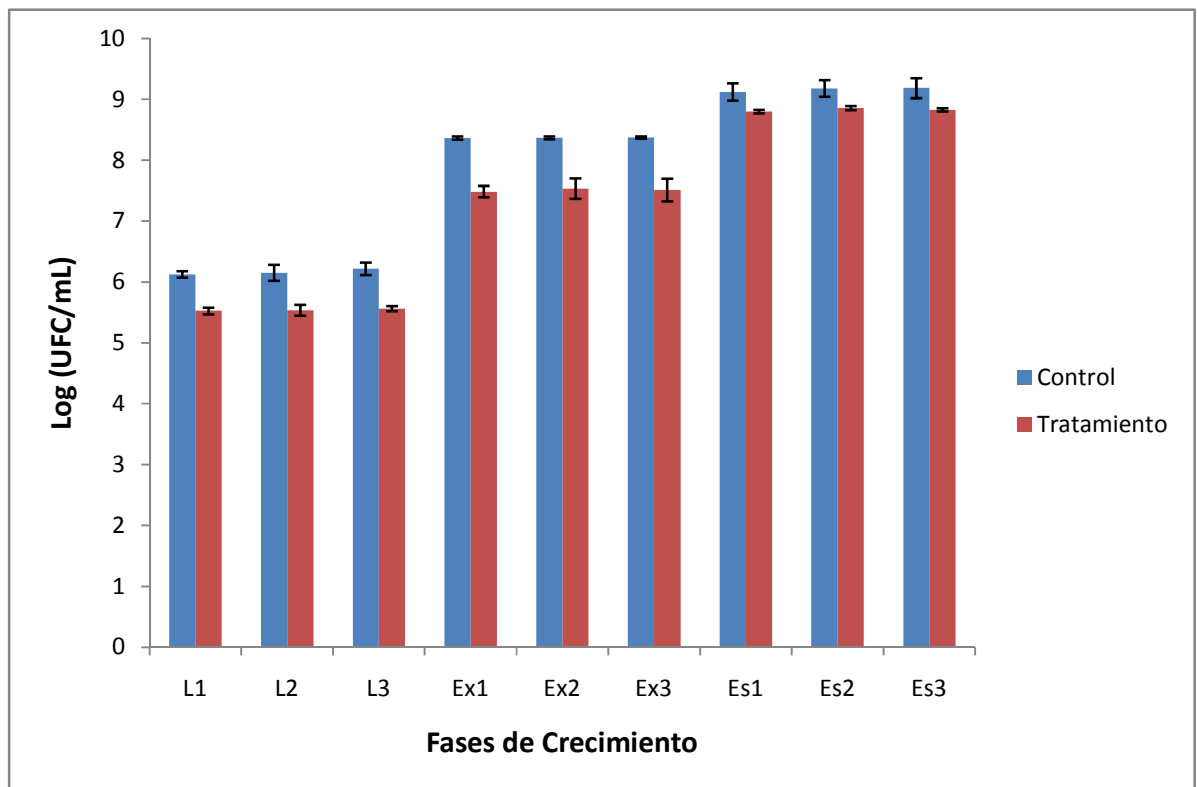


Figura 19. Concentración de un cultivo de *Pseudomonas fluorescens* antes y después de un tratamiento de pulsos de luz en las fases de crecimiento. Latencia (L1, L2, y L3), exponencial (Ex1, E2, y Ex3) y estacionario (Es1, Es2 y Es3).

