

**EVALUACIÓN DE ÁCIDO PERACÉTICO E HIPOCLORITO DE SODIO SOBRE CEPAS DE
Salmonella spp., INOCULADAS EN AGUA DE CHILLER**



JOHANNA LIZETH MONCADA BARRAGÁN

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial para optar al título de

BACTERIÓLOGA Y MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BACTERIOLOGÍA

BOGOTÁ, D.C. 2012

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución N° 13 de Julio de 1946.

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

AGRADECIMIENTOS

Nadie llega solo a la meta, el camino se enriquece por la compañía y se complementa con la guía de Dios...

Dedico este trabajo a mis padres y hermano por llenarme de ánimo y ser mi ejemplo diario de dedicación, por apoyarme y darme la oportunidad de seguir mis metas, porque con su amor, sus consejos y compañía tuve la fuerza para continuar cada día.

Agradezco a la Doctora Ana Karina Carrascal por el apoyo, la paciencia, la confianza brindada y sobre todo por sus valiosas enseñanzas profesionales y personales.

Al Doctor Carlos Daza por su valiosa colaboración y por compartir sus conocimientos enriqueciendo este trabajo.

A la Doctora Aura Marina Pedroza y a Angie Hernández por permitir vincularme a este proyecto, por su asesoría y aportes.

A Irunu La Torre quien con su colaboración me permitió sacar adelante parte del estudio.

A mi familia fuente inigualable de buenas energías y ejemplo de constancia y amor.

A Leonardo por llenarme de ánimo cuando las fuerzas se agotaban, por su amor, por ser mi apoyo, mi fuente de paciencia y de sonrisas.

A Lina, Diana, Natalia, María Paula y a mis compañeros de laboratorio de microbiología de alimentos, microbiología ambiental y química de materiales por su amistad, colaboración y apoyo, por creer en mí y enseñarme a hacerlo.

A la Pontificia Universidad Javeriana por ser una fuente inagotable de conocimiento y de oportunidades.

Y a todos aquellos que me han acompañado en este proceso y que de alguna manera enriquecieron mi camino.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	14
INTRODUCCIÓN	14
1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	15
2. JUSTIFICACIÓN	16
3. MARCO TEORICO	17
3.1 <i>Salmonella</i> spp.	17
3.1.1 Características generales del genero <i>Salmonella</i>	17
3.1.2 Sobrevivencia e inactivación.....	18
3.1.3 Fuentes y transmisión	18
3.2 Salmonelosis.....	18
3.2.1 Generalidades	18
3.2.2 Patogénesis	19
3.2.3 Epidemiología.....	19
3.3 Consumo de pollo en Colombia.....	20
3.4 Plantas de beneficio avícola en Colombia	20
3.4 Proceso de beneficio avícola	20
3.5 Desinfectantes	22
4. OBJETIVOS	22
4.1 Objetivo general	22
4.2 Objetivos Específicos	22
5. HIPÓTESIS	23
6. MATERIALES Y METODOS	23
6.1 Manejo de cepas de referencia.....	23
6.1.1 Preservación y reactivación de las cepas:.....	23
6.2 Descripción y caracterización del agua objeto de estudio.....	24
6.2.1 Descripción del agua.....	24
6.2.2 Caracterización del agua:.....	24
6.3 Selección y evaluación de tiempos de contacto y concentraciones de desinfectantes	24

6.4 Cuantificación de cloro	24
6.5 Determinación de la actividad bactericida del hipoclorito de sodio y el ácido peracético sobre cepas de <i>Salmonella</i> spp.	25
6.5.1 Preparación del inóculo	25
6.5.2 Curvas cinéticas de inactivación	25
6.6 Determinación de las constantes de inactivación	26
6.7 Análisis estadístico	26
7. RESULTADOS.....	26
7.1 Caracterización del agua de enfriamiento.....	26
7.1.1 Determinación de parámetros físico-químicos y microbiológicos	26
7.2 Cuantificación de cloro residual	27
7.3 Cinéticas de inactivación	28
8. DISCUSIÓN	31
8. CONCLUSIONES.....	35
9. RECOMENDACIONES	36
10. LITERATURA CITADA.....	36
ANEXOS	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de beneficio avícola en Colombia (Fuente: propia)	21
Figura 2. Cuantificación de Cloro residual en agua de enfriamiento como $\text{Cl}_2 \text{ L}^{-1}$	27
Figura 3. Curvas cinéticas de inactivación para <i>S. Enteritidis</i> y <i>S. Typhimurium</i> con ácido peracético a concentración de 80, 160 y 200 mgL^{-1} en agua de enfriamiento a $10 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$..	28
Figura 4. Curvas cinéticas de inactivación para <i>S. Enteritidis</i> y <i>S. Typhimurium</i> con hipoclorito de sodio a concentración de 20, 100 y 200 mgL^{-1} en agua de enfriamiento a $10 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$	29
Figura 5. Curva cinética de inactivación para <i>S. Enteritidis</i> y <i>S. Typhimurium</i> con hipoclorito de sodio acidificado con ácido peracético a concentración de 20 mgL^{-1} y pH aprox. 5,6 en agua de enfriamiento a $10 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$	30
Figura 6. Agua de enfriamiento recolectada (Fuente: Propia).....	44
Figura 7. Cuantificación de cloro residual. Método yodométrico (Fuente: propia).....	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones de crecimiento de <i>Salmonella</i> spp.....	17
Tabla 2. Clasificación de <i>Salmonella enterica</i>	17
Tabla 3. Pruebas físico- químicas y microbiológicas	24
Tabla 4. Análisis físico químicos y microbiológicos. Para el agua de enfriamiento	27
Tabla 5. Constantes cinéticas y coeficiente de regresión para la inactivación de <i>S. Enteritidis</i> y <i>S. Typhimurium</i>	30

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Características de los desinfectantes usados en aguas de enfriamiento	43
Anexo 2. Variables de estudio	44
Anexo 3. Agua de enfriamiento por inmersión	44
Anexo 6. Análisis estadístico	50

RESUMEN

Se evaluó la efectividad como desinfectante del hipoclorito de sodio y del ácido peracético sobre cepas de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* inoculadas en aguas de enfriamiento de industrias avícolas, las concentraciones evaluadas fueron 20, 100 y 200 mgL⁻¹ y 80, 160 y 200 mgL⁻¹, respectivamente. Adicionalmente, se realizó un ensayo evaluando su efecto sinérgico, el procedimiento se llevó a cabo teniendo en cuenta lo estipulado por la Norma Técnica Colombiana 5150 con algunas modificaciones, empleando como medio de contacto agua de enfriamiento de industrias avícolas esterilizada y previamente caracterizada, así mismo, se cuantificó el cloro libre residual empleando el método yodométrico. Para el análisis de los datos se utilizó como herramienta estadística ANOVA. La adición de ácido peracético al agua inactivó máximo 0,92 ± 0,07 unidades logarítmicas (14,7%) y la adición de hipoclorito de sodio a 20 mgL⁻¹ inactivó máximo 0,25 ± 0,1 unidades logarítmicas (3,7%) de *Salmonella*. Por su parte, el tratamiento con 200 mgL⁻¹ de hipoclorito de sodio resulta significativamente más eficiente ($p < 0,0001$) que los otros, sin embargo, esta concentración no se encuentra permitida por los entes competentes. La adición de hipoclorito de sodio a 20 mgL⁻¹ acidificado con 150 mgL⁻¹ de ácido peracético (pH 5,6 ± 0,1) logró una disminución mayor a 5 Unidades logarítmicas equivalente al 99,99% de la población transcurrido 1 min de contacto, resultado que se mantuvo hasta el tiempo máximo evaluado, para ambos casos se demostró que no existen diferencias significativas ($p = 0,129$). Para esta concentración, la cuantificación de cloro residual mostró al minuto 65 una reducción del 69,1% de la concentración inicial.

Palabras clave: Beneficio avícola, Enfriamiento por inmersión, Agua de chiller, *Salmonella* spp., inactivación.

INTRODUCCIÓN

A lo largo del proceso de beneficio avícola se promueve la inclusión de tecnologías de barrera, con el fin de reducir la carga microbiana inicial del ave y minimizar el riesgo inherente al producto como fuente de contaminación en la industria, este tipo de procesos reduce la presencia de microorganismos asociados al sacrificio incluyendo bacterias patógenas como *Salmonella* spp. o *Campylobacter jejuni*, agentes relacionados a toxiinfecciones alimentarias de alto impacto en salud pública y ampliamente asociadas a productos avícolas (1, 2). Se calcula que en el mundo se presentan anualmente cerca de 1300 millones de casos de salmonelosis, con aproximadamente 3 millones de muertes (3); según reportes del centro para el control de enfermedades (CDC) únicamente en Estados Unidos las toxiinfecciones causadas por *Salmonellas* no tifoideas generan al año 1 millón de casos, representando el 11% de las enfermedades transmitidas por alimentos (4). Actualmente, *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* son las serovariedades asociadas a brotes más comunes en países desarrollados (3) y según reportes del sistema de vigilancia epidemiológica, SIVIGILA, también son las principales cepas asociadas en Colombia (5).

Es por esto que el control de *Salmonella* spp. en las plantas de beneficio avícola ocupa actualmente un capítulo importante en los estándares de reducción de patógenos (6), disminuyendo el riesgo de contaminación con este tipo de agentes biológicos que puedan estar presentes potencialmente en el alimento generando un daño adverso a la salud.

Tras pasar por el sacrificio, escaldado, desplume, flameado, evisceración y lavado, la carcasa del ave entra en un proceso de enfriamiento o chiller, en el que se busca disminuir la temperatura de las canales y reducir la carga bacteriana mediante la inmersión del ave en agua potable fría en constante agitación que recircula, en este proceso, se permite la adición de desinfectantes al agua, sin embargo, la concentración debe estar controlada y los agentes químicos deben ser aceptados por las entidades competentes, de manera que no afecten las características físico-químicas ni organolépticas del producto final (6). Los desinfectantes más empleados en este proceso son: hipoclorito de sodio y clorito sódico acidificado con ácido peracético, agentes químicos cuya efectividad puede verse afectada por factores externos (7).

En este escenario, el presente trabajo busca evaluar la efectividad de dos de los principales agentes químicos empleados en el proceso de desinfección, estableciendo si su adición al agua de enfriamiento favorece o no la disminución de la carga bacteriana, específicamente de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* en el agua de enfriamiento, evitando la contaminación cruzada al disminuir el riesgo microbiológico y la generación de más casos de toxiinfecciones asociadas a este tipo de agentes. El procedimiento para evaluar la efectividad de los desinfectantes se llevó a cabo de acuerdo a la NTC 5150, aplicando las modificaciones correspondientes al ensayo según la cepa a emplear y sin empleo de neutralizante (8).

1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

El proceso de beneficio consiste en la transformación de un animal vivo en una canal procesada y en sus menudencias comestibles y no comestibles, con el fin de disponerlo para su comercialización (6, 9), este proceso consta de varias etapas de las cuales el enfriamiento hace parte fundamental. Según lo establece la resolución 4287 de 2007 para plantas de beneficio avícola, el enfriador o chiller es un equipo empleado para bajar la temperatura de las canales y los productos cárnicos hasta máximo 4 °C en el centro de la masa muscular, al sumergir la carcasa del ave en una tina de agitación con agua potable fría que recircula evitando el deterioro microbiológico del producto (6). Este proceso requiere de un control microbiológico, para ello se emplean desinfectantes que aseguran la calidad microbiológica del tanque; dentro de los desinfectantes más empleados se encuentran el hipoclorito de sodio y el clorito sódico acidificado con ácido peracético.

Aunque se establezcan las condiciones del sistema de enfriamiento, se hace necesario realizar un control en el área, ya que el volumen, cambio o reposición del agua, el caudal y

la temperatura no se encuentran regulados por la legislación colombiana, lo que hace que el proceso sea ampliamente cuestionado al generar condiciones que pueden promover el desarrollo de bacterias patógenas como *Salmonella* spp o *Campylobacter jejuni* en el agua de enfriamiento, favoreciendo su transmisión a otras carcasas mediante contaminación cruzada (10).

Pese a que en Colombia las plantas de beneficio avícola se encuentran en la obligación de ejecutar un estándar de cumplimiento para *Salmonella* spp, tal como lo establece el artículo 48 de la resolución 4287 de 2007 (6), la presencia de éste microorganismo continúa siendo un problema, según lo reporta el sistema SIVIGILA en donde se registran brotes asociados al consumo de pollo (5). Se estima que el 90-95 % de casos de salmonelosis están asociados a consumo de alimentos contaminados, en el mundo se presentan al año 1.300 millones de casos de este tipo de toxiinfecciones y aproximadamente 3 millones de muertes, la tasa de hospitalización puede variar de 20 a 40 %, según el serovar y la resistencia a antibióticos (5). Teniendo en cuenta que el pollo es reconocido como el principal reservorio de *Salmonella* spp., y que la carne proveniente de animales contaminados es un vehículo del microorganismo, se ha establecido que el consumo de estos productos avícolas se presenta como un riesgo para la población.

