

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE PESQUERÍA



**“EFECTO DEL OZONO GASEOSO EN LA REDUCCIÓN DE
Salmonella spp. DURANTE LA DESINFECCIÓN DE CONCHA DE
ABANICO *Argopecten purpuratus* PARA EL PROCESO DE
CONGELADO”**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE: INGENIERO PESQUERO

ALDO ENRIQUE DEL CASTILLO AGUIRRE

LIMA – PERÚ

2018

M. Sc. Raúl Porturas Olaechea
PRESIDENTE

Ing. Nancy Martínez Ordinola
MIEMBRO

Ing. Andrés Molleda Ordoñez
MIEMBRO

Mg. Sc. Daniel Percy Rojas Hurtado
ASESOR

DEDICATORIA

Para Florentino y Zenaida porque a su modo, formas y maneras, siempre estuvieron presentes a lo largo de este camino hasta el día de hoy. Por ustedes soy quien soy.

Por Diana y Bruno, hermanos míos por quienes guardo y guardaré un profundo amor por sobre todas las cosas.

Para Marko y Patty, quienes jugaron un gran rol desde el inicio de esta historia.

Para quienes a lo largo de estos años estuvieron y aún están, porque ahora sé que también soy un poco de ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Al Mg. Sc Daniel Rojas quien no solo fue un profesor, sino a lo largo de los años se convirtió en un gran amigo, por quien guardaré siempre un profundo aprecio.

Al Profesor Raúl Porturas y profesores miembros del jurado, por su incondicional apoyo a lo largo de toda esta etapa. Muchas gracias!!

Para Álvaro Tello, Edward Peñares y Stephanie del Águila quien gracias a su apoyo pude iniciar y culminar la presente tesis.

A todos los que alguna vez me preguntaron ¿Y la tesis?, Gracias!!

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	6
RESUMEN	11
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 CONCHA DE ABANICO	4
2.1.1 Clasificación taxonómica	4
2.2 HABITAD	4
2.2.1 Morfología externa	5
2.2.2 Fisiología y anatomía interna	5
2.2.3 Composición química	6
2.3 ANTECEDENTES ESTADÍSTICOS	8
2.3.1 Precios FOB de la concha de abanico congelada	8
2.3.2 Precio FOB de la concha de abanico fresco refrigerada	9
2.3.3 Exportaciones de concha de abanico proveniente de acuicultura 2006-2016 ...	10
2.3.4 Desembarques de concha de abanico	11
2.4 EL OZONO GENERALIDADES, CARACTERÍSTICAS Y USOS	12
2.4.1 Efecto del ozono sobre los microorganismos	16
2.5 SALMONELLA	21
2.5.1 Características de la Salmonella	21
2.5.2 Enfermedades relacionadas con Salmonella	22
2.5.3 Alimentos involucrados con presencia de Salmonella	26
2.5.4 Control de la Salmonella	27

2.5.5	Técnicas de detección de Salmonella	27
2.6	USOS DEL CLORO EN LA DESINFECCIÓN Y LOS TRIHALOMETANOS	30
2.6.1	Trihalometanos	30
2.7	VALOR DE REDUCCIÓN DECIMAL	32
III.	METODOLOGÍA.....	34
3.1	LUGAR DE EJECUCIÓN.....	34
3.2	MUESTRA DE ESTUDIO.....	34
3.3	MATERIALES Y EQUIPOS	34
3.4	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	36
3.5	DISEÑO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	45
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
4.1	VERIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE INÓCULO.....	47
4.2	SOBREVIVENCIA DE LA <i>SALMONELLA SPP</i> A LA EXPOSICIÓN DEL OZONO GASEOSO	47
4.3	REDUCCIÓN DE LA <i>SALMONELLA SPP</i> EN LA EXPOSICIÓN DEL OZONO	51
V.	CONCLUSIONES	55
VI.	RECOMENDACIONES	56
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
VIII.	ANEXOS	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición química de la concha de abanico	7
Tabla 2: Composición de aminoácidos de la concha de abanico.....	7
Tabla 3: Precios de la concha de abanico congelada (USD/KG).....	8
Tabla 4: Precios de la concha de abanico fresco refrigerada (USD/KG)	9
Tabla 5: Principales países importadores de concha de abanico en TM.....	11
Tabla 6: Valor de las exportaciones de concha de abanico en US\$	11
Tabla 7: Principales Trihalometanos.....	32
Tabla 8: Verificación de la concentración teórica de los inóculos	47
Tabla 9: Logaritmo del recuento promedio de sobrevivientes en unidades experimentales para los inóculos 7.54×10^2 y 7.46×10^6 UFC <i>Salmonella</i>/g.....	49
Tabla 10: Tasa de Supervivencia Log promedio de <i>Salmonella spp</i> por gramo en concha de abanico ozonizada.....	50
Tabla 11: Reducción logarítmica del recuento para dos inóculos de <i>Salmonella</i>/g.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación gráfica de los precios de la concha de abanico congelada ...	9
Figura 2: Representación gráfica de los precios de la concha de abanico fresco refrigerada.....	10
Figura 3: Destino del desembarque de concha de abanico según el tipo de uso	12
Figura 4: Equipo ozonizador con tolva de exposición.....	36
Figura 5: Flujo de proceso	37
Figura 6: Diagrama experimental.....	38
Figura 7: Distribución de las muestras dentro de la tolva del ozonizador orden 1-6 .	42
Figura 8: Distribución de las muestras dentro de la tolva del ozonizador orden 7-12	43
Figura 9: Distribución de las muestras dentro de la tolva del ozonizador orden 13-18	43
Figura 10: Distribución de las muestras dentro de la tolva del ozonizador orden 19-24	44
Figura 11: Vista superior de la tolva de exposición al tratamiento con ozono gaseoso	46
Figura 12: Tasa de sobrevivencia de la <i>Salmonella</i> spp al ozono gaseoso.....	51
Figura 13: Reducción de <i>Salmonella</i> spp a la exposición de 10 ppm de ozono	54