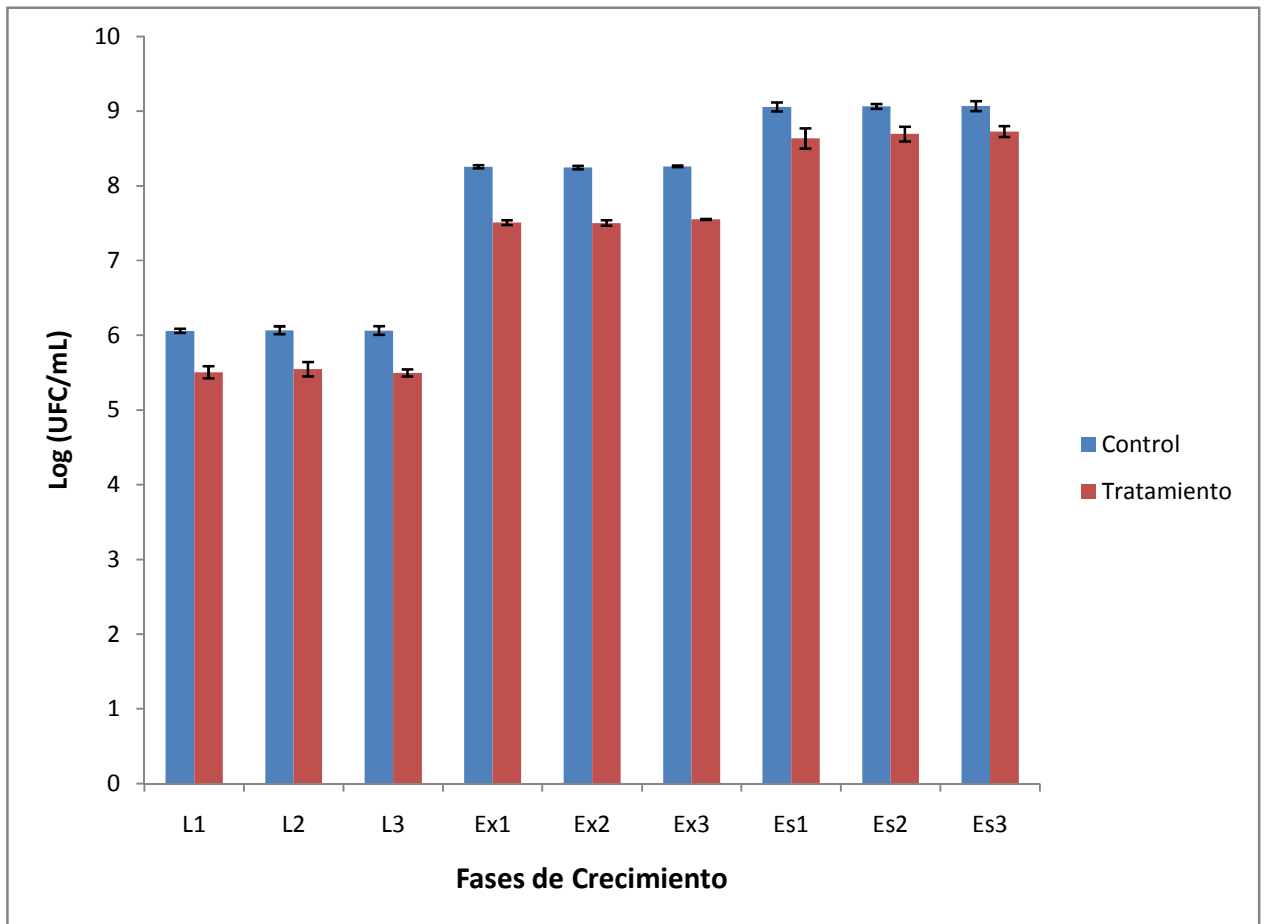


Figura 20. Concentración de un cultivo de *Salmonella spp.* antes y después de un tratamiento de pulsos de luz en las fases de crecimiento. Latencia (L1, L2, y L3), exponencial (Ex1, E2, y Ex3) y estacionario (Es1, Es2 y Es3).

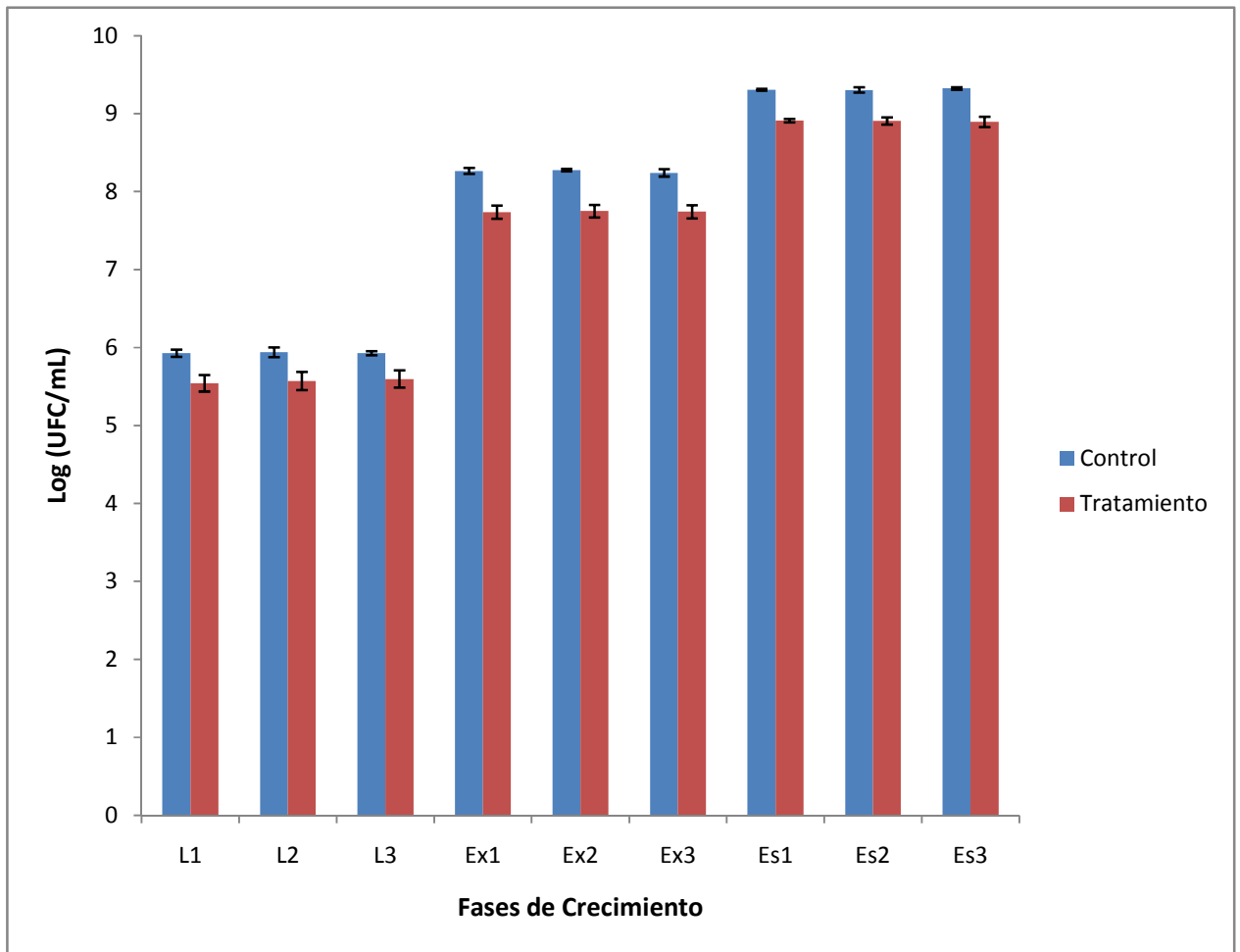


Figura 21. Concentración de un cultivo de *Listeria monocytogenes* antes y después de un tratamiento de pulsos de luz en las fases de crecimiento. Latencia (L1, L2, y L3), exponencial (Ex1, E2, y Ex3) y estacionario (Es1, Es2 y Es3).