Ya que la presencia de *Salmonella* spp. en el pollo procesado puede representar un riesgo de salud pública, surge la necesidad de analizar los métodos de desinfección llevados a cabo durante el proceso de beneficio, determinando la efectividad de los mismos al establecer si disminuyen o no el riesgo que implica el uso excesivo e inadecuado del agua.

2. JUSTIFICACIÓN

En las plantas de beneficio avícola, el proceso de desinfección pretende minimizar la contaminación a lo largo del proceso, sin embargo, las condiciones de recirculación a las que se somete el agua empleada en el chiller, la hace un punto que favorece la presencia de microorganismos patógenos y promueve la contaminación cruzada aumentando el riesgo de brotes alimentarios en la población consumidora de este tipo de productos.

Dentro de este panorama, en el presente trabajo, se evaluaron dos de los desinfectantes más empleados en la fase de chiller de la industria avícola (hipoclorito de sodio y ácido peracético) a las concentraciones aprobadas por los entes reguladores internacionales, evaluando las condiciones para llevar a cabo un proceso de desinfección eficiente, estableciendo la calidad microbiológica del líquido sustentado en la estabilidad de la carga bacteriana y del producto evaluado, y así mismo, promoviendo la seguridad del producto al disminuir el desarrollo de Salmonellas no tifoideas, específicamente *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* lo cual puede minimizar el riesgo de toxiinfecciones asociadas a este tipo de agentes.

3. MARCO TEORICO

3.1 *Salmonella* spp.

3.1.1 Características generales del genero *Salmonella*

Los microorganismos pertenecientes a este género son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Su tamaño oscila de 0,3 a 1 µm x 1,0 a 6,0 µm, son quimiorganotótrofos y se desarrollan óptimamente a 37 °C, suelen ser mótils por flagelos peritricos uniformemente distribuidos, aunque pueden existir variantes no flageladas como *S. pullorum* y *S. gallinarum* (2, 11). Poseen un metabolismo oxidativo y fermentativo, catalizan glucosa y otros carbohidratos produciendo ácido y gas, son oxidasa negativos y catalasa positivos. Las condiciones de crecimiento de *Salmonella* spp., se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de crecimiento de *Salmonella* spp.

Característica	Mínima	Máxima	Óptima
Temperatura (°C) ¹	5,3 ²	46,96	35-42
pH ³	4,5	9,5	6,5-7,5
Actividad de agua (a _w)	0,94	0,99	0,99

¹ Esta característica depende del medio de cultivo donde se inocula (2).

² A temperaturas inferiores a 5,3 °C se ha evidenciado presencia del microorganismo, sin embargo bajo estas condiciones no es posible su multiplicación (5).

³ (3, 7, 12)

Actualmente se conocen más de 2600 serovares de *Salmonella* (13), considerando dos especies para este género: *Salmonella bongori* y *Salmonella entérica*. Esta última se subdivide en seis subespecies como se describe en la tabla 2:

Tabla 2. Clasificación de *Salmonella enterica*

<i>Salmonella enterica</i> ¹	<i>S. enterica</i> subsp <i>entérica</i> ²⁻³ (Subespecies I)
	<i>S. enterica</i> subsp <i>salamee</i> (Subespecies II)
	<i>S. enterica</i> subsp <i>arizoanae</i> (Subespecies IIIa)
	<i>S. enterica</i> subsp <i>diarizoanae</i> (Subespecies IIIb)
	<i>S. enterica</i> subsp <i>houtenae</i> (Subespecies IV)
	<i>S. enterica</i> subsp <i>indica</i> (Subespecies VI)

Fuente: (5)

¹ (3, 12)

²⁻³ Dada la complejidad de la denominación se ha permitido designar las cepas con el nombre del serotipo, de modo que *Salmonella entérica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ó *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis serán referenciadas como *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Enteritidis respectivamente (14).

Los diferentes serovares de *Salmonella* suelen infectar diversos huéspedes, excepto *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi A, B y C consideradas los agentes causales de las denominadas fiebres entéricas, patología desencadenada por ingestión de alimentos o agua contaminada (15). Este tipo de serovares se ha adaptado para desarrollarse únicamente en el ser humano (16), por lo que en su ecología difieren sustancialmente de otras, consideradas variedades zoonóticas de *Salmonella*, muchas de las cuales se han llegado a describir como agentes etiológicos de salmonelosis no tifoidea.

3.1.2 Sobrevivencia e inactivación

Salmonella se desarrolla óptimamente en las superficies de industrias de alimentos y su capacidad de adaptarse a los cambios ambientales favorece su sobrevivencia (15). Puede permanecer en refrigeración en alimentos que contienen alto contenido de grasa (2). Así mismo, *Salmonella* es sensible al calor y muere a temperatura de 70 °C o superiores, la temperatura más baja a la que se ha registrado su crecimiento es de 5,3 °C, mientras que su completa inhibición se logra a pH inferiores a 4 (17).

3.1.3 Fuentes y transmisión

En algunos casos, las *Salmonellas* no tifoideas, son patógenos de animales inferiores como aves de corral, vacas, cerdos, aves, ovejas, lagartos y víboras, organismos que se han constituido como una fuente importante de salmonelosis no tifoidea para los seres humanos (11), sin embargo, se reporta mayoritariamente al pollo como uno de los principales vehículos asociados a la transmisión de *Salmonella* no tifoidea (18, 19). Pese a que en la industria avícola se ejerce un control sobre las aves seleccionadas para consumo humano el riesgo es inherente al producto dado que el pollo es una de las principales fuentes de *Salmonella* (20). Se han reportado como otras fuentes de infección, carne de cerdo, res y en menor grado pescado; recientemente, se han descrito brotes asociados al consumo de frutas y vegetales contaminados, nueces y alimentos secos (13, 21).

3.2 Salmonelosis

3.2.1 Generalidades

La salmonelosis se manifiesta en humanos como una gastroenteritis o enterocolitis aguda de comienzo repentino, los síntomas aparecen de 6 a 24 h después de la ingestión del alimento o agua contaminados. El cuadro clínico puede durar de 2 a 3 días e incluye cefalea, dolor abdominal, náuseas, escalofríos, fiebre, vómito y diarrea que consecuentemente genera deshidratación, especialmente en lactantes, niños y ancianos (22). La patología no suele ser mortal, excepto en casos de pacientes inmunosuprimidos o en los extremos de la vida; se ha reportado, que la tasa de mortalidad media es del 4,1 %, la cual varía desde el 5,8 % para pacientes durante el primer año de vida, al 2 % en personas entre 1 y 50 años, y 15 % en las de más de 50 años (17). Pese a las características favorables de la enfermedad, la morbilidad y los costos relacionados a diagnóstico, hospitalizaciones, tratamiento y ausencia laboral a causa de este tipo de enfermedades suelen ser elevados (4). La mayoría de personas se recuperan sin tratamiento antibiótico, ya que lo único que se recomienda en estos casos es el consumo

de sales de rehidratación oral para compensar la pérdida excesiva de agua y electrolitos debido principalmente a la diarrea (7,21). Para casos en los que la enfermedad no se presenta como auto limitada se implementa la dosificación de antibióticos (5), se suelen formular ciprofloxacina, cotrimoxazol y amoxicilina, sin embargo, la presencia de cepas multirresistentes hacen aún más difícil el tratamiento (23). En las últimas dos décadas, se ha reportado la resistencia adquirida a antibióticos de una variante multirresistente de *S. Typhimurium* denominada DT104 frente a ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfonamidas, tetraciclinas y recientemente a fluoroquinonas y trimetropim, este patógeno emergente de carácter pandémico se caracteriza por poseer resistencia mediada por plásmidos, característica que favorece su fácil diseminación y supervivencia en el organismo hospedero (5, 11).

La dosis infecciosa de *Salmonella* difiere según la cepa, el serovar, las condiciones ambientales y la susceptibilidad del huésped, este último factor incluye la edad, el estado del sistema inmune y las condiciones del tracto digestivo. Se ha reportado que la dosis mínima infecciosa de *Salmonella* puede variar de 10^1 a 10^9 UFCg⁻¹, sin embargo, varios reportes indican la posibilidad de infección con una dosis de 1 a 10 células, esto depende del alimento ingerido, la cantidad, el tratamiento pre consumo y la susceptibilidad del consumidor (3, 7).

3.2.2 Patogénesis

El microorganismo penetra en el hospedero al ser ingerido, al llegar al intestino *Salmonella* se adhiere a la mucosa y activa el mecanismo de patogénesis denominado patrón secretor, generando consecuentemente diarrea líquida o acuosa sin invasión. Al aumentar la colonización se altera la flora intestinal. La interacción con las células del epitelio intestinal en el íleon ocurre en la lámina propia, donde generan edema, inflamación aguda y cambios celulares. Al encontrarse en la mucosa promueve la activación del adenil ciclasa, aumentando la producción de fluidos (7). Las personas que padecen este tipo de gastroenteritis presentan una recuperación lenta a lo largo de varios meses hasta que sus hábitos intestinales retornan a la normalidad (24,25)

3.2.3 Epidemiología

Los casos de gastroenteritis causadas por Salmonellas no tíficas han aumentado; se ha calculado que en el mundo anualmente se presentan cerca de 1300 millones de casos de salmonelosis, con aproximadamente 3 millones de muertes, y solo en Estados Unidos se reportan anualmente de 1 a 2 millones de casos de gastroenteritis causada por salmonellas no tifoideas representando el 11 % de las enfermedades transmitidas por alimentos, cerca de 19.000 casos resultan en hospitalizaciones y 400 a 500 terminan en muerte (3, 4). En Colombia, según datos reportados por el grupo de microbiología del INS, para el año 2010, se reportó una tasa de 1,77 casos por cada 100.000 habitantes con una incidencia de salmonelosis de 759 casos para el mismo año (5). Sin embargo, es difícil determinar una cifra real de casos de salmonelosis ya que la notificación de estos es

deficiente, y solo son reportados los grandes brotes, se ha evidenciado que en Asia, África y América central y del sur solo 1 de cada 10 casos son reportados (3).

El incremento en la prevalencia de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* en regiones como el noroccidente de Europa, Estados Unidos y Reino Unido (3), es consistente con los datos reportados en Colombia por parte del grupo de microbiología del INS quienes reportaron estos serovares para el periodo 2005-2008 como las cepas asociadas mayoritariamente a brotes alimentarios en el país, teniendo en cuenta que *S. Typhimurium* fue el serovar involucrado con mayor frecuencia (18).

3.3 Consumo de pollo en Colombia

Para el año 2011 el departamento de estudios económicos de la federación nacional de avicultores de Colombia (FENAVI) estimó el consumo per cápita de pollo por habitante en 23,8 kg anuales (26). Valor que comparado con el consumo anual de países como Estados Unidos (43kg), Brasil (31 kg) y México (23 kg) resulta aun relativamente bajo (27).

3.4 Plantas de beneficio avícola en Colombia

En cuanto a la producción avícola en América, Colombia ocupa el sexto lugar precedido por Estados Unidos, Brasil, México y Canadá. La industria avícola en Colombia según reportes del informe de gestión del 2008 publicado por el INVIMA está compuesta por 167 plantas de beneficio de aves de corral inscritas oficialmente según la resolución 1877 del 2008 y 88 plantas de desprese, con capacidad de beneficio total de 1.486.440 aves (5, 28). Según FENAVI, para el año 2011 la producción de pollo fue de 1.074.987 toneladas, valor que había superado aproximadamente en un 21 % la producción obtenida en el 2006 (29).

3.4 Proceso de beneficio avícola

En Colombia, los requisitos sanitarios y de inocuidad de la carne y productos cárnicos comestibles de aves de corral y las disposiciones para su beneficio se reglamentan por la resolución 4287 de 2007 del Ministerio de Protección social, Las diferentes etapas del proceso de beneficio avícola se resumen en la figura 1.