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Preparación del nefelómetro de Mc farland.	68
Anexo 2. Metodología y Escala de Mc farland.....	69
Anexo 3. Preparación de diluciones sucesivas	70
Anexo 4. Verificación de supuestos estadísticos en DCA	71
Anexo 5. Respuesta del análisis estadístico con Minitab.....	72
Anexo 6. Prueba de múltiples comparaciones de Tukey.....	75

RESUMEN

El presente estudio consistió en determinar la sobrevivencia del microorganismo *Salmonella spp* como efecto de la desinfección de tallos de concha de abanico frescos empleando ozono gaseoso con una dosis constante de 10 ppm a diferentes tiempos de exposición, empleándolo como desinfectante sustituto del cloro. Se emplearon tiempos de exposición de 5, 20, 40 y 60 minutos, los cuales fueron aplicados a concentraciones de 7.54×10^2 y 7.46×10^6 UFC *Salmonella* /g. La menor sobrevivencia de la *Salmonella spp* se presentó en el tiempo de exposición de 60 minutos, teniendo un 53% para el inóculo de 7.54×10^2 UFC *Salmonella* /g y 83% para el inóculo 7.46×10^6 UFC *Salmonella* /g. Con lo que se obtuvo la reducción logarítmica de 1.34 y 1.18 ciclos logarítmicos respectivamente. Se realizó la determinación del valor de reducción decimal (Valor D) con una dosis de 10 ppm de ozono gaseoso entre 47-49 minutos el cual corresponde a las curvas linealizadas del ploteo semilogarítmico para ambos inóculos. Estos valores y todos los obtenidos en el presente estudio se establecieron a tiempos de exposición previamente definidos y controlados con una concentración constante de 10 ppm de ozono. Para el análisis estadístico de la información se empleó un diseño factorial de dos factores (4A2B) en un diseño completamente al azar (DCA), empleando la prueba de múltiples comparaciones de Tukey y soporte del programa estadístico Minitab.

Palabras claves: *Salmonella*, ozono, desinfección, reducción logarítmica

ABSTRACT

The present study consisted of determining the survival of the microorganism *Salmonella* spp as an effect of the disinfection of fresh fan shell stems using gaseous ozone with a constant dose of 10 ppm at different exposure times, using it as a substitute disinfectant for chlorine. Exposure times of 5, 20, 40 and 60 minutes were used, which were applied at concentrations of 7.54×10^2 and 7.46×10^6 CFU *Salmonella* / g. The lowest survival of *Salmonella* spp occurred in the exposure time of 60 minutes, having 53% for the inoculum of 7.54×10^2 CFU *Salmonella* / g and 83% for the inoculum 7.46×10^6 CFU *Salmonella* / g. With which the logarithmic reduction of 1.34 and 1.18 logarithmic cycles was obtained respectively. The determination of the decimal reduction value (Value D) was carried out with a dose of 10 ppm of gaseous ozone between 47-49 minutes, which corresponds to the linearized curves of the semilogarithmic plot for both inoculums. These values and all those obtained in the present study were established at previously defined and controlled exposure times with a constant concentration of 10 ppm of ozone. For the statistical analysis of the information, a two-factor factorial design (4A2B) was used in a completely randomized design (DCA), using the Tukey test of multiple comparisons and support of the Minitab statistical program.