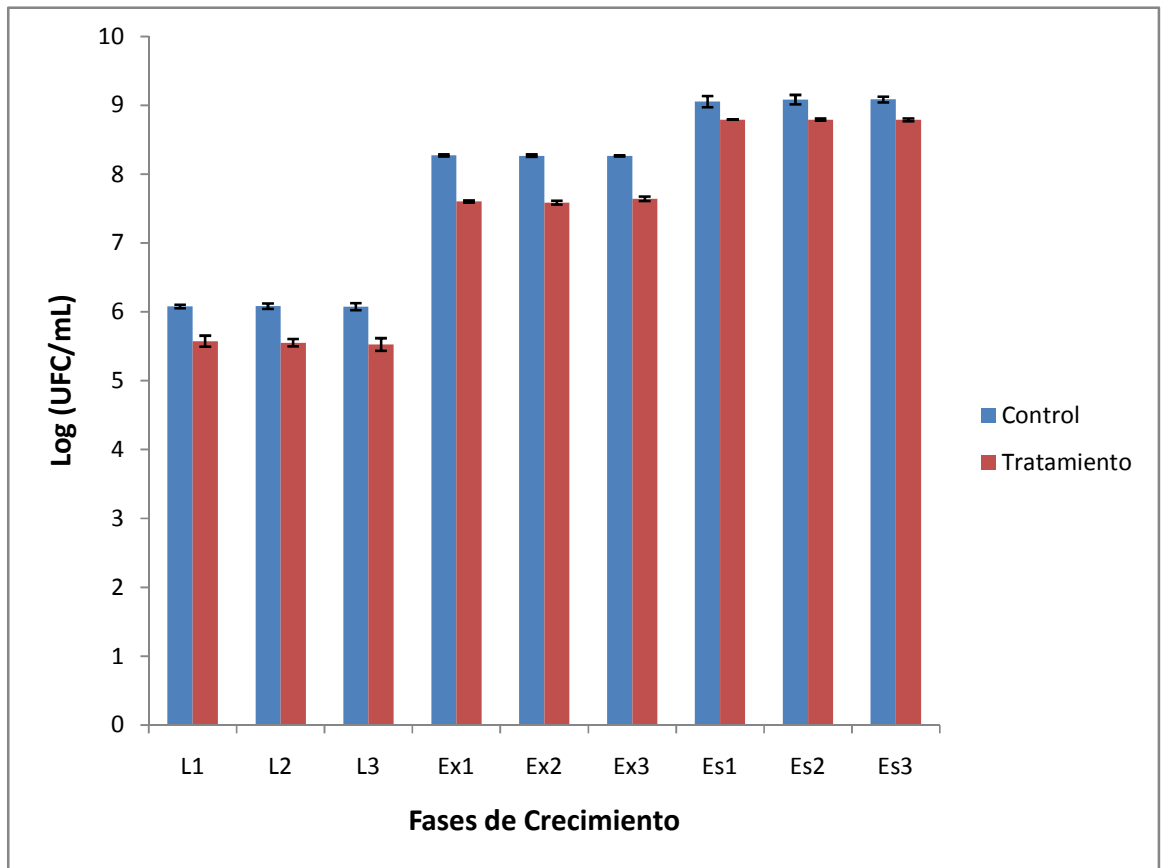


Figura 22. Concentración de un cultivo de *B. cereus* antes y después de un tratamiento de pulsos de luz en las fases de crecimiento. Latencia (L1, L2, y L3), exponencial (Ex1, E2, y Ex3) y estacionario (Es1, Es2 y Es3)

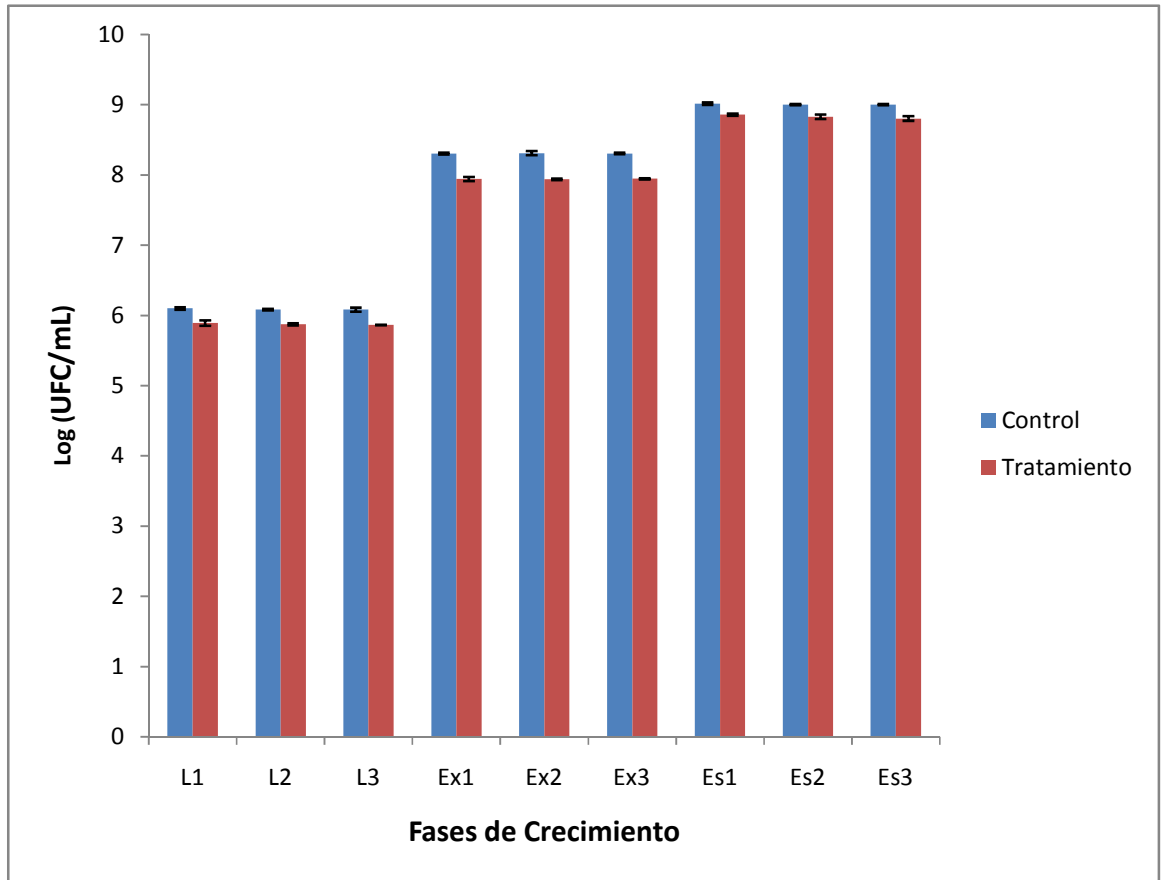


Figura 23. Concentración de un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* antes y después de un tratamiento de pulsos de luz en las fases de crecimiento. Latencia (L1, L2, y L3), exponencial (Ex1, E2, y Ex3) y estacionario (Es1, Es2 y Es3)

1.1 Análisis estadístico para *P. fluorescens*

ANOVA Simple - Inactivación por Tratamiento

Variable dependiente: Inactivación

Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 27

Número de niveles: 9

El StatAdvisor

Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de un factor para Inactivación. Construye varias pruebas y gráficas para comparar los valores medios de Inactivación para los 9 diferentes niveles de Tratamiento. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Si le preocupa la presencia de valores atípicos, puede elegir la Prueba de Kruskal-Wallis la cual compara las medianas en lugar de las medias. Las diferentes gráficas le ayudarán a juzgar la significancia práctica de los resultados, así como le permitirán buscar posibles violaciones de los supuestos subyacentes en el análisis de varianza.