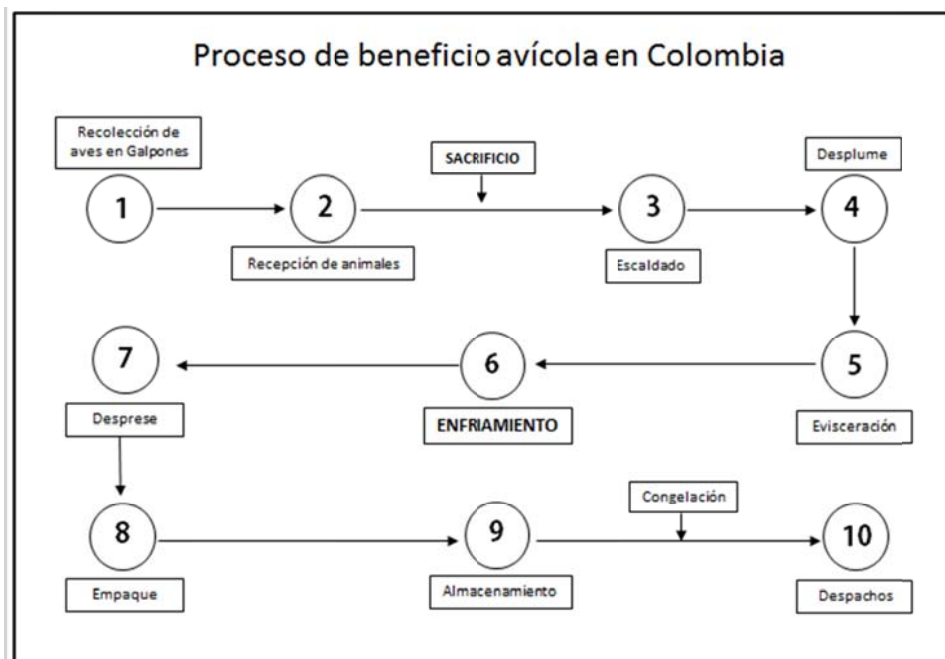


Figura 1. Proceso de beneficio avícola en Colombia (Fuente: propia)

Tras pasar por el sacrificio, escaldado, desplume, flameado, evisceración y lavado, todas las carcasas de aves evisceradas entran en un proceso denominado enfriamiento o chiller, el cual según las características de la planta puede llevarse a cabo por exposición de las carcasas a aire frío o por inmersión de las mismas en un sistema lineal de agitación con agua potable con adición de hielo, este último mecanismo es empleado en las plantas de beneficio colombianas. El enfriamiento o chiller se define en la resolución 4287 de 2007 como “un equipo empleado para bajar la temperatura de las canales evitando su deterioro microbiológico” (6), este favorece la reducción de la carga microbiana, cierra los poros de las aves evitando la pérdida de agua y según lo reporta Galarza, hidrata y evita la oxidación lipídica del producto (30). Esta área debe estar separada de las demás del proceso, y debe cumplir con determinadas características según lo establecido por la Resolución 4287 de 2007, entre las que cabe resaltar el uso de agua potable, el manejo del proceso bajo condiciones sanitarias adecuadas, el diseño de los tanques de manera tal que permitan el recambio o reposición permanente de agua y el tiempo de permanencia que suele ser máximo de 60 min para obtener la temperatura máxima de 4 °C medida en el centro de la masa muscular, garantizando la inocuidad e idoneidad del producto (6).

Con el fin de evitar y controlar la contaminación cruzada durante y después del tratamiento térmico, el proceso de enfriamiento se complementa mediante la adición constante de desinfectantes al agua, reduciendo la carga de microorganismos presentes en las carcasas, previniendo y retrasando su crecimiento con el fin de reducirlos en número o destruirlos (7). En países latinoamericanos como Argentina, se establece que la concentración de cloro empleada en el chiller sea de 18 a 25 mgL⁻¹ con 30 min máximo de permanencia de la

carcasa del ave en el agua, además se señala que para la renovación del agua por cada ave de 2,5 a 5 kg deben ser empleados 1,5 L (31).

3.5 Desinfectantes

Los desinfectantes son sustancias químicas capaces de eliminar, minimizar o inhibir el desarrollo microbiano, disminuyen el número de microorganismos vivos, de forma que los que sobrevivan no influyan en la calidad microbiológica del producto que pueda entrar en contacto con las superficies o medios líquidos (32). Para que la acción de un desinfectante sea considerada eficaz se debe desarrollar en un breve periodo de tiempo y su acción debe ser bactericida (33). Además, es importante tener en cuenta los factores que pueden afectar la efectividad del proceso como pH, la carga de materia orgánica, luz, temperatura, las características del agua a tratar, entre otros (34).

El hipoclorito de sodio y el clorito sódico acidificado con ácido peracético (ASC) son dos de los principales desinfectantes empleados por la industria avícola en aguas de enfriamiento, el segundo de ellos consta de una mezcla de clorito sódico en concentraciones de 50-150 mgL⁻¹ y la adición de un ácido cuyas características permiten reconocerlo como “general recognized as safe” (GRAS), obteniendo un pH final aproximado de 2,8-3,2 (7). El uso de estos dos desinfectantes está indicado en la NTC 5480 y la FAO aceptó su implementación en industrias alimenticias (10, 35), sin embargo, ambos difieren en gran medida en su mecanismo de acción, las características de los dos desinfectantes se describen en el anexo 1. Estos agentes favorecen la disminución de la carga microbiana presente en las superficies de equipos y en procesos que incluyen agua.

Según lo indica la agencia de alimentos y medicamentos del gobierno de Estados Unidos (FDA), la adición de ácido peracético no debe exceder las 220 mgL⁻¹ en el proceso chiller y los compuestos clorados no deben superar las 20-50 mgL⁻¹ en el mismo proceso, se ha demostrado que el uso de ácido peracético en concentraciones de 85 mgL⁻¹ reduce en un 92 % el desarrollo de *Salmonella* en etapa chiller (5, 36).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la efectividad como desinfectante del hipoclorito de sodio y del ácido peracético sobre cepas de *Salmonella* spp., inoculadas en aguas de enfriamiento de industrias avícolas.

4.2 Objetivos Específicos

Determinar la efectividad desinfectante del hipoclorito de sodio (20, 100 y 200 mgL⁻¹) adicionado al agua de enfriamiento, sobre *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*.

Determinar la efectividad desinfectante del ácido peracético (80, 160 y 200 mgL⁻¹) adicionado al agua de enfriamiento, sobre *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*.

Establecer el posible efecto sinérgico del ácido peracético y el hipoclorito de sodio sobre cepas inoculadas de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* en agua de fase de chiller.

5. HIPÓTESIS

Las concentraciones de los desinfectantes utilizados actualmente en el proceso de chiller son suficientes para inactivar al menos 5 unidades logarítmicas de *Salmonella* spp. en 65 min.

6. MATERIALES Y METODOS

Se emplearon dos desinfectantes, ácido peracético e hipoclorito de sodio en concentraciones de 80, 160 y 200 mgL⁻¹, y 20, 100 y 200 mgL⁻¹, respectivamente. El producto fue evaluado y sometido a prueba basado en las concentraciones de uso común en la industria, de igual manera se tuvieron en cuenta valores superiores e inferiores al mismo. Las variables de estudio se describen en el anexo 2.

6.1 Manejo de cepas de referencia

6.1.1 Preservación y reactivación de las cepas:

Origen de la cepa: *S. Typhimurium* ATCC 13176 y *S. Enteritidis* ATCC 13076 fueron proporcionadas por el laboratorio de microbiología de alimentos de la Pontificia Universidad Javeriana. La reactivación de los microorganismos se realizó empleando agar infusión cerebro corazón (BHI) (Scharlau®), las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C, posteriormente se realizó coloración de Gram para observar la morfología de los microorganismos.

Conservación de la cepa: Con el fin de garantizar la viabilidad y facilitar el manejo de los microorganismos, se realizó un banco de cepas de trabajo siguiendo la metodología descrita por Meza y colaboradores (37), realizando los correspondientes controles de calidad.

Los parámetros cinéticos como velocidad de crecimiento, tiempo de duplicación y producción de biomasa de las cepas se obtuvieron del estudio realizado por Hernández en el 2012 (38).

6.2 Descripción y caracterización del agua objeto de estudio

6.2.1 Descripción del agua

El agua recolectada correspondía a la fase de enfriamiento por inmersión (Ver anexo 3). Las muestras fueron tomadas de una planta de beneficio avícola ubicada en la ciudad de Bogotá, en esta industria se realiza el sacrificio aproximadamente de 80 mil pollos/día. El tipo de agua empleada en este tipo de procesos es agua potable que recircula hasta que se determine necesario su recambio.

6.2.2 Caracterización del agua:

Se realizó la caracterización físico-química y microbiológica del agua de enfriamiento, previa a esterilización, los análisis realizados se describen en la tabla 3.

Tabla 3. Pruebas físico- químicas y microbiológicas

PARÁMETRO	MÉTODO Y REFERENCIA
pH (Unidades)	Potenciométrico (Potenciómetro Schott ® calibrado)
DQO (mgL ⁻¹)	Reflujo cerrado, Recomendado por SM 5222, APHA 2005.(39)
DBO ₅	Conductivímetro, Recomendado por SM 5210B, APHA 2005 (40)
Ausencia/Presencia 100 mL <i>Salmonella</i>	APHA 2004
Recuento de <i>E. coli</i> y coliformes totales	APHA,2004 (41)
Sólidos sedimentables	Cono Imhoff
Grasas y Aceites	Partición/infrarrojo SM 5520 (APHA 2005) (42)

6.3 Selección y evaluación de tiempos de contacto y concentraciones de desinfectantes

El tiempo máximo de contacto y la concentración del inóculo empleado fueron condiciones establecidas previamente las cuales están basadas en un diseño Plackett Burman realizado por Hernández en el 2012 (38). El tiempo máximo de contacto fue de 65 min y la concentración del inóculo fue de 10⁶ UFCmL⁻¹.

Se llevó a cabo una prueba inicial, en la que se analizó la capacidad bactericida de los dos desinfectantes a emplear bajo condiciones experimentales definidas, esto basado en la norma técnica colombiana NTC-5150 aplicando las modificaciones correspondientes al ensayo según la cepa a emplear y sin empleo de neutralizante.

6.4 Cuantificación de cloro

Adicionalmente, se realizó la cuantificación de cloro residual siguiendo las especificaciones descritas por la asociación americana de salud pública en los métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales, para el método Yodométrico I (43), el procedimiento se describe en el anexo 4. Para esto se realizó una suspensión de hipoclorito de sodio a concentración de 20 y 50 mgL⁻¹ y se adicionó a la suspensión un inóculo del microorganismo a la concentración previamente seleccionada. La cuantificación se llevó a cabo con el fin de comparar la concentración inicial frente a la evidenciada transcurridos 65 min de contacto. Para llevar a cabo este procedimiento se eliminaron todas

las sustancias interferentes presentes en la suspensión y se tomó como blanco agua de chiller sin adición de hipoclorito. El resultado de cloro residual total disponible en la muestra de agua se informa en mg de Cl_2L^{-1} , según la ecuación 1.

$$\text{mg Cl como } \text{Cl}_2 / \text{L} = \frac{(A \pm B) \times N \times 35450}{\text{mL muestra}}$$

[1]

Dónde:

A= Titulación en mL para la muestra,

B= Titulación en mL para el blanco, y

N= Normalidad de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

6.5 Determinación de la actividad bactericida del hipoclorito de sodio y el ácido peracético sobre cepas de *Salmonella* spp.

Se realizaron los diferentes tratamientos evaluando las concentraciones seleccionadas de ambos desinfectantes empleando el método de contacto, el efecto antimicrobiano fue informado sobre $\text{Log}_{10} \text{UFCmL}^{-1}$.

6.5.1 Preparación del inóculo

Para preparar el cultivo inicial de trabajo se reactivó un vial proveniente del banco de trabajo en caldo BHI, el microorganismo fue aislado en agar Infusión cerebro corazón (BHI) incubado a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 12-14 h. Las suspensiones de los microorganismos se realizaron en agua peptonada, la concentración celular fue ajustada a un valor de 10^7UFCmL^{-1} mediante la medición de densidad óptica. Para evaluar la viabilidad se realizó recuento celular, sembrando en superficie y por triplicado en agar BHI empleando la técnica de gotas en superficie, las placas se incubaron a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 18 h, el recuento se reportó en UFCmL^{-1} (44, 45).

6.5.2 Curvas cinéticas de inactivación

Las curvas cinéticas de inactivación fueron llevadas a cabo en erlenmeyer con 18mL de agua de chiller a temperatura de refrigeración previamente esterilizada, a esta agua le fueron adicionados 2 mL de inóculo microbiano seleccionado a concentración aproximada de 10^7UFCmL^{-1} con el fin de obtener una dilución 1:9 y una suspensión con concentración inicial de 10^6UFCmL^{-1} en la mezcla del ensayo. Al agua de chiller se adicionó el desinfectante diluido según la concentración a analizar, el cálculo se realizó empleando ecuaciones de volumetría, obteniendo una concentración final de 80, 160, 200 mgL^{-1} y 20, 100 y 200 mgL^{-1} de ácido peracético y de hipoclorito de sodio, respectivamente, en el agua de chiller (Ver Anexo 5). La suspensión se mantuvo durante los 65 min del ensayo en agitación a 120 rpm a $10 \pm 5^\circ\text{C}$.

La curva de inactivación se llevó a cabo por 65 min con muestreos en 0, 1, 3, 5, 10, 15, 25, 35, 45, 55, 65 min. Las pruebas fueron realizadas por triplicado. Para cada tiempo se tomó 1 mL y se prepararon diluciones seriadas en base 10, las placas fueron incubadas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$

°C durante 18 h. Finalizado el tiempo de incubación, se procedió a realizar el recuento y se estimó la población sobreviviente. Las curvas de inactivación se graficaron en el programa Origin 8.6 ®.