Key words: *Salmonella*, ozone, disinfection, logarithmic reduction

I. INTRODUCCIÓN

El gran interés por la explotación de la concha de abanico surge en los años 80 a raíz del fenómeno del niño que se dio lugar en los años 1982-1983, donde el desarrollo de este molusco se vio sumamente favorecido con un fuerte crecimiento poblacional debido a la desaparición de la fauna depredadora de la concha de abanico por los altos incrementos de temperatura, lo que conllevó a una rápida explotación del recurso.

Las presentaciones de la concha de abanico destinada a la exportación están compuestas de tres maneras las cuales son: tallo con o sin coral y en media valva para la categoría de congelados, tallo sin coral para la categoría de fresco-refrigerados.

La pesquería de la concha de abanico desde el año 2006 hasta el año 2017 ha fluctuado en valor de exportaciones empezando con valores cercanos a los 30 millones de dólares hasta los 77 millones de dólares. Donde la mayor parte de la cadena de valor de la pesquería de concha de abanico se encuentra en el segmento de la pesca artesanal, siendo de gran importancia económica la sostenibilidad, calidad e inocuidad de la producción y una constante exportación de la concha de abanico, para sostener el desarrollo de las poblaciones de Piura, Ancash y otros departamentos donde muchas asociaciones y miles de familias dependen de esta actividad. Evitando así el cierre de los mercados por barreras sanitarias o baja capacidad de abastecimiento hacia los mercados que ofrecen un mayor precio por el recurso. En el año 2016 los principales países que ejercían una fuerte demanda al Perú de la concha de abanico en sus diferentes presentaciones fueron: Francia, Bélgica, España, Países bajos, Alemania, Chile, Brasil, Australia e Italia, que juntos sumaron más del 95% en el destino de las exportaciones totales de concha de abanico congelada. Es por ello la importancia de mantener activo y sin restricciones el mercado de concha de abanico congelada, ya que representó ingresos cercanos a los 20 millones de

USD FOB en el año 2017 como resultados de las exportaciones de concha de abanico congelada.

SANIPES entre los meses de febrero y abril del año 2017 reportó presencia de Salmonella en conchas de abanico en las bahías Independencia en Ica, Guaynuna en Ancash y Sechura en Piura. Adicionalmente en el mes de noviembre del año 2014 SANIPES reportó la presencia de Salmonella en las áreas de La Pampa en bahía independencia y Gallinazo en Pucusana, procediendo al cierre temporal de las mencionadas.

La potencial presencia de Salmonella en áreas de producción tanto primaria como secundaria, representa un alto riesgo para la salud pública y a su vez la oportunidad de poder aplicar nuevas tecnologías en la producción asegurando la total inocuidad del producto

La evaluación de Salmonella como patógeno de estudio responde a que la presencia de Salmonella se encuentra considerada en los criterios de “seguridad alimentaria” y “criterios de higiene de procesos” dentro del **“Manual de indicadores sanitarios y de inocuidad de los productos pesqueros y acuícolas para el mercado nacional y de exportación”**. Es dentro del mencionado manual que se le otorga un nivel diez de peligrosidad, lo que se interpreta que con sola presencia del patógeno en el alimento se condiciona su peligrosidad para la salud. Por lo cual es necesario y de suma importancia de evaluar los resultados microbiológicos de los monitoreos realizados por el SANIPES, debido a que uno de los requisitos primordiales para que un producto pesquero pueda ser exportado es el de obtener el **“Certificado Oficial Sanitario de Exportación”** emitido por el SANIPES y el cual se basa en los resultados de los análisis microbiológicos realizados al recurso hidrobiológico, los cuales deben ser emitidos por un laboratorio acreditado ante INACAL y cumplir con los límites del Manual de indicadores sanitarios emitido por el SANIPES.

Una de las formas más comunes de eliminar el peligro microbiológico en los productos pesqueros es mediante el uso del cloro en la desinfección para sus diferentes presentaciones, el cual comúnmente se comercializa en forma de hipoclorito de calcio o hipoclorito de sodio., con los cuales es posible preparar soluciones cloradas de

concentraciones cercanas a las 100 ppm, a estas soluciones se les confieren propiedades bactericidas y/o desinfectantes, minimizando así la posibilidad de tener un alimento contaminado y la descomposición acelerada del mismo.