Tabla ANOVA para Inactivación por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,24997	8	0,156246	9,01	0,0001
Intra grupos	0,312067	18	0,017337		
Total (Corr.)	1,56204	26			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de Inactivación en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 9,01228, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Inactivación entre un nivel de Tratamiento y otro, con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

Pruebas de Múltiple Rangos para Inactivación por Tratamiento

Método: 95,0 porcentaje Duncan

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
8	3	0,321835	X
7	3	0,323239	X
9	3	0,356497	X
1	3	0,599675	X
2	3	0,615719	X
3	3	0,654214	XX
5	3	0,831024	XX
6	3	0,8631	X
4	3	0,878978	X

Contraste	Sig.	Diferencia
1 - 2		-0,0160442
1 - 3		-0,054539
1 - 4	*	-0,279303
1 - 5		-0,231349
1 - 6	*	-0,263424
1 - 7	*	0,276436
1 - 8	*	0,27784
1 - 9	*	0,243178
2 - 3		-0,0384948
2 - 4	*	-0,263259
2 - 5		-0,215305
2 - 6	*	-0,24738

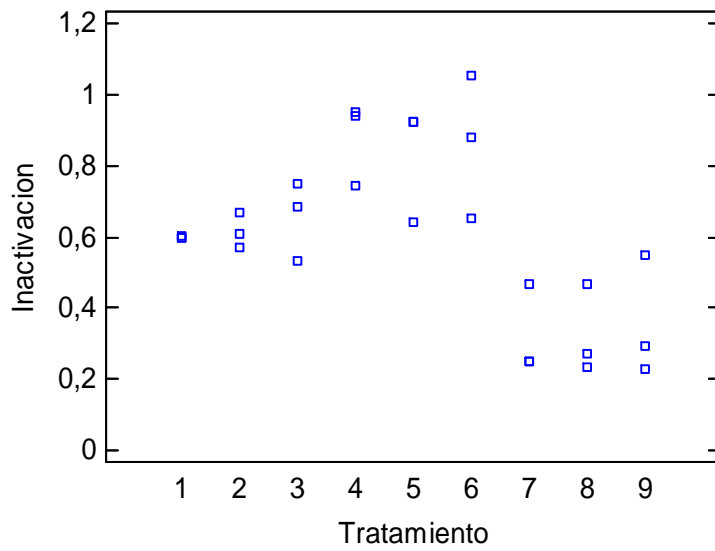
2 - 7	*	0,29248
2 - 8	*	0,293884
2 - 9	*	0,259223
3 - 4		-0,224764
3 - 5		-0,17681
3 - 6		-0,208885
3 - 7	*	0,330975
3 - 8	*	0,332379
3 - 9	*	0,297717
4 - 5		0,0479538
4 - 6		0,0158786
4 - 7	*	0,555739
4 - 8	*	0,557143
4 - 9	*	0,522481
5 - 6		-0,0320752
5 - 7	*	0,507785
5 - 8	*	0,509189
5 - 9	*	0,474527
6 - 7	*	0,539861
6 - 8	*	0,541264
6 - 9	*	0,506603
7 - 8		0,00140364
7 - 9		-0,0332579
8 - 9		-0,0346616

* indica una diferencia significativa.

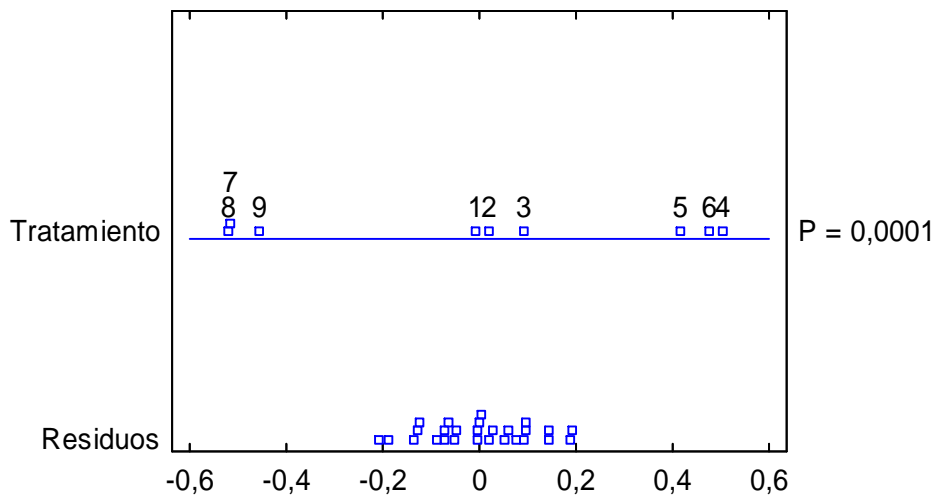
El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 22 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Duncan. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

Dispersión por Código de Nivel



ANOVA Gráfico para Inactivacion



1.2 Análisis estadístico para *Salmonella* spp.

ANOVA Simple - Inactivación por Tratamiento

Variable dependiente: Inactivación

Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 27

Número de niveles: 9

El StatAdvisor

Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de un factor para Inactivación. Construye varias pruebas y gráficas para comparar los valores medios de Inactivación para los 9 diferentes niveles de Tratamiento. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Si le preocupa la presencia de valores atípicos, puede elegir la Prueba de Kruskal-Wallis la cual compara las medianas en lugar de las medias. Las diferentes gráficas le ayudarán a juzgar la significancia práctica de los resultados, así como le permitirán buscar posibles violaciones de los supuestos subyacentes en el análisis de varianza.