6.6 Determinación de las constantes de inactivación

Con los datos obtenidos se calcularon las constantes cinéticas de inactivación para ambos desinfectantes. Los datos fueron ajustados con una regresión lineal empleando diferentes modelos matemáticos, se aplicaron las ecuaciones 2, 3 y 4 que corresponden a las leyes cinéticas de Pseudo orden cero, Pseudo primer orden y Pseudo segundo orden, respectivamente (46).

$$[UFCmL^{-1}] = -kt \quad [2]$$

$$\ln \frac{[UFCmL^{-1}]_t}{[UFCmL^{-1}]_0} = -kt \quad [3]$$

$$\frac{1}{[UFCmL^{-1}]} = kt + \frac{1}{[UFCmL^{-1}]_0} \quad [4]$$

Para decidir que el modelo describe la curva de inactivación de la población se tuvieron en cuenta los coeficientes de regresión (R^2) correspondientes a cada modelo de linealización.

6.7 Análisis estadístico

Los resultados de la actividad microbicida de los productos evaluados sobre *S. Typhimurium* ATCC 13176 y *S. Enteritidis* ATCC 13076, fueron evaluados comprobando inicialmente los supuestos de normalidad empleando el test de Shapiro.Wilk ($p > 0,05$) en el programa estadístico IBM SPSS® Statistics versión 20. Una vez confirmada la distribución normal de los datos obtenidos se realizó un análisis de comparación de medias (ANOVA) empleando Microsoft Excel Analyse - statistical test for ANOVA. La diferencia estadística se determinó como $p \leq 0,05$.

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización del agua de enfriamiento

7.1.1 Determinación de parámetros físico-químicos y microbiológicos

Los resultados obtenidos para el análisis físico-químico y microbiológico del agua de enfriamiento se reportan en la tabla 4.

Tabla 4. Análisis físico químicos y microbiológicos. Para el agua de enfriamiento

Parámetro	Unidades	Resultado	Res. 2115 de 2007. MAVDT (47)	Dec. 3930 del 2010. MAVDT (48)
pH	Unidades	6,9	6,5 – 9,0	NA
DQO	mgL ⁻¹	1400	NA	600
DBO ₅	mgL ⁻¹	924	NA	50
Ausencia/Presencia <i>Salmonella</i>	Ausencia / presencia 100 mL	Ausencia	NA	NA
Recuento de <i>E. coli</i> y coliformes totales	UFCmL ⁻¹	□ 1	0 UFC/100 mL	NA
Solidos sedimentables	mLL ⁻¹ ·h ⁻¹	0,4	NA	2
Grasas y Aceites	mgL ⁻¹	1050	NA	100

7.2 Cuantificación de cloro residual

Se realizó la cuantificación de cloro residual empleando agua de chiller como diluyente, el análisis se llevó a cabo después de 65 min según lo descrito previamente. Se realizaron las diluciones estableciendo una concentración teórica inicial de 20 y 50 mgL⁻¹ de hipoclorito de sodio en solución, realizando cuantificación al minuto 1 y al 65. Para el ensayo con adición de 20 mgL⁻¹ de cloro total en el tiempo cero, se obtuvo que transcurridos 65 min de permanencia en el medio de contacto 6,18 mgL⁻¹ de cloro residual libre, evidenciando una reducción del 69 % con respecto a la concentración inicial adicionada. Por otro lado, en el segundo ensayo con una concentración inicial de cloro total de 50 mgL⁻¹ se obtuvo una reducción de 75 %, transcurridos 65 min, con una concentración final de cloro residual libre de 12,20 mgL⁻¹, Los resultados se muestran en la figura 5.

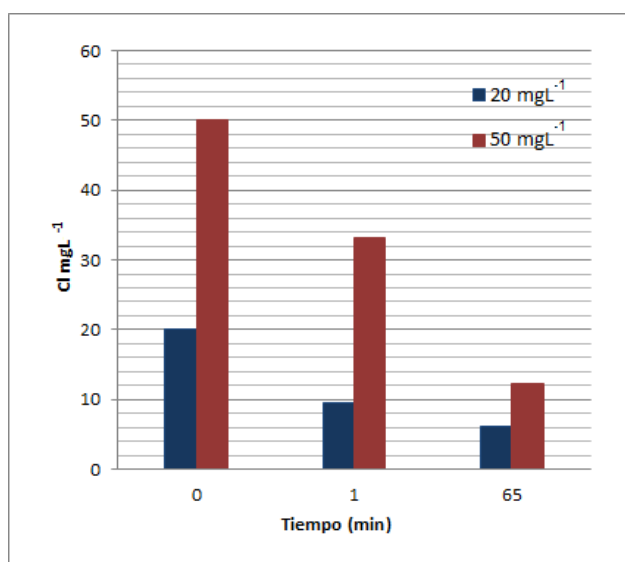


Figura 2. Cuantificación de Cloro residual en agua de enfriamiento como Cl₂ L⁻¹

7.3 Curvas cinéticas de inactivación

La figura 2 muestra las curvas cinéticas de inactivación para *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* empleando como agente desinfectante ácido peracético (CH_3COOOH). La cinética de inactivación para *S. Typhimurium* muestra una disminución de $0,28 \pm 0,05$, $0,88 \pm 0,1$ y $0,31 \pm 0,08$ unidades logarítmicas para 80, 160 y 200 mgL^{-1} de ácido peracético respectivamente, evidenciando una inactivación máxima de 14 % y mínima de 4,1 %. Por otro lado, los resultados obtenidos para *S. Enteritidis* en el mismo ensayo evidenciaron una disminución de $0,92 \pm 0,07$, $0,70 \pm 0,1$ y $0,85 \pm 0,1$ unidades logarítmicas para 80, 160 y 200 mgL^{-1} de ácido peracético respectivamente, evidenciando un porcentaje máximo de inactivación del 14,7 % y mínimo del 11,1 % transcurridos 65 min. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas ($p=0,416$) entre los resultados del tratamiento con ácido peracético.

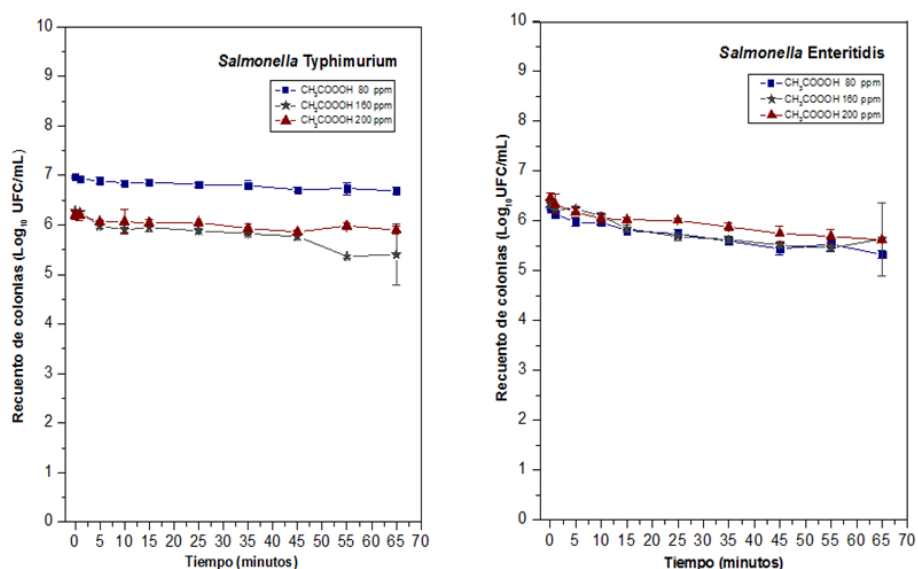


Figura 3. Curvas cinéticas de inactivación para *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* con ácido peracético a concentración de 80, 160 y 200 mgL^{-1} en agua de enfriamiento a $10 \pm 5^\circ\text{C}$

En la figura 3 se observan las curvas de inactivación para los dos microorganismos evaluados empleando como desinfectante de prueba hipoclorito de sodio (NaOCl). En este caso, se observó que para ambas cepas se presentaron diferencias significativas ($p < 0,001$) en el ensayo con 20 mgL^{-1} del desinfectante demostrando mayor efectividad frente a *S. Typhimurium* obteniendo una disminución de $0,25 \pm 0,1$ y de 0,04 para *S. Typhimurium* transcurridos 65 min, sin embargo, no se obtuvo una reducción considerable de las unidades logarítmicas. Por otro lado, para las concentraciones evaluadas superiores (100 y 200 mgL^{-1}) se observó un porcentaje de inactivación del 99,99 % para todos los ensayos al minuto 5. En los ensayos realizados con *S. Typhimurium* se obtuvo una disminución de $4,91 \pm 0,04$ y de $5 \pm 0,02$ unidades logarítmicas para los experimentos con 100 y 200 mgL^{-1} de hipoclorito de sodio respectivamente, para los mismos ensayos con *S. Enteritidis* se

obtuvo una disminución de $5,1 \pm 0,07$ y de $5,2 \pm 0,05$ unidades logarítmicas a las concentraciones descritas previamente. Los resultados que evidencian que cuando se usa la mayor concentración de hipoclorito de sodio 200 mgL^{-1} ($p < 0,0001$) se presenta una mayor inactivación del microorganismo inoculado para ambos casos.

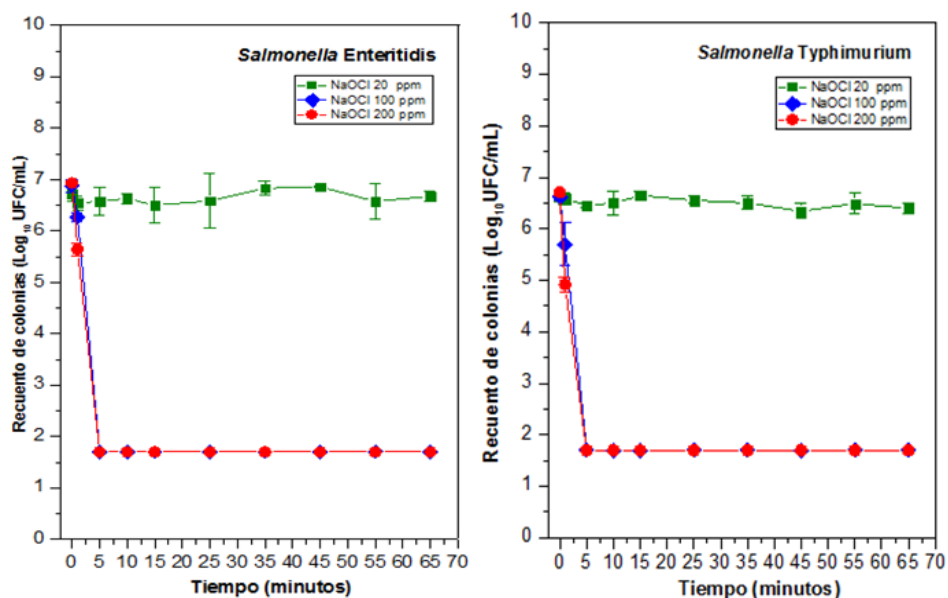


Figura 4. Curvas cinéticas de inactivación para *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* con hipoclorito de sodio a concentración de 20, 100 y 200 mgL^{-1} en agua de enfriamiento a $10 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$

Por otro lado, para el ensayo realizado con 20 mgL^{-1} de hipoclorito de sodio, con adición de ácido peracético como agente acidificante de la suspensión de ensayo ($\text{pH } 5,6 \pm 0,1$), se evidenció una disminución del 99,99% de la población, correspondiente a $5,12 \pm 0,02$ y $5,22 \pm 0,01$ unidades logarítmicas transcurrido 1 min de contacto para los ensayos con *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* respectivamente. Éste resultado se mantuvo hasta el tiempo máximo evaluado (Figura 4). Al realizar la comparación del tratamiento frente a las dos cepas evaluadas se observó que no evidencian diferencias significativas ($p=0,129$), de manera que el tratamiento de hipoclorito de sodio a concentración de 20 mgL^{-1} , acidificado con ácido peracético a $\text{pH } 5,6 \pm 0,1$ resulta igual de efectivo para la inactivación de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*.