Estudios recientes han demostrado que el cloro al entrar en contacto con materia orgánica puede generar compuestos llamados Trihalometanos (THM), los cuales según la Organización Mundial de la Salud (OMS) han generado el desarrollo de tumores en ratas y se encuentran relacionados con algunas de las enfermedades de índole cancerígena en seres humanos.

Una alternativa viable para contrarrestar el problema expuesto sería el uso del ozono debido a sus características de ser un gas desinfectante y fuertemente oxidante de amplio espectro, que destruye con eficacia a todos los patógenos conocidos de los seres humanos y de los alimentos, incluyendo *E.coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Campylobacter*, *Pseudomonas*. Además, el ozono no deja residuos, no cambia el olor ni el color sobre el producto que es empleado, esto debido a que el gas ozono es inestable y termina disociándose en moléculas de oxígeno. (Guzel-Seydim et al., 2004)

Los objetivos de la presente tesis de investigación fueron:

- Determinar la sobrevivencia de dos concentraciones de inóculo de *Salmonella spp* en concha de abanico aplicando 10 ppm de ozono gaseoso a diferentes tiempos de exposición.
- Determinar el tiempo de reducción decimal del tratamiento con 10 ppm de ozono gaseoso en concha de abanico inoculada con *Salmonella spp* para el proceso de congelado.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 CONCHA DE ABANICO

2.1.1 Clasificación taxonómica

Álamo y Valdivieso (1997) Clasificaron a la concha de abanico *Argopecten purpuratus* según se muestra a continuación:

Clase:	Pelecypoda (Bivalvia, Lamelibranchia)
Sub clase:	Pteriomorphia
Orden:	Pterioida (Ptereoconchida, Isodontida)
Super familia:	Pectinacea
Familia:	Pectinidae
Especie:	<i>Argopecten purpuratus</i> (LAMARCK)

2.2 HABITAD

La concha de abanico *Argopecten purpuratus* es encontrada principalmente en aguas costeras, formando parte de la comunidad bentónica (Kanagusuku, 2009) a una profundidad comprendida entre los 3 y los 20 metros de profundidad con fondos que varían desde el fango blando hacia la arena endurecida y fondo de conchuela (caracterizado por la presencia de algas) (Álamo y Valdivieso, 1997; Mendo et al., 2008)

Dentro de los bancos naturales, la especie *Argopecten purpuratus* se encuentra formando parches y nunca distribuidos de manera uniforme, debido a la diferencia en la calidad del sustrato e influencia de factores oceanográficos. Las aguas donde generalmente se les encuentran habitando tienen un rango amplio de temperatura que, frecuentemente, varía entre los 14 y 20° C, sin embargo, durante la presencia del Fenómeno el Niño soporta temperaturas de hasta más de 25 ° C, aparentemente sin problema (Mendo y Wolf, 2003).

La concha de abanico se distribuye a lo largo de la costa del pacifico que comprende entre la Bahía de Paita (4° 44´ S) y Coquimbo (30° S) en Chile. (IMARPE, 2011).

También se encuentran otros autores los cuales indican que se distribuye desde Corinto en Nicaragua hasta Valparaíso en Chile, pero con mayor frecuencia en las costas del Perú y norte de Chile (Rombouts, 1991).

Los moluscos que se desarrollan en zonas costeras, esteros o bahías y pueden estar expuestos a contaminantes ambientales provenientes de fuentes diversas como ríos, corrientes marinas, descargas urbanas y fenómenos naturales, por lo que las toxinas y xenobióticos como los plaguicidas organoclorados, organofosforados, metales pesados, virus y bacterias, pueden ser incorporados y acumulados en estos organismos y causar serios problemas de salud pública (Calvario y Montoya, 2003).

2.2.1 Morfología externa

Peña (2001) describe la morfología de *Argopecten purpuratus* como bivalvo de concha grande, sólida, moderadamente convexa, más larga que alta (altura/longitud = 0.906 ± 0.004), pleurotética y de contorno circular. Presenta coloración externa blanca con purpura encima de las costillas, alternativamente rosada y marrón. Generalmente la valva derecha con una costilla menos que la izquierda.

2.2.2 Fisiología y anatomía interna

Argopecten purpuratus es un molusco filtrador que posee branquias, las cuales además de cumplir la función respiratoria, han asumido la función de atrapar material alimenticio,

cuando el agua marina ingresa al manto, pasa sobre la superficie de los eténidos y es cubierta por un mucus y la masa viscosa que poseen la propiedad de atraer alimento hacia el palpo labial. (Mendo et al., 2008).