Tabla ANOVA para Inactivación por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,584622	8	0,0730778	6,95	0,0003
Intra grupos	0,189344	18	0,0105191		
Total (Corr.)	0,773966	26			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de Inactivación en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 6,94716, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Inactivación entre un nivel de Tratamiento y otro, con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

Pruebas de Múltiple Rangos para Inactivación por Tratamiento

Método: 95,0 porcentaje Duncan

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
9	3	0,341022	X
8	3	0,371193	XX
7	3	0,423707	XXX
2	3	0,52297	XXXX
1	3	0,556074	XXXXX
3	3	0,568334	XXX
6	3	0,710119	XX
5	3	0,743016	X
4	3	0,748544	X

Contraste	Sig.	Diferencia
1 - 2		0,0331041
1 - 3		-0,0122603
1 - 4		-0,19247
1 - 5		-0,186942
1 - 6		-0,154045
1 - 7		0,132367
1 - 8		0,18488
1 - 9	*	0,215052
2 - 3		-0,0453643
2 - 4	*	-0,225575
2 - 5	*	-0,220046
2 - 6		-0,187149

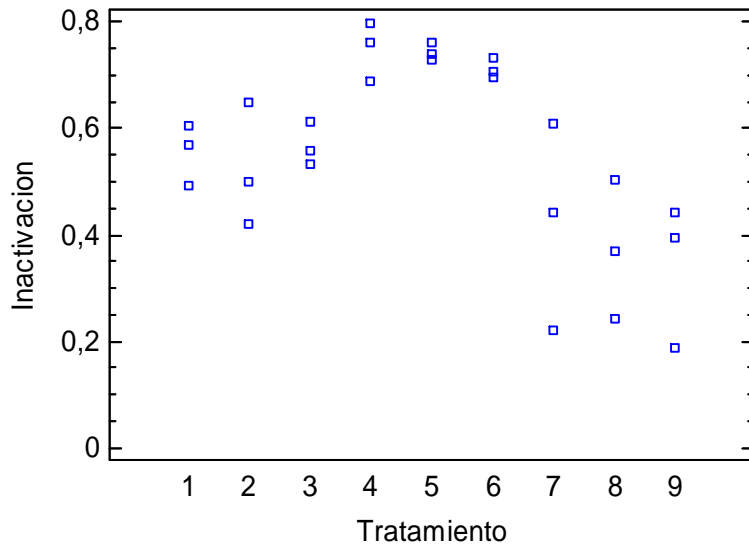
2 - 7		0,0992629
2 - 8		0,151776
2 - 9		0,181948
3 - 4		-0,18021
3 - 5		-0,174682
3 - 6		-0,141785
3 - 7		0,144627
3 - 8	*	0,197141
3 - 9	*	0,227312
4 - 5		0,00552833
4 - 6		0,0384255
4 - 7	*	0,324837
4 - 8	*	0,377351
4 - 9	*	0,407522
5 - 6		0,0328972
5 - 7	*	0,319309
5 - 8	*	0,371822
5 - 9	*	0,401994
6 - 7	*	0,286412
6 - 8	*	0,338925
6 - 9	*	0,369097
7 - 8		0,0525133
7 - 9		0,0826848
8 - 9		0,0301715

* indica una diferencia significativa.

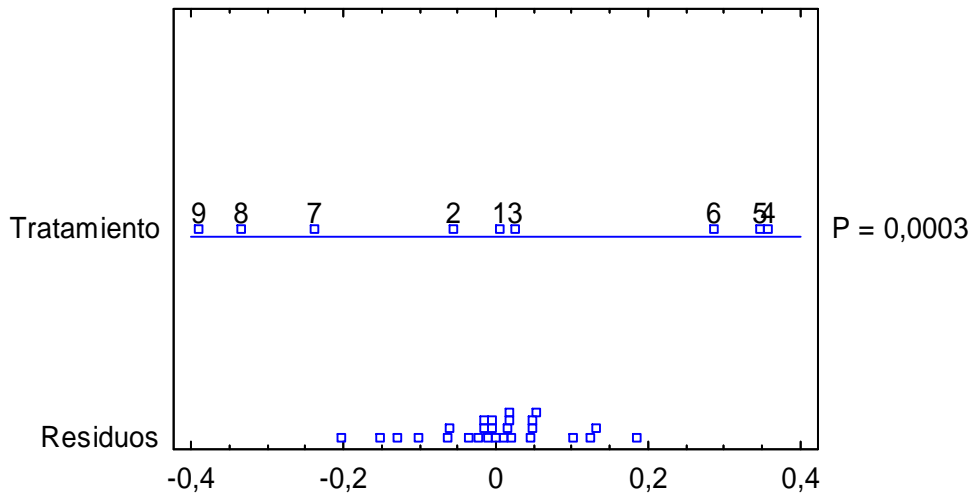
El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 14 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 5 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Duncan. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

Dispersión por Código de Nivel



ANOVA Gráfico para Inactivación



1.3 Análisis estadístico para *Listeria monocytogenes*

ANOVA Simple - Inactivación por Tratamiento

Variable dependiente: Inactivación

Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 27

Número de niveles: 9

El StatAdvisor

Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de un factor para Inactivación. Construye varias pruebas y gráficas para comparar los valores medios de Inactivación para los 9 diferentes niveles de Tratamiento. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Si le preocupa la presencia de valores atípicos, puede elegir la Prueba de Kruskal-Wallis la cual compara las medianas en lugar de las medias. Las diferentes gráficas le ayudarán a juzgar la significancia práctica de los resultados, así como le permitirán buscar posibles violaciones de los supuestos subyacentes en el análisis de varianza.