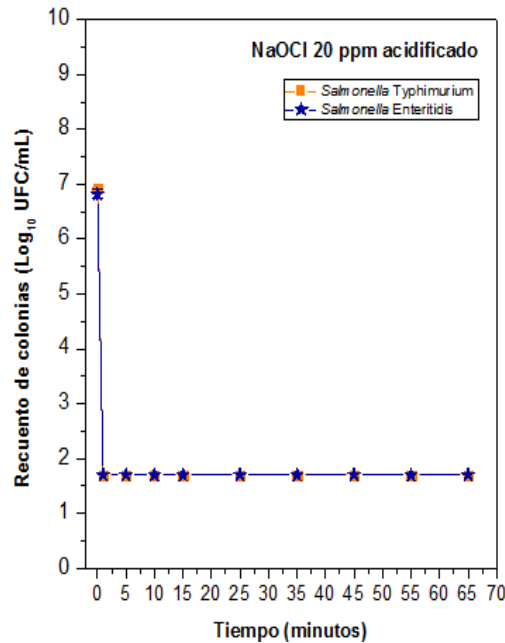


Figura 5. Curva cinética de inactivación para *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* con hipoclorito de sodio acidificado con ácido peracético a concentración de 20 mgL⁻¹ y pH aprox. 5,6 en agua de enfriamiento a 10 ± 5 °C

Por otro lado, los resultados obtenidos para las constantes de inactivación para cada experimento se muestran en la tabla 5. En el caso de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* expuestas al tratamiento con hipoclorito de sodio a 20 mgL⁻¹ los modelos no aplicaron debido a que presentan una correlación (R^2) demasiado baja. Por su parte, para *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* expuestas al tratamiento con hipoclorito de sodio a 100 y 200 mgL⁻¹ no se muestran constantes ni coeficiente de regresión ya que se logró una inactivación que corresponde al valor del límite de sensibilidad de la técnica de medición y por tanto los modelos no aplican.

Tabla 5. Constantes cinéticas y coeficiente de regresión para la inactivación de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*.

Tratamiento	Pseudo orden cero		Pseudo primer orden		Pseudo segundo orden	
	k (UFCmL ⁻¹ min ⁻¹)	R ²	k (min ⁻¹)	R ²	k (mLUFC ⁻¹ min ⁻¹)	R ²
<i>S. Enteritidis</i> Ácido peracético 80 mgL ⁻¹	11916	0,867	0,0266	0,9653	6,63X10 ⁻⁸	0,975
<i>S. Enteritidis</i> Ácido peracético 160 mgL ⁻¹	39014	0,822	0,0381	0,9206	5,96X10 ⁻⁸	0,980
<i>S. Enteritidis</i> Ácido peracético 200 mgL ⁻¹	16347	0,921	0,0204	0,9684	2,90X10 ⁻⁸	0,961
<i>S. Typhimurium</i> Ácido peracético 80 mgL ⁻¹	47183	0,906	0,0084	0,9309	1,40X10 ⁻⁹	0,949

S. Typhimurium Ácido peracético 160 mgL ⁻¹	8698	0,950	0,0230	0,8380	2,31X10 ⁻⁸	0,819
S. Typhimurium Ácido peracético 200 mgL ⁻¹	11005	0,725	0,00690	0,6458	1,41X10 ⁻⁸	0,864

8. DISCUSIÓN

Dado que en el artículo 12 de la resolución 4287 de 2007 se establece que “Para su funcionamiento, las plantas de beneficio deben garantizar el suministro de agua potable” (6), los parámetros que describen las características del agua objeto de estudio como pH y Recuento de *E. coli* y coliformes totales, se comparan con lo estipulado en la Resolución 2115 de 2007 donde se señalan las características de calidad del agua para consumo humano (47). Sin embargo, debido a las condiciones a las que se somete el agua como la recirculación durante largos periodos de tiempo y la constante exposición al producto, parámetros como DQO, DBO₅, grasas y aceites y sólidos sedimentables se comparan con lo establecido por el decreto 3930 de 2010 donde se señalan las normas y valores límite máximos permisibles de vertimientos de generadores industriales a alcantarillado público y cuerpos de agua superficiales (48).

Con base en lo señalado previamente, se establece que el valor de pH obtenido en el agua de enfriamiento analizada fue de 6,9, lo que indica que se encuentra dentro del rango permitido (47).

El recuento de *E. coli* y coliformes totales es un parámetro microbiológico a evaluar para considerar la calidad del agua para consumo humano (49), en el análisis se obtuvo un recuento $\square 1$ UFCmL⁻¹ teniendo en cuenta la sensibilidad de la técnica empleada, cumpliendo con lo estipulado por la resolución de aguas potables (47) (ver tabla 4).

Otro parámetro microbiológico evaluado fue la determinación de ausencia/presencia de *Salmonella*, pese a que este parámetro no se especifica entre los indicadores, se realizó dados los fines prácticos del estudio, teniendo en cuenta la presencia potencial del microorganismo en algunas de las carcasas de aves sumergidas en el agua. Se ha reportado que la prevalencia de *Salmonella* en el producto puede aumentar después de ser sometido al enfriamiento, debido a la contaminación cruzada promovida por el contacto excesivo entre las carcasas durante su inmersión, situación que implica presencia del microorganismo en el medio líquido (50). De igual manera, cabe resaltar que en el artículo 48 de la resolución 4287 de 2007 se establecen los estándares de cumplimiento para *Salmonella* como análisis fundamental para el correcto e higiénico funcionamiento de la planta de beneficio (6), pese a que este estándar se establece únicamente para el pollo como producto, el análisis de *Salmonella* en el agua de enfriamiento y la evidencia experimental de su ausencia como en el caso evaluado, disminuye el riesgo de contaminación cruzada que implica el proceso.

Para los dos parámetros microbiológicos evaluados se obtuvo un resultado satisfactorio con respecto a lo esperado, esto puede deberse a que procesos térmicos previos como el escaldado y el desplume al igual que el enfriamiento reducen la carga microbiana del producto, minimizando la oportunidad de contaminación cruzada en la planta (51)

Adicionalmente, se determinó la demanda química de oxígeno (DQO) y la demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅), obteniendo valores que exceden lo indicado en la resolución por encima de 800 mgL⁻¹ y 874 mgL⁻¹, respectivamente, la alta carga de materia orgánica se debe principalmente a las características del proceso ya que al tanque pueden ingresar hasta 80 mil pollos/día, además el agua no se somete a un constante recambio. Debido a esto, se recomienda regular este tipo de condiciones ya que una alta concentración de materia orgánica en el medio puede llegar a afectar la eficiencia de los procesos de desinfección (10).

Para el valor de sólidos sedimentables, se obtuvo que cumple con lo estipulado en el decreto 3930 de 2010 (Ver tabla 4), con respecto al valor de grasas y aceites, éste resulto 950 mgL⁻¹ por encima del límite máximo permitido, el resultado se relaciona con la composición nutricional de la carne de ave, ya que según la tabla de composición de alimentos el 10,2 % del peso de la carne de ave total corresponde a lípidos (52, 53), cabe resaltar que una alta concentración de grasas y aceites como la obtenida en la muestra analizada puede llegar a reducir la eficiencia de los tratamientos a los que sean sometidas las aguas residuales, además de generar películas en la superficie del líquido y generar depósitos que resultan contraproducentes para el medio (42).

En cuanto a la evaluación del ácido peracético, es importante mencionar que no es factible hacer comparaciones con literatura frente al estudio realizado, ya que la mayoría de reportes evalúan la eficacia del producto sobre carcasas inoculadas artificialmente, expuestas a tanques con agua y adición del agente químico (36, 55, 56), sin embargo, se tuvieron en cuenta las concentraciones reportadas para realizar el análisis, basado en el hecho que no afectaran las características del producto final. De esta manera, Bauermeister y colaboradores reportan que la adición de ácido peracético al agua de enfriamiento reduce la presencia de *Salmonella* en carcasas inoculadas en un 92 %, y que el efecto del desinfectante mejora considerablemente al aumentar la concentración, mostrando una respuesta eficiente a 100 y 200 mgL⁻¹, valores ante los que no se evidencian efectos secundarios sobre características organolépticas de las carcasas (36).

Con respecto a los resultados obtenidos en las constantes de inactivación, se puede observar que los modelos que mejor describen la inactivación de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* son los de pseudo primer y segundo orden. Se obtuvo que el mejor resultado, sin incluir los ensayos con hipoclorito, fue para el tratamiento con ácido peracético a una concentración de 160 mgL⁻¹ (ver tabla 5), sin embargo, pese a que para esta concentración se evidencia mayor velocidad de muerte con respecto a los otros tratamientos, no cumple con la inactivación mínima requerida para asegurar la eficacia del desinfectante, siendo

ésta mayor a 5 unidades logarítmicas (8). En un estudio realizado por Hernández se reporta una constante de inactivación de $0,479 \text{ min}^{-1}$ y $0,364 \text{ min}^{-1}$ (modelo de pseudo primer orden) para *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* respectivamente empleando para su inactivación procesos de oxidación avanzada (POA), el resultado se obtuvo para fotocátalisis con CuO/TiO_2 sobre agua de chiller inoculada bajo condiciones similares (38), estos resultados demuestran que los tratamientos evaluados no generan un efecto considerable al ser comparados con procesos de oxidación avanzada, contrario a lo que si ocurre con los experimentos que demuestran el efecto sinérgico de los dos desinfectantes. Sin embargo, para estos casos no es posible comparar los resultados de las constantes debido a que se logró inactivar el microorganismo hasta el valor del límite de sensibilidad de la técnica transcurrido el primer minuto, mientras que los POA demuestran inactivación del 99,9% de la carga celular transcurridos aproximadamente 35 min de exposición (38).

Es probable que el efecto desinfectante del ácido peracético se haya visto afectado por las características del agua de chiller ya que, tanto la materia orgánica como las grasas y aceites son compuestos de naturaleza reductora, de manera que la presencia de altas concentraciones de estos agentes en el agua (ver tabla 4) promueven el consumo del oxígeno contenido en el medio, generando procesos de lipoperoxidación de ácidos grasos y oxidación de la materia orgánica (57), factores que alteran el efecto desinfectante de los agentes químicos cuyo efecto se en la alteración de estructuras básicas celulares mediante mecanismos de oxidación.

Por otro lado, en cuanto a la evaluación de la efectividad de los compuestos clorados se han descrito varios estudios en los que se menciona el efecto potencial de los mismos para prevenir la contaminación cruzada por microorganismos como *E. coli*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria* spp. y *Salmonella* spp. en soluciones acuosas (58-61), el efecto óptimo de este tipo de agentes químicos en el proceso de enfriamiento por inmersión se obtiene manteniendo un balance entre la cantidad de carcasas, el agua empleada, la concentración de cloro total inicial y la de cloro libre final que ejerza efecto desinfectante (60).

A temperatura entre 0 y 25°C los compuestos clorados en suspensión reaccionan al disociarse en ion hipoclorito, cloro libre y ácido hipocloroso; dependiendo de la temperatura y del pH las especies de cloro se distribuyen en el medio, generalmente, el ácido hipocloroso suele ser la forma reactiva mayoritaria y su presencia aumenta si el pH del medio disminuye, la interacción de este último subproducto con compuestos orgánicos libera cloro al combinarse con el grupo amino de los aminoácidos, generando hidrolisis, degradación de las proteínas y una consecuente desestabilización de las estructuras básicas celulares (43), en el transcurso de esta reacción se genera el denominado cloro combinado, formado principalmente por mono, di y tri cloraminas (NH_2Cl , NHCl_2 y NCl_3), estos compuestos son ampliamente reconocidos como tóxicos y mutagénicos para el ser humano y en contraste con el cloro libre no ejercen acción desinfectante (62).

Para los dos casos evaluados (20 y 50 mgL⁻¹) se obtuvo que transcurridos 65 min la presencia de cloro libre residual que continuaba ejerciendo la acción desinfectante era de 6,18 mgL⁻¹ y 12,2 mgL⁻¹ respectivamente (Ver figura 2), concentración que según lo descrito por Fabrizio y colaboradores era suficiente para inactivar *Salmonella*, tal como lo reportó en su estudio donde la concentración final de cloro libre residual de 1 mgL⁻¹ mantuvo el efecto frente al microorganismo (59). Sin embargo, para el ensayo en el que se evaluó la efectividad del hipoclorito a 20 mgL⁻¹ no se evidenció una reducción significativa, indicando que, tanto la concentración como las condiciones no eran suficientes ni adecuadas para considerar el desinfectante como eficiente, al no reducir al menos 5 unidades logarítmicas antes de 60 min, como lo describe la NTC 5150 (8) (Ver figura 4). El resultado obtenido coincide con lo reportado por Rusell y colaboradores quienes reportan que tras 10 min de exposición a hipoclorito de sodio, para *Salmonella*, *E.coli* y coliformes, se obtiene una inactivación máxima de 1,2 unidades logarítmicas (61, 63). Adicionalmente, Fabrizio y colaboradores demostraron que la adición de hipoclorito de sodio a 20 mgL⁻¹ en agua destilada resulta ineficaz en la inactivación de *S. Typhimurium* en el proceso de enfriamiento por inmersión transcurridos 45 min (59).