Tabla ANOVA para Inactivación por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0371991	8	0,00464989	0,23	0,9790
Intra grupos	0,357381	18	0,0198545		
Total (Corr.)	0,39458	26			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de Inactivación en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 0,234198, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Inactivación entre un nivel de Tratamiento y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para Inactivación por Tratamiento

Método: 95,0 porcentaje Duncan

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
3	3	0,330436	X
2	3	0,367859	X
1	3	0,385576	X
7	3	0,395711	X
8	3	0,398051	X
9	3	0,430641	X
4	3	0,440326	X
6	3	0,443731	X
5	3	0,444378	X

Contraste	Sig.	Diferencia
1 - 2		0,017717
1 - 3		0,05514
1 - 4		-0,0547503
1 - 5		-0,0588021
1 - 6		-0,0581558
1 - 7		-0,0101356
1 - 8		-0,0124758
1 - 9		-0,0450657
2 - 3		0,037423
2 - 4		-0,0724673
2 - 5		-0,0765191
2 - 6		-0,0758728
2 - 7		-0,0278526
2 - 8		-0,0301928

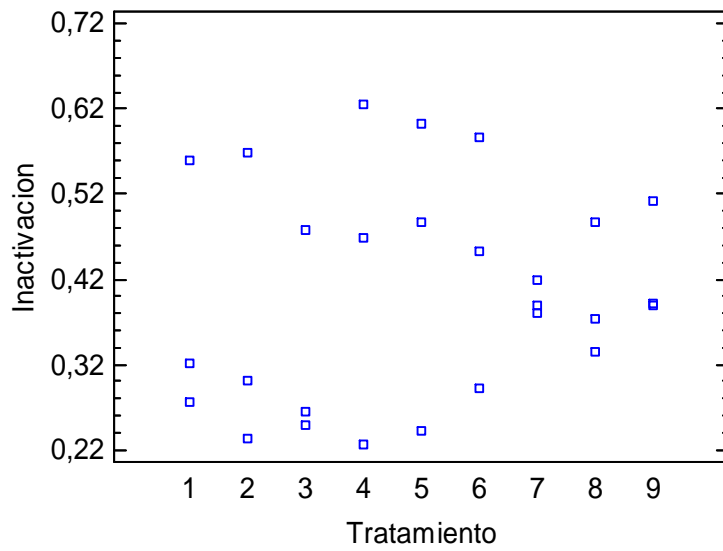
2 - 9		-0,0627827
3 - 4		-0,10989
3 - 5		-0,113942
3 - 6		-0,113296
3 - 7		-0,0652757
3 - 8		-0,0676158
3 - 9		-0,100206
4 - 5		-0,00405174
4 - 6		-0,00340548
4 - 7		0,0446147
4 - 8		0,0422746
4 - 9		0,00968464
5 - 6		0,000646258
5 - 7		0,0486665
5 - 8		0,0463263
5 - 9		0,0137364
6 - 7		0,0480202
6 - 8		0,04568
6 - 9		0,0130901
7 - 8		-0,00234017
7 - 9		-0,0349301
8 - 9		-0,0325899

* indica una diferencia significativa.

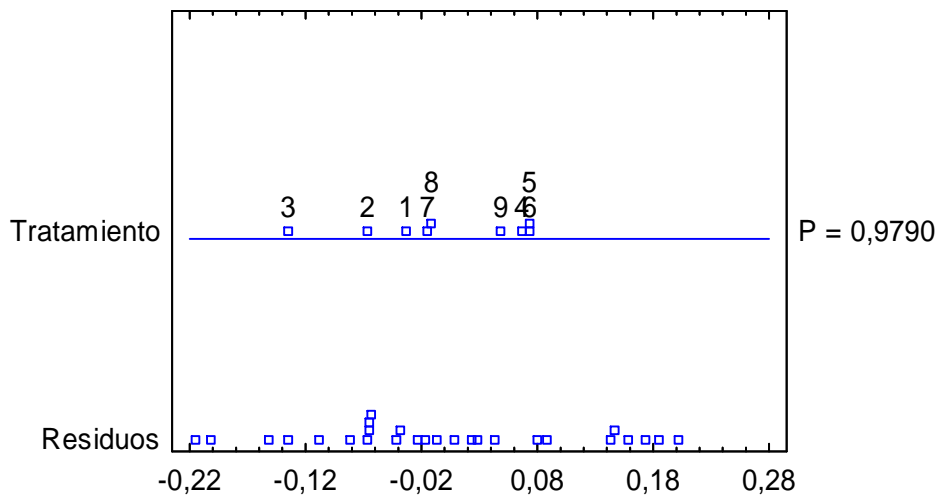
El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. No hay diferencias estadísticamente significativas entre cualquier par de medias, con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se ha identificado un grupo homogéneo, según la alineación de las X's en columna. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Duncan. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

Dispersión por Código de Nivel



ANOVA Gráfico para Inactivacion



1.4 Análisis estadístico para *Bacillus cereus*

ANOVA Simple - Inactivación por Tratamiento

Variable dependiente: Inactivación

Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 27

Número de niveles: 9

El StatAdvisor

Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de un factor para Inactivación. Construye varias pruebas y gráficas para comparar los valores medios de Inactivación para los 9 diferentes niveles de Tratamiento. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Si le preocupa la presencia de valores atípicos, puede elegir la Prueba de Kruskal-Wallis la cual compara las medianas en lugar de las medias. Las diferentes gráficas le ayudarán a juzgar la significancia práctica de los resultados, así como le permitirán buscar posibles violaciones de los supuestos subyacentes en el análisis de varianza.

Tabla ANOVA para Inactivación por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,669102	8	0,0836378	20,38	0,0000
Intra grupos	0,0738813	18	0,00410452		
Total (Corr.)	0,742984	26			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de Inactivación en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 20,377, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Inactivación entre un nivel de Tratamiento y otro, con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

Pruebas de Múltiple Rangos para Inactivación por Tratamiento

Método: 95,0 porcentaje Duncan

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
7	3	0,260231	X
8	3	0,289414	X
9	3	0,29473	X
1	3	0,502481	X
2	3	0,529895	XX
3	3	0,549768	XX
6	3	0,622839	XX
4	3	0,669287	X
5	3	0,68177	X

Contraste	Sig.	Diferencia
1 - 2		-0,0274148
1 - 3		-0,0472876
1 - 4	*	-0,166806
1 - 5	*	-0,179289
1 - 6	*	-0,120359
1 - 7	*	0,242249
1 - 8	*	0,213067
1 - 9	*	0,207751
2 - 3		-0,0198727
2 - 4	*	-0,139391
2 - 5	*	-0,151875
2 - 6		-0,092944

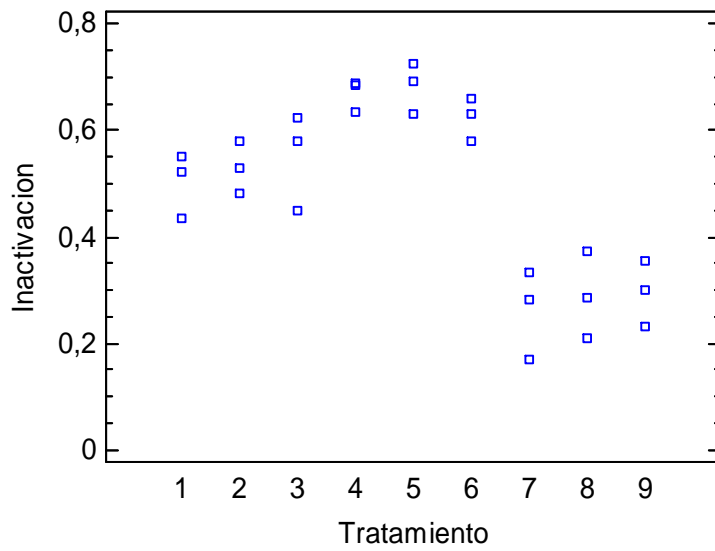
2 - 7	*	0,269664
2 - 8	*	0,240482
2 - 9	*	0,235166
3 - 4	*	-0,119519
3 - 5	*	-0,132002
3 - 6		-0,0730713
3 - 7	*	0,289537
3 - 8	*	0,260355
3 - 9	*	0,255038
4 - 5		-0,0124833
4 - 6		0,0464472
4 - 7	*	0,409055
4 - 8	*	0,379873
4 - 9	*	0,374557
5 - 6		0,0589306
5 - 7	*	0,421539
5 - 8	*	0,392356
5 - 9	*	0,38704
6 - 7	*	0,362608
6 - 8	*	0,333426
6 - 9	*	0,32811
7 - 8		-0,0291822
7 - 9		-0,0344984
8 - 9		-0,00531627

* indica una diferencia significativa.

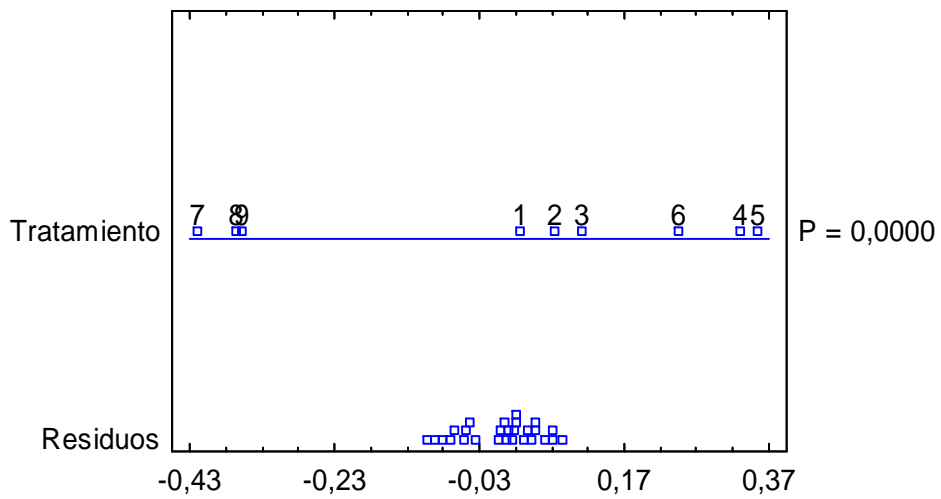
El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 25 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 4 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Duncan. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

Dispersión por Código de Nivel



ANOVA Gráfico para Inactivacion



1.5 Análisis estadístico para *Saccharomyces cerevisiae*

ANOVA Simple - Inactivación por Tratamiento

Variable dependiente: Inactivación

Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 27

Número de niveles: 9

El StatAdvisor

Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de un factor para Inactivación. Construye varias pruebas y gráficas para comparar los valores medios de Inactivación para los 9 diferentes niveles de Tratamiento. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Si le preocupa la presencia de valores atípicos, puede elegir la Prueba de Kruskal-Wallis la cual compara las medianas en lugar de las medias. Las diferentes gráficas le ayudarán a juzgar la significancia práctica de los resultados, así como le permitirán buscar posibles violaciones de los supuestos subyacentes en el análisis de varianza.

Tabla ANOVA para Inactivación por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,188974	8	0,0236217	25,55	0,0000
Intra grupos	0,0166444	18	0,000924689		
Total (Corr.)	0,205618	26			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de Inactivación en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 25,5456, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Inactivación entre un nivel de Tratamiento y otro, con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

Pruebas de Múltiple Rangos para Inactivación por Tratamiento

Método: 95,0 porcentaje Duncan

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
7	3	0,155131	X
8	3	0,170355	XX
9	3	0,19858	XX
1	3	0,207239	XX
2	3	0,209759	XX
3	3	0,217877	X
6	3	0,361194	X
4	3	0,363036	X
5	3	0,374052	X

Contraste	Sig.	Diferencia
1 - 2		-0,00252087
1 - 3		-0,0106381
1 - 4	*	-0,155797
1 - 5	*	-0,166813
1 - 6	*	-0,153955
1 - 7		0,0521075
1 - 8		0,0368833
1 - 9		0,00865909
2 - 3		-0,00811722
2 - 4	*	-0,153276
2 - 5	*	-0,164292
2 - 6	*	-0,151434