Cabe resaltar, que la cuantificación de cloro libre residual se llevó a cabo únicamente en el medio con adición de hipoclorito sin ácido, ya que este último compuesto genera interferencias en la técnica. Es probable que la disminución de la efectividad del desinfectante a la concentración evaluada se encuentre relacionada con el pH del medio, ya que, al no acidificarse se disminuye la proporción de ácido hipocloroso y la reacción de este con las estructuras celulares no es la suficiente para desestabilizar la carga celular que contiene el agua (43, 62), además, la presencia de una alta carga orgánica, en conjunto con una concentración limitada del agente químico, se considera como otros de los factores que pueden llegar a reducir el efecto antimicrobiano (54).

Por otro lado, con el fin de evaluar la acción desinfectante del hipoclorito a altas concentraciones, se obtuvo que en los experimentos realizados con 200 mgL⁻¹ de hipoclorito de sodio se evidenció una reducción significativa ($p < 0,0001$), con un porcentaje de inactivación del 99,9 % para ambas cepas (ver figura 4), sin embargo, pese a la efectividad demostrada por este proceso no es posible implementar su uso, dado que no cumple con lo especificado por los entes reguladores internacionales, con respecto a la concentración máxima permitida de cloro total adicionado para el agua de enfriamiento calculada en 20 a 50 mgL⁻¹ (64), además de generar efectos potencialmente adversos a las características organolépticas de las carcasas (65). Este resultado coincide con lo reportado por Moretro y colaboradores, quienes reportan en su revisión una reducción >5 unidades logarítmicas (99,9%) de *Salmonella* a altas concentraciones del desinfectante (300- 500 mgL⁻¹) en tiempos tan cortos como 1 a 10 min (54, 66).

Debido a que el desinfectante clorado evidenció únicamente efectividad significativa a concentraciones muy superiores, se propuso hacer un experimento empleando hipoclorito

de sodio (20 mgL^{-1}) como compuesto clorado de base, acidificado con ácido peracético como un aditivo alimenticio directo secundario (67). El experimento se llevó a cabo, teniendo en cuenta que el pH fue un factor que afectó la efectividad del desinfectante, además que varios reportes indican que para la inactivación de coliformes, *E. coli*, *Salmonella* spp. y *Campylobacter jejuni* en aguas de enfriamiento se suele emplear clorito sódico acidificado (ASC) (55, 58, 61, 68, 69), un compuesto que consta de una mezcla de clorito sódico (25%) y un ácido (50%) aprobado por la FAO con características que permiten conocerlo como GRAS (10, 64). Se ha reportado que su uso en carcasas reduce la prevalencia de *Salmonella* spp. del 90 % inicial a un 10 % en la fase final (58). Sin embargo, la concentración de clorito sódico empleada para que este compuesto resulte eficiente debe ser de $50\text{-}150 \text{ mgL}^{-1}$ superando casi en 100 mgL^{-1} la concentración máxima permitida (7).

El resultado obtenido para el ensayo sinérgico en donde se evidencia una reducción > 5 Unidades logarítmicas (99,9%) de la población celular transcurrido 1 min de contacto (ver figura 5), demuestra que el pH es un factor determinante en el proceso de desinfección con compuestos clorados empleados en solución, y que las concentraciones empleadas de los agentes químicos no deben ser superiores a lo especificado por los entes reguladores internacionales para resultar efectivos. Adicionalmente, el uso del ácido peracético como aditivo acidificante ofrece la ventaja de no afectarse por la carga orgánica (54, 70), ser económico, actuar rápidamente y generar subproductos de baja toxicidad que consisten básicamente en ácidos carboxílicos, peróxido de hidrógeno y oxígeno (54, 70, 71).

Sin embargo, cabe resaltar que actualmente en Colombia no existe reglamento en el cual se especifique la concentración de desinfectantes a emplear ni donde se señale residualidad de los mismos, igualmente no se especifica el recambio de agua para la fase de chiller como si ocurre en países Latinoamericanos como Argentina, donde se establece el volumen de agua a adicionar según el peso de la carcasa, la temperatura de ingreso y egreso del producto y del agua y el caudal del tanque (72), señalando así un vacío en la legislación colombiana que permite a la industria avícola el empleo indiscriminado de desinfectantes y el manejo inadecuado y no controlado del proceso de enfriamiento por inmersión.

8. CONCLUSIONES

- Las tres concentraciones de ácido peracético evaluadas (80 , 160 y 200 mgL^{-1}) no resultan efectivas para inactivar más de 5 unidades logarítmicas de las cepas evaluadas. Por su parte, con concentraciones de 100 y 200 mgL^{-1} de hipoclorito de sodio se logra la inactivación del 99,9 % de la población de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, sin embargo estas concentraciones no son permitidas por los entes reguladores.

- El ensayo con adición de 20 mgL⁻¹ de cloro total demostró una disminución del 69 % de cloro residual libre transcurridos 65 min de permanecía mientras que el ensayo con adición de cloro total de 50 mgL⁻¹ presentó una reducción de 75 %, transcurridos 65 min.
- El efecto desinfectante del hipoclorito a 20 mgL⁻¹ se ve favorecido al acidificar el medio, empleando como aditivo ácido peracético a concentración de 150 mgL⁻¹, logrando una inactivación del 99,9 % transcurrido 1 minuto comparado con el 3,7 % de inactivación obtenido en el medio no acidificado.
- Las concentraciones empleadas para ambos desinfectantes en el tratamiento sinérgico se encuentran dentro del rango permitido por los entes competentes.

9. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar el mismo análisis de efectividad del mejor tratamiento obtenido, frente a otros organismos patógenos de alta prevalencia en el sector avícola como *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* y *E. coli* enterohemorrágica, minimizando el riesgo de contaminación del producto final.
- Se recomienda analizar los vacíos existentes en la legislación colombiana en cuanto al manejo de desinfectantes en industrias avícolas y en general las condiciones que influyen en el proceso de enfriamiento por inmersión.
- Se recomienda hacer un análisis sensorial para establecer si la adición de hipoclorito de sodio a 20 mgL⁻¹ simultánea con ácido peracético 150 mgL⁻¹ al agua de enfriamiento afecta o no las características organolépticas de las carcasas de aves expuestas.

10. LITERATURA CITADA

1. Mead G, Borde B. Análisis microbiológico de carne roja, aves y huevos. Acribia editor. Zaragoza, España 2007. 332 p.
2. Montville T, Matthews k. Microbiología de los alimentos. Introducción. Acribia editor. Zaragoza, España: Primera edición; 2009. 459 p.
3. Pui C.F., Wong W.C., Chai L. C., Tunung R., Jeyaletchumi P., Noor Hidayah M., et al. Review article, *Salmonella*: A foodborne pathogen. *International Food Research Journal*. 2011;18:465-73.

4. Scallan E., Hoekstra R., Angulo F., Tauxe RV., Widdowson MA., Roy S. Foodborne Illness Acquired in the United States Major Pathogens. *Emerging Infectious Diseases*. 2011;17(1):7-15.
5. Carrascal AK, Castañeda R., A. P. “Perfil de riesgo *Salmonella* spp (no tíficas) en pollo entero y en piezas”: Ministerio de protección social. Instituto Nacional de Salud. UERIA. ; 2011 [Junio 2012]. Available from: <http://www.ins.gov.co/?idcategoria=92614&download>.
6. Ministerio de protección social. Resolución número 4287 de 2007, “Reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios y de inocuidad de la carne y productos cárnicos comestibles de las aves de corral destinadas para consumo humano” 2007 [Junio 2011.]. Available from: http://web.invima.gov.co/portal/documents/portal/documents/root//Resolucion4287_2007Aves.pdf.
7. Sánchez M.X. “*Salmonella* spp. Evaluación de riesgos, descripción y brotes de alto perfil”. En: Curso-taller patógenos en alimentos, Estrategias de gestión, detección y control de *Salmonella* spp, *E coli*, *Listeria*, *Campylobacter* spp; Julio 2011; Universidad Jorge Tadeo Lozano, Bogotá D.C, Colombia.
8. Instituto Colombiano de normas técnicas y certificación. Norma técnica colombiana 5150 - Antisépticos y desinfectantes químicos. Actividad bactericida básica. Método de prueba y requisitos- Fase 1. Bogotá D.C., Colombia2003.
9. Ministerio de protección social. Decreto número 1500 de 2007. “Reglamento técnico sobre el Sistema Oficial de Inspección, Vigilancia y Control de la Carne, Productos Cárnicos Comestibles y Derivados Cárnicos Destinados para el Consumo humano” 2007 [Junio 2011]. Available from: http://portal.fedegan.org.co/pls/portal/docs/PAGE/FNG_PORTLETS/FEDEGAN/NORMAS/NORMAS_CARNICAS/DECRETO_1500_2007.PDF.
10. FAO/WHO. “Report of the forty-second session of the codex commite on food hygiene” 2011 [Diciembre 2011]. Available from: http://www.ift.org/public-policy-and-regulations/advocacy/~media/Public%20Policy/International%20Advocacy/Codex_CCFH.pdf.
11. Koneman E, Allen S. Diagnóstico microbiológico: texto y atlas a color. Panamericana Médica editor. Buenos Aires, Argentina: Sexta edición; 2008. 1475 p.
12. S. R. Controlling *Salmonella* in poultry production and processing. Boca Raton, Estados Unidos. 2012.
13. Richardson E., Limaye B., Inamdar H., Datta A., Manjari K., Pullinger G., et al. Genome sequences of *Salmonella* enterica Serovar Typhimurium, Choleraesuis, Dublin, and Gallinarum strains of well-defined virulence in food-producing animals. *Journal of Bacteriology*. 2011;193(12):3162-3.

14. Adelantado C., Arosemena L., Calvo M.A., Manteca L., Martín M., Ordóñez G., et al. *Salmonella*, de actualidad desde siempre. Real escuela de avicultura. España2008.
15. Pascual M. Enfermedades de origen alimentario: su prevención. Primera ed. Madrid, España2005.
16. (CDC) Cpeccpde. "Fiebre tifoidea" 2012 [Junio 1 de 2012]. Available from: http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/typhoid_fever/.
17. Jay J. Microbiología moderna de los alimentos. Quinta edición ed. Zaragoza, España. 2005. 767 p.
18. Mercado M., Avila J., Rey M., Montoya M., Gamboa A., Carrascal AK. Brotes por *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* asociados al consumo de pollo. Revisión sistemática de la literatura. *Biomédica*. 2012;32(3).
19. Uribe C., MC. S. Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. *Colombia médica*. 2006;37(2):151-8.
20. Suarez M., J M. Presencia de *Salmonella* Enteritidis en productos de origen avícola y su repercusión en salud pública. *IATREIA* 2000;13(4):237-45.
21. Centro para el control y prevención de enfermedades (CDC). "Salmonella Outbreaks" 2012 [Mayo 18 de 2012]. Available from: <http://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks.htm>.
22. Murray P., Rosenthal K., M. P. Microbiología médica. Sexta edición ed2009. 947 p.
23. Lloret J., Muñoz J., Artigas V., Allende L., G. V. Protocolos terapéuticos de urgencias. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, España. 2005.
24. Romero R. Microbiología y parasitología humana, Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. Tercera edición ed. México D.F, México. 2007. 965 p.
25. Rhen M., Masked D., Mastroeni P., Threlfall J. *Salmonella*, Molecular biology and pathogenesis. United Kingdom2007.
26. FENAVI. "Consumo de pollo per cápita en el mundo y en Colombia" 2012 [Marzo 12 de 2012]. Available from: <http://www.fenavi.org/fenavi/consumo-per-capita2.php?idm=42>.
27. Consejo Nacional de Política Económica y Social RdC, Departamento nacional de planeación. "Documento Conpes 3468, Política nacional de sanidad e inocuidad para la cadena avícola" 2007 [Septiembre 17 de 2012]. Available from: <http://www.ica.gov.co/getattachment/05335af5-1c3e-4d2b-92cb-0ca226a8a1d0/2942.aspx>.
28. Instituto Nacional de Vigilancia De Medicamentos y Alimentos (INVIMA). "Informe de gestión 2008" 2008 [Marzo 12 de 2012]. Available from: <http://web.invima.gov.co/portal/documents/portal/documents/root/GESTION/Gestion%202008.pdf>.