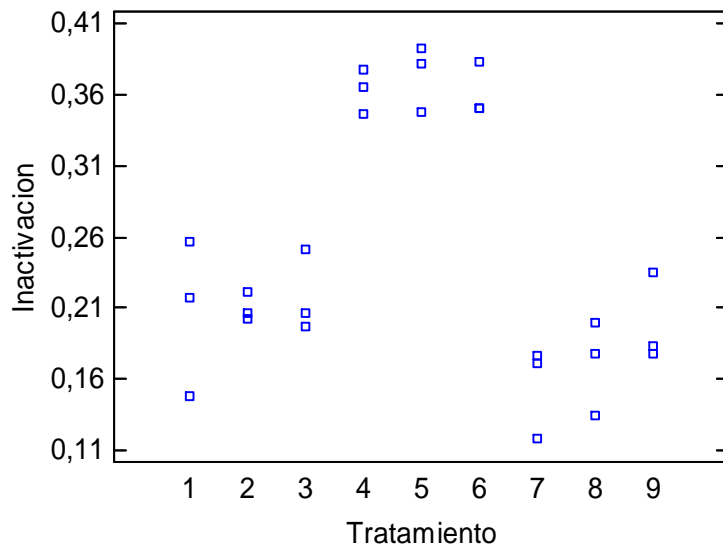
2 - 7		0,0546284
2 - 8		0,0394042
2 - 9		0,01118
3 - 4	*	-0,145159
3 - 5	*	-0,156175
3 - 6	*	-0,143317
3 - 7	*	0,0627456
3 - 8		0,0475214
3 - 9		0,0192972
4 - 5		-0,011016
4 - 6		0,00184205
4 - 7	*	0,207905
4 - 8	*	0,19268
4 - 9	*	0,164456
5 - 6		0,012858
5 - 7	*	0,218921
5 - 8	*	0,203696
5 - 9	*	0,175472
6 - 7	*	0,206063
6 - 8	*	0,190838
6 - 9	*	0,162614
7 - 8		-0,0152241
7 - 9		-0,0434484
8 - 9		-0,0282242

* indica una diferencia significativa.

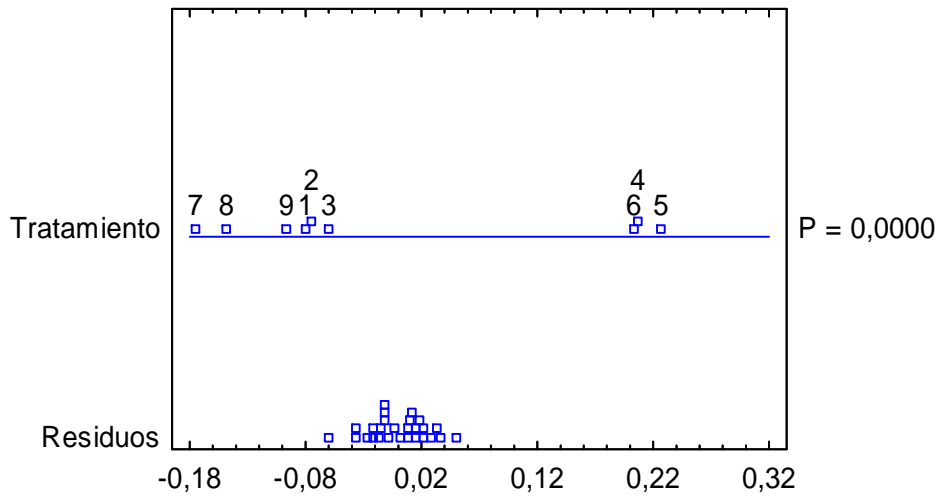
El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 19 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Duncan. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

Dispersión por Código de Nivel



ANOVA Gráfico para Inactivacion



1.6 Analisis estadístico para Densidad de población en *P. fluorescens*

ANOVA Simple - Inactivación por Tratamiento

Variable dependiente: Inactivación

Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 12

Número de niveles: 4

El StatAdvisor

Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de un factor para Inactivación. Construye varias pruebas y gráficas para comparar los valores medios de Inactivación para los 4 diferentes niveles de Tratamiento. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Si le preocupa la presencia de valores atípicos, puede elegir la Prueba de Kruskal-Wallis la cual compara las medianas en lugar de las medias. Las diferentes gráficas le ayudarán a juzgar la significancia práctica de los resultados, así como le permitirán buscar posibles violaciones de los supuestos subyacentes en el análisis de varianza.

Tabla ANOVA para Inactivación por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,41444	3	0,47148	14,72	0,0013
Intra grupos	0,25628	8	0,032035		
Total (Corr.)	1,67072	11			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de Inactivación en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 14,7176, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Inactivación entre un nivel de Tratamiento y otro, con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

Pruebas de Múltiple Rangos para Inactivación por Tratamiento

Método: 95,0 porcentaje Duncan

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1	3	0,53716	X
2	3	0,628339	X
3	3	1,19387	X
4	3	1,32602	X

Contraste	Sig.	Diferencia
1 - 2		-0,0911785
1 - 3	*	-0,65671
1 - 4	*	-0,788857
2 - 3	*	-0,565531
2 - 4	*	-0,697678
3 - 4		-0,132147

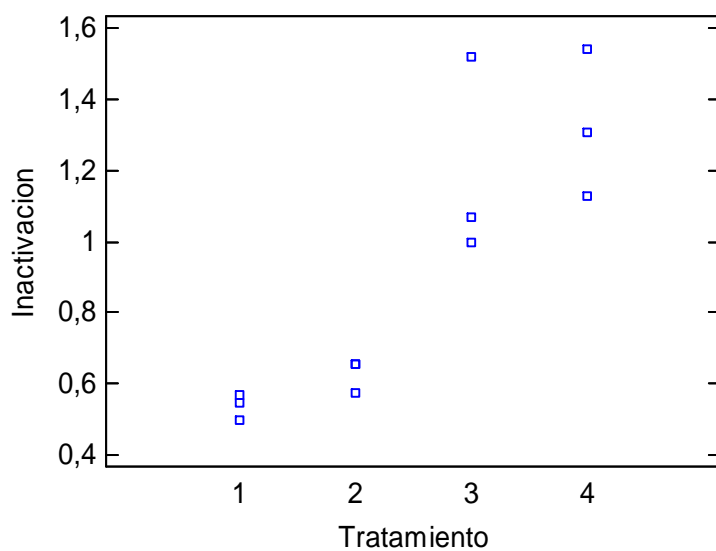
* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 4 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el

procedimiento de comparación múltiple de Duncan. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

Dispersión por Código de Nivel



ANOVA Gráfico para Inactivacion