29. Federación Nacional de Avicultores de Colombia. Fondo Nacional Avícola F. "Producción avícola en Colombia" 2012 [Marzo 12 de 2012]. Available from: http://www.fenavi.org/index.php?option=com_content&view=article&id=2472&Itemid=1330.
30. Galarza S. Diseño de un plan de implementación de buenas prácticas de manufactura para una planta faenadora de aves, . Quito, Ecuador: Escuela Politécnica Nacional; 2011. **Tesis de pregrado**.
31. Ministerio de asuntos agrarios BALP. "Manuales de procedimientos - Faena de aves" 2011 [Mayo 25 de 2012]. Available from: <http://www.maa.gba.gov.ar/2010/SubPED/Ganaderia/archivos/Protocolo Faena de Aves.pdf>.
32. Arias J. Métodos en microbiología farmacéutica. Primera Edición ed. Bogotá, Colombia. 2006. 165 p.
33. Álvarez A., Espigares E., R. G. Valoración De desinfectantes, método de dilución-neutralización. *Higiene y Sanidad Ambiental*. 2001;1:1-5.
34. Instituto Colombiano de normas técnicas y certificación I. Guía técnica colombiana 85 - Guía de limpieza y desinfección para plantas de alimentos. Bogotá D.C., Colombia 2003.
35. Instituto Colombiano de normas técnicas y certificación I. Norma técnica colombiana 5480 - Limpieza y desinfección de plantas y equipos utilizados en la industria cárnica y avícola. Bogotá D.C., Colombia 2007.
36. Bauermeister L. J., Bowers J. W. J., Townsend J. C., R. MS. The Microbial and Quality Properties of Poultry Carcasses Treated with Peracetic Acid as an Antimicrobial Treatment. *Poultry Science*. 2008;87:2390–8.
37. Meza R., Monroy A., Mercado M., Poutou R., Rodríguez P., A. P. Study of the stability in real time of cryopreserved strain banks. *Universitas scientiarum*. 2004;9(2):35-42.
38. Hernández A. Evaluación de fotocátalisis heterogénea con TiO_2 y proceso fenton para el control de *Salmonella* spp en aguas generadas en plantas de beneficio avícola: Pontificia Universidad Javeriana; 2012.
39. APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Demanda química de oxígeno (DQO) Reflujo cerrado 5220: edición 21; Washington DC. 2005.
40. APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Demanda bioquímica de oxígeno (DBO5) Conductivímetro 5210: edición 21; Washington DC. 2005.
41. APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Filtración por membrana para coliformes 9222. Washington DC: Edición 21; Washington DC. 2005.

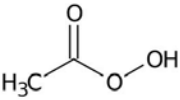
42. APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Grasas y aceites Partición/infrarrojo 5520. Washington DC: Edición 21; Washington DC. 2005.
43. APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Cloro residual Método Yodometrico 4500. Washington DC: EDICIÓN 21; Washington DC. 2005.
44. Collins CH., Patricia L. Métodos microbiológicos. Zaragoza, España1989. 524 p.
45. Botero MJ. Manual práctico de microbiología general. Manizales, Colombia2011. 444 p.
46. Chang R. Química. Novena edición ed. 2007. 1061 p.
47. Ministerio de la protección social mda, vivienda y desarrollo territorial. Resolución 2115 de 2007. "Por medio de la cual se señalan características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano" 2007 [Septiembre 17 de 2012]. Available from: http://www.minambiente.gov.co/documentos/res_2115_220707.pdf.
48. Ministerio de la protección social mda, vivienda y desarrollo territorial. Decreto 3930 de 201. "Por la cual se establecen las normas y los valores límite máximos permisibles de parámetros en vertimientos puntuales a sistemas de alcantarillado público y a cuerpos de aguas continentales superficiales de generadores que desarrollen actividades industriales, comerciales o de servicio". 2010.
49. Wang D, Fiessel W. Evaluation of media for simultaneous enumeration of total coliform and Escherichia coli in drinking water supplies by membrane filtration techniques. *Journal of Environmental Sciences*. 2008;20(3):273-7.
50. James C, Vincent C, de Andrade Lima T.I, James S. The primary chilling of poultry carcasses - a review. *International Journal of refrigeration* 2006. p. 847-62.
51. Buncic S., Sofos J. Interventions to control Salmonella contamination during poultry, cattle and pig slaughter. *Food Research International*. 2012;45:641-55.
52. (ICBF) ICdBF. "Tabla de composición de alimentos colombianos, Carne de Pollo" 2012 [Octubre 19 de 2012]. Available from: http://alimentoscolombianos.icbf.gov.co/alimentos_colombianos/principal_alimento.asp?id_alimento=648&enviado3=1.
53. (FAO). OdInUplayla. "Tabla de composición de alimentos, Pollo parte comestible, animal entero" 2012 [Octubre 19 de 2012]. Available from: <http://www.rlc.fao.org/es/conozca-fao/que-hace-fao/estadisticas/composicion-alimentos/busqueda/?clave=F295>.
54. Moretro T., Heir E., Nesse L., Vestby L., S. L. Control of *Salmonella* in food related environments by chemical disinfection. *Food research international*. 2012;45(2):532-44.

55. Bucher O., Farrar A., Totton S., Wilkins W., Waddell L., Wilhelm BJ., et al. A systematic review-meta-analysis of chilling interventions and a meta-regression of various processing interventions for Salmonella contamination of chicken. *Preventive Veterinary Medicine*. 2012;103:1-15.
56. King DA., Lucia L., Castillo A., Acuff G., Harris K., J. S. Evaluation of peroxyacetic acid as a post-chilling intervention for control of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium on beef carcass surfaces. *Meat science*. 2005;69:401-7
57. Osorio F., Torres JC., Sánchez M. Tratamiento de aguas para la eliminación de microorganismos y agentes contaminantes 2010. 185 p.
58. Sexton M, Raven G, Holds G, Pointon A, Kiermeier A, Sumner J. Effect of acidified sodium chlorite treatment on chicken carcasses processed in South Australia. *International Journal of Food Microbiology*. 2007;115(2):252-5.
59. Fabrizio K. A., Sharma R. R., Demirci A, Cutter CN. Comparison of electrolyzed oxidizing water with various antimicrobial interventions to reduce *Salmonella* species on poultry. *Poultry science*. 2002;81:1598–605.
60. Northcutt J., Smith D., Ingram K. D., Hinton A., M. M. Recovery of bacteria from broiler carcasses after spray washing with acidified electrolyzed water or sodium hypochlorite solutions. *Poultry Science*. 2007;86:2239–44.
61. Loretz M, Stephan R, Zweifel C. Antimicrobial activity of decontamination treatments for poultry carcasses: A literature survey. *Food Control*. 2010;21(6):791-804.
62. Deborde M., Gunten U. Reaction of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment - kinetics and mechanisms: A critical review. *Water research* 2008; 42 (1-2): 13-15.
63. Russel S. M., P. AS. Monochloramine versus sodium hypochlorite as antimicrobial agents for reducing populations of bacteria on broiler chicken carcasses. *Journal of Food Protection*. 2005;68:758-63.
64. FAO/WHO. "Report of a Joint Expert Meeting. Benefits and Risks of the use of Chlorine-containing Disinfectants in food Production and Food Processing" 2009 [diciembre 2011]. Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241598941_eng.pdf.
65. Erickson MC. Flavor quality implications in chlorination of poultry chiller water. *Food Research International*. 1999;32:635-41.
66. Moretro T., Vestby LK., Nesse L., Storheim S., Kotlarz K., S L. Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. *Journal of applied microbiology*. 2009;106:1005-12.
67. Food and drugs administration F. "Sección: peroxiacidos 21 CFR sección 173.370" 2012 [Junio 18 de 2012]. Available from: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=173.370>.

68. Oyarzabal O, Hawk C., Bilgili S., Warf C., K. K. Effects of Postchill Application of Acidified Sodium Chlorite To Control *Campylobacter* spp. and *Escherichia coli* on Commercial Broiler Carcasses. *Journal of Food Protection*. 2004;67(10):2288–91.
69. Kemp G., Aldrich ML., AL W. Acidified sodium chlorite antimicrobial treatment of broiler carcasses. *Journal of food protection*. 2000;63(8):1087-92.
70. Monarca S., Richardson S., Feretti D., Grotto M., Thruston A., Zani C., et al. Mutagenicity and disinfection by-products in surface drinking water disinfected with peracetic acid. *Environmental toxicology and chemistry*. 2001;21(2):309-18.
71. Kitis M. Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. *Environment International*. 2004;30(1):47-55.
72. Argentina SNdsyca. Resolución 553 de 2002 2002 [Octubre 18 de 2012]. Available from: http://www.aviculturaargentina.com.ar/normativas/37-decreto_4238-1968_capitulo20.pdf.

ANEXOS

Anexo 1. Características de los desinfectantes usados en aguas de enfriamiento

PROPIEDAD	COLORO	ACIDO PERACÉTICO
Efectividad frente a bacterias	Bueno- selectivo	Bueno
Estabilidad en almacén	Baja	Excelente
Estabilidad de la solución al uso	Baja, se disipa rápidamente	Excelente, se disipa lentamente
Afectado por materia orgánica	Alto	Bajo
Afectado por la dureza del agua	Si	Si
Facilidad de uso	Excelente	Alta espuma
Irritante para la piel	Algunas veces	Si irrita
Subproductos	Cloraminas, compuestos altamente tóxicos que generan efectos mutagénicos	Ácidos carboxílicos, no tóxicos
Aprobado por FDA	si	si
Mecanismo de acción	Hidrolisis con producción de cloro libre, ión hipoclorito y ácido hipocloroso, este último reacciona con compuestos orgánicos liberando cloro al combinarse con el grupo amino de los aminoácidos, generando hidrolisis y degradación de proteínas.	Libera oxígeno activo haciendo reaccionar los puentes de azufre presentes en las enzimas, proteínas y otros metabolitos desestabilizando su estructura al oxidarlos generando consecuente deterioro de la actividad celular. Adicionalmente inactiva catalasas, interrumpe la función quimiosmótica y el transporte de lipoproteínas de membrana al alterar la estructura de la pared celular.
Química	$\text{Cl}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HClO} + \text{Cl}^- + \text{H}^+$ $\text{Cl}_2 + 2\text{OH}^- \rightleftharpoons \text{ClO}^- + \text{Cl}^- + \text{H}_2\text{O}$	 $\text{CH}_3\text{COOH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{COOH} + \text{H}_2\text{O}$

Fuente: (7, 34-36, 43, 64, 70, 71)

Anexo 2. Variables de estudio

Variable	Descripción	Unidades
Desinfectante	Catagórico Nominal	-
Microorganismo	Catagórico Nominal	-
Concentración del desinfectante	Cuantitativo de razón	mgL ⁻¹
Disminución de unidades logarítmicas	Cuantitativo de razón	Log 10 UFC/mL

Anexo 3. Agua de enfriamiento por inmersión



Figura 6. Agua de enfriamiento recolectada (Fuente: Propia)

Anexo 4. Cuantificación de cloro (residual). Método yodométrico I

Interferencia: Interfieren las formas oxidadas de manganeso y otros agentes oxidantes. A titulación neutra reduce al mínimo el efecto interferente de los iones férrico y nítrico, sin embargo es preferible la ácida porque algunas formas de cloro combinado no reaccionan a pH 7. Para la preparación de la titulación ácida se debe emplear únicamente ácido acético, el ácido sulfúrico (H_2SO_4) aumentaría las interferencias, no se debe usar nunca ácido clorhídrico (HCl).

Concentración detectable mínima: Aproximadamente 40 μg de Cl como Cl_2/L si se utiliza $Na_2S_2O_3$ 0,01 N con una muestra de 1000 mL.

Reactivos:

a. *Ácido acético, conc. (glacial)*

b. *Yoduro de potasio, KI.*

c. *Tiosulfato de sodio patrón, 0.1 N:*

Disolver 25 g de $Na_2S_2O_3$ en 1L de agua destilada hervida, añadir 1 mL de cloroformo ($CHCl_3$) para reducir la descomposición bacteriana y estandarizar frente a dicromato de potasio.

Método de dicromato para estandarizar: Disolver 4,904 g de dicromato de potasio anhidro, $K_2Cr_2O_7$, de calidad estándar primario en agua destilada y diluir a 1000 mL para obtener una solución 0,1000 N. Conservar en frascos con tapón de vidrio.

Añadir a 80 mL de agua destilada en agitación constante 1 mL de H_2SO_4 , 10 mL de la solución de dicromato previamente preparada y 1 g de KI. Mantener la solución en oscuridad por 5 minutos y valorar con solución titulante de $Na_2S_2O_3$ 0,1 N hasta desaparición del color amarillo, añadir 1 mL de solución indicadora de almidón y continuar la titulación hasta desaparición total del color. La normalidad del $Na_2S_2O_3$ será dada por la ecuación:

$$Normalidad\ Na_2S_2O_3 = \frac{1}{mL\ de\ Na_2S_2O_3\ consumidos}$$

d. *Titulante de tiosulfato de sodio estándar, 0,01 N:*

Realizar una dilución del tiosulfato de sodio patrón (0,1 N) una vez estandarizado para dar mayor estabilidad a la solución titulante como se indicó previamente, con agua destilada recién hervida. De la misma manera que se describió para el tiosulfato de sodio 0,1 N estandarizar esta solución.

e. *Solución indicadora de almidón:*

Añadir 5g de almidón diluidos y completar a 1 L de agua destilada hirviendo, agitar y dejar en reposo durante una noche. Conservar con 1,25 g de ácido salicílico y 4 g de cloruro de zinc.

Procedimiento

a. Volumen de muestra:

Seleccionar un volumen de muestra que no requiera más de 20 mL de $Na_2S_2O_3$ 0,01 N, ni menos de 0,2 mL para el punto final de almidón-yoduro. Para un rango de cloro de 1 a 10 mg/L emplear 500 mL de muestra, por encima de 10 mg/L emplear muestras menores.

b. Preparación para la titulación:

Manteniendo en constante agitación, colocar suficiente cantidad de ácido acético para reducir el pH del agua a un valor comprendido entre 3 y 4, añadir 1 g de KI y mantener en oscuridad por 5 minutos.

c. Titulación:

Titúlese fuera de la luz solar directa. Anadir $Na_2S_2O_3$ 0,01 N empleando bureta, hasta que casi desaparezca el color amarillo del yodo libre. Añadir 1 mL de solución de almidón y continuar titulando hasta observar desaparición del color.

d. Titulación del blanco:

Corrijase el resultado de valoración de la muestra determinando la contribución del blanco por las impurezas oxidantes o reductoras del reactivo. Tomar un volumen de agua correspondiente a la usada para titulación de la muestra analizada, añádase 5 mL de ácido acético, 1 g de KI y 1 mL de solución de almidón. Si aparece color azul valorar de la misma forma descrita previamente, si no aparece color azul titular con solución de yodo 0,0282N hasta aparición del color azul, titúlese por retroceso con $Na_2S_2O_3$ 0,01 N y registrar la diferencia.

Para determinar el cloro residual total disponible en la muestra de agua emplear la ecuación 1 y reportar el resultado en mg Cl como Cl_2/L . (43)

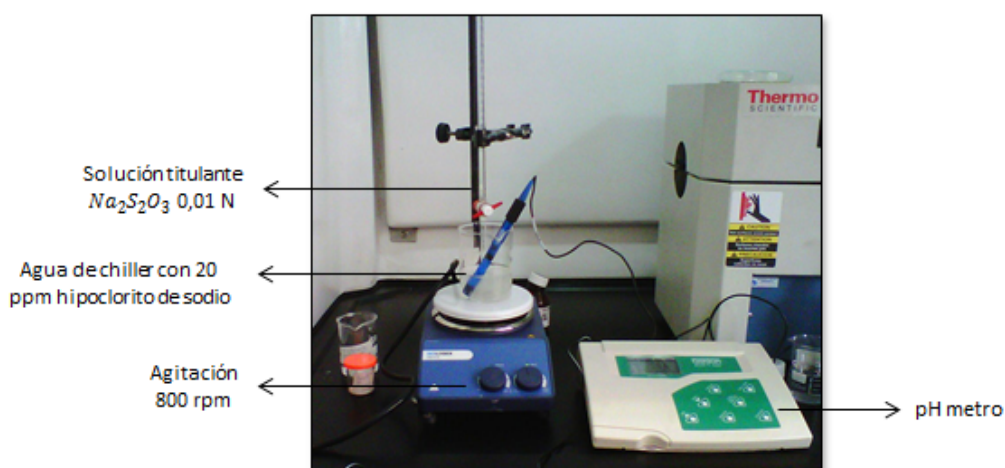


Figura 7. Cuantificación de cloro residual. Método yodométrico (Fuente: propia)

Anexo 5. Cálculos volumétricos para preparación de diluciones de los desinfectantes

Hipoclorito de sodio 20, 100 y 200 mgL⁻¹

DILUCIONES HIPOCLORITO DE SODIO			
Hipoclorito de Sodio comercial (Blancox™)		5,25% o 52.500 mgL ⁻¹	
Se realiza dilución aproximadamente hasta 525 mgL ⁻¹ empleando agua potable como diluyente			
52.500 mgL ⁻¹ →	5.250 mgL ⁻¹ →	525 mgL⁻¹	Esta última es la empleada como solución stock para realizar las diluciones
<p>Las concentraciones se establecieron de acuerdo a los siguientes cálculos, basado en la ley de la volumetría.</p> <ul style="list-style-type: none"> • $C1 \times V1 = C2 \times V2$ <p>$V_{final} = 20 \text{ mL}$</p> <p><i>Inoculo = Estandarizado, dilución 1/10 (2 mL)</i></p> <p>Concentración 20 mgL⁻¹</p> <p>$525 \text{ mgL}^{-1} \times V1 = 20 \text{ mgL}^{-1} \times 18 \text{ mL}$</p> <p>$V1 = 0,685 \text{ mL} \text{ ó } 685 \text{ }\mu\text{L}$</p> <p>$18 \text{ mL} - 0,685 \text{ mL} = 17,32 \text{ mL agua de chiller}$</p> <p>Concentración 100 mgL⁻¹</p> <p>$525 \text{ mgL}^{-1} \times V1 = 100 \text{ mgL}^{-1} \times 18 \text{ mL}$</p> <p>$V1 = 3,428 \text{ mL} \text{ ó } 3428 \text{ }\mu\text{L}$</p> <p>$18 \text{ mL} - 3,42 \text{ mL} = 14,58 \text{ mL agua de chiller}$</p> <p>Concentración 200 mgL⁻¹</p> <p>$525 \text{ mgL}^{-1} \times V1 = 200 \text{ mgL}^{-1} \times 18 \text{ mL}$</p> <p>$V1 = 6,857 \text{ mL} \text{ ó } 6857 \text{ }\mu\text{L}$</p> <p>$18 \text{ mL} - 6,85 \text{ mL} = 11,15 \text{ mL agua de chiller}$</p>			

Ácido peracético 80, 160 Y 200 mgL⁻¹

DILUCIONES ÁCIDO PERACÉTICO			
Ácido peracético empleado		150.000 mgL ⁻¹	
Se realiza dilución aproximadamente hasta 1500 mgL ⁻¹ empleando agua potable como diluyente			
150.000 mgL ⁻¹ →	15.000 mgL ⁻¹ →	1.500 mgL⁻¹	Esta última es la empleada como solución stock para realizar las diluciones
<p>Las concentraciones se establecieron de acuerdo a los siguientes cálculos, basado en la ley de la volumetría.</p> <ul style="list-style-type: none"> $C1 \times V1 = C2 \times V2$ <p>$V_{final} = 20 \text{ mL}$</p> <p><i>Inoculo = Estandarizado, dilución 1/10 (2 mL)</i></p> <p>Concentración 80 mgL⁻¹</p> $1500 \text{ mgL}^{-1} \times V1 = 80 \text{ mgL}^{-1} \times 18 \text{ mL}$ $V1 = 0,96 \text{ mL} \text{ ó } 960 \text{ } \mu\text{L}$ $18 \text{ mL} - 0,96 \text{ mL} = 17,04 \text{ mL agua de chiller}$ <p>Concentración 160 mgL⁻¹</p> $1500 \text{ mgL}^{-1} \times V1 = 160 \text{ mgL}^{-1} \times 18 \text{ mL}$ $V1 = 1,92 \text{ mL} \text{ ó } 1920 \text{ } \mu\text{L}$ $18 \text{ mL} - 1,92 \text{ mL} = 16,08 \text{ mL agua de chiller}$ <p>Concentración 200 mgL⁻¹</p> $1500 \text{ mgL}^{-1} \times V1 = 200 \text{ mgL}^{-1} \times 18 \text{ mL}$ $V1 = 2,4 \text{ mL} \text{ ó } 2400 \text{ } \mu\text{L}$ $18 \text{ mL} - 2,4 \text{ mL} = 15,6 \text{ mL agua de chiller}$			

Hipoclorito de sodio 20 mgL⁻¹ acidificado con Ácido peracético a pH 5,6 ± 0,1

1. DILUCIONES HIPOCLORITO DE SODIO			
Hipoclorito de Sodio comercial (Blancox™)		5,25% o 52.500 mgL ⁻¹	
Se realiza dilución aproximadamente hasta 525 mgL ⁻¹ empleando agua potable como diluyente			
52.500 mgL ⁻¹ →	5.250 mgL ⁻¹ →	525 mgL⁻¹	Esta última es la empleada como solución stock para realizar las diluciones

2. DILUCIONES ÁCIDO PERACÉTICO			
Ácido peracético empleado		150.000 mgL ⁻¹	
Se realiza dilución aproximadamente hasta 1500 mgL ⁻¹ empleando agua potable como diluyente			
150.000 mgL ⁻¹ →	15.000 mgL ⁻¹ →	1.500 mgL⁻¹	Esta última es la empleada como solución stock para realizar las diluciones

Las concentraciones se establecieron de acuerdo a los siguientes cálculos, basado en la ley de la volumetría.

$$\bullet \quad C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$V_{final} = 20 \text{ mL}$$

$$Inoculo = \text{Estandarizado, dilución } 1/10 \text{ (2 mL)}$$

Concentración 20 mgL⁻¹

$$525 \text{ mgL}^{-1} \times V1 = 20 \text{ mgL}^{-1} \times 18 \text{ mL}$$

$$V1 = 0,685 \text{ mL } \text{ó} \text{ } 685 \text{ } \mu\text{L}$$

$$18 \text{ mL} - 0,685 \text{ mL} = 17,32 \text{ mL agua de chiller}$$

*El volumen de ácido peracético a adicionar se estandarizo previamente mediante pruebas llevadas a cabo en el laboratorio de microbiología ambiental de la Pontificia Universidad Javeriana. Se realizaron mediciones empleando potenciómetro y se estableció que empleando un volumen de 200 μL de ácido peracético a 15.000 mgL⁻¹ se lograba una concentración de 150 mgL⁻¹ adecuada para llevar la solución de 20 mgL⁻¹ de hipoclorito en agua de chiller a pH de 5,6 ± 0,1

Anexo 4. Análisis estadístico

Pruebas de normalidad

Log10	Tratamiento	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
	SEA160	,277	3	.	,941	3	,532
	SEA200	,177	3	.	1,000	3	,967
	SEA80	,253	3	.	,964	3	,637
	SEH100	,338	3	.	,853	3	,248
	SEH20	,231	3	.	,980	3	,730
	SEH200	,299	3	.	,915	3	,433
	SEHA20	,300	3	.	,913	3	,428
	STA160	,356	3	.	,816	3	,154
	STA200	,215	3	.	,989	3	,801
	STA80	,324	3	.	,876	3	,313
	STH100	,239	3	.	,975	3	,698
	STH20	,364	3	.	,800	3	,114
	STH200	,339	3	.	,851	3	,243
	STHA20	,259	3	.	,959	3	,610

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo						
RESUMEN	C20	C100	C200	Total		
	B1					
Cuenta	3	3	3	9		
Suma	3,125	18,521	18,705	40,351		
Promedio	1,04166667	6,17366667	6,235	4,48344444		
Varianza	0,00151233	0,01618633	0,001264	6,66872778		
	B2					
Cuenta	3	3	3	9		
Suma	3,735	17,738	18,034	39,507		
Promedio	1,245	5,91266667	6,01133333	4,38966667		
Varianza	7,5E-05	0,00282633	0,00349033	5,5659455		
	Total					
Cuenta	6	6	6	6		
Suma	6,86	36,259	36,739	36,739		
Promedio	1,14333333	6,04316667	6,12316667			
Varianza	0,01303827	0,02804137	0,01690977			
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Muestra	0,03957422	1	0,03957422	9,36507895	0,0098946	4,74722534
Columnas	97,6270134	2	48,8135067	11551,5181	1,95758E-20	3,88529383
Interacción	0,1996411	2	0,09982056	23,6248505	6,90193E-05	3,88529383
Dentro del grupo	0,05070867	12	0,00422572			
Total	97,9169604	17				

Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo						
RESUMEN	C80	C160	C200	Total		
	B1					
Cuenta	3	3	3	9		
Suma	5,761197318	5,29007492	5,54360381	16,594876		
Promedio	1,920399106	1,76335831	1,84786794	1,84387512		
Varianza	0,006552351	0,30920114	0,01335102	0,08690919		
	B2					
Cuenta	3	3	3	9		
Suma	3,850972886	5,64851739	3,91651286	13,4160031		
Promedio	1,283657629	1,88283913	1,30550429	1,49066702		
Varianza	0,006369561	0,35456305	0,01021228	0,17938763		
	Total					
Cuenta	6	6	6	6		
Suma	9,612170204	10,9385923	9,46011667			
Promedio	1,602028367	1,82309872	1,57668611			
Varianza	0,126800678	0,26978838	0,09767282			
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Muestra	0,561401829	1	0,56140183	4,81030182	0,048724027	4,747225347
Columnas	0,220467006	2	0,1102335	0,94452208	0,415961682	3,885293835
Interacción	0,509408724	2	0,25470436	2,18240268	0,155461341	3,885293835
Dentro del	1,400498804	12	0,11670823			
Total	2,691776364	17				

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	3	18,358	6,11933333	0,00692233		
Columna 2	3	18,647	6,21566667	0,00073233		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupo	0,0139202	1	0,01392017	3,63704059	0,12917655	7,708647421
Dentro de l	0,0153093	4	0,00382733			
Total	0,0292295	5				