El manto presenta numerosos ojos en la capa media y numerosos tentáculos en la capa interior, cuya función es táctil y quimiorreceptora (Álamo, 1981). Las branquias son de color marrón pálido y están soportadas por las membranas de fijación entre el punto de contacto del saco visceral y los músculos aductores. Las branquias consisten en un par de láminas cuya unión con la membrana de fijación constituye un eje branquial. (Mendo et al., 2008)

Los músculos aductores son de dos tipos, un músculo grande estriado y un músculo pequeño no estriado, ambos son de coloración blanquecina. El aductor estriado es usado cuando el individuo se mueve lentamente (Mendo et al., 2008). Las gónadas se encuentran rodeando el intestino, siendo la gónada masculina de color blanco, ambas son muy cortas por la ausencia de cópula en esta especie. (Román et al., 2000) mencionados por Alcázar en el 2008, señala que la mayor parte de los pectínidos de interés comercial de Iberoamérica son hermafroditas funcionales refiriéndose específicamente a la concha de abanico *Argopecten purpuratus*.

Suarez (2012) indicó que el proceso de filtración que realizan para su alimentación los moluscos bivalvos, favorece la acumulación de virus y bacterias en su sistema digestivo, que son difíciles de eliminar aún durante los procesos de limpieza o depuración de los mismos.

2.2.3 Composición química

Respecto a la composición de la concha de abanico vista en la Tabla 1 es resaltante su alto contenido proteico y de humedad, siendo este último parámetro de suma importancia, en el presente trabajo, por ser facilitador para el desarrollo de microorganismos.

Tabla 1: Composición química de la concha de abanico

Componente	Promedio (%)
Humedad	78,2
Grasa	1,8
Proteína	15,9
Sales Minerales	2,2
Calorías (100g)	96

FUENTE: SIICEX, (2018)

El aporte de aminoácidos de la proteína presente en la concha de abanico es ilustrado en la Tabla 2, donde se puede destacar la presencia de aminoácidos esenciales como lisina y metionina, sin dejar de considerar a la cistina, arginina y taurina, considerando así a la concha de abanico como una rica fuente proteica, calórica de alta digestibilidad además de gozar de buena palatabilidad.

Tabla 2: Composición de aminoácidos de la concha de abanico

Perfil de A.A	mg/100g	Perfil de A.A	mg/100g3
Acido Aspártico	<210	Leucina	<210
Acido Glutámico	498	Lisina	<210
Alanina	503	Metionina	<210
Arginina	722	Prolina	<210
Cistina	421	Serina	<210
Fenilalanina	<210	Taurina	3140
Glicocola	5151	Tirosina	<210
Histidina	<210	Treonina	<210
Isoleucina	<210	Triptofano	<210

FUENTE: Varnam, (1998)

La concha de abanico es destinada principalmente a la gastronomía a nivel nacional e internacional por lo que se le denomina alimento de consumo humano directo; siendo su principal presentación la de tallo con o sin coral congelado, el cual muchas veces posee tiempos de cocción muy cortos o estos no llegan hasta una temperatura de seguridad superior de los 80° C.

2.3 ANTECEDENTES ESTADÍSTICOS

2.3.1 Precios FOB de la concha de abanico congelada

En la Tabla 3 que se muestra a continuación se puede observar la variación del precio FOB de la concha de abanico congelada, los datos son los correspondientes a los años 2015, 2016 y 2017. Donde se observa el alto valor por kilogramo de este recurso ya procesado, teniendo fluctuaciones de precio durante todo el año e incrementándose en el segundo semestre.

Tabla 3: Precios de la concha de abanico congelada (USD/KG)

Meses	2015	2016	2017
Enero	10,85	18,05	14,43
Febrero	11,29	18,86	16,26
Marzo	11,78	19,45	14,47
Abril	11,88	18,93	16,75
Mayo	11,71	17,69	18,06
Junio	13,30	18,35	15,33
Julio	13,72	18,20	20,21
Agosto	13,71	18,79	13,80
Septiembre	15,25	18,22	18,17
Octubre	14,76	18,25	18,95
Noviembre	15,88	16,57	16,34
Diciembre	19,70	15,39	16,82

FUENTE: SIICEX, (2018)

Se puede apreciar que en la Tabla 3 y figura 1 que existe un significativo incremento de los precios de la concha de abanico en el año 2016, respecto al año 2015 y un incremento del precio a partir de la segunda mitad del año 2017 respecto al año 2016. Situación que probablemente se deba a que en este periodo se presentó poca oferta del recurso y un aumento en la demanda externa.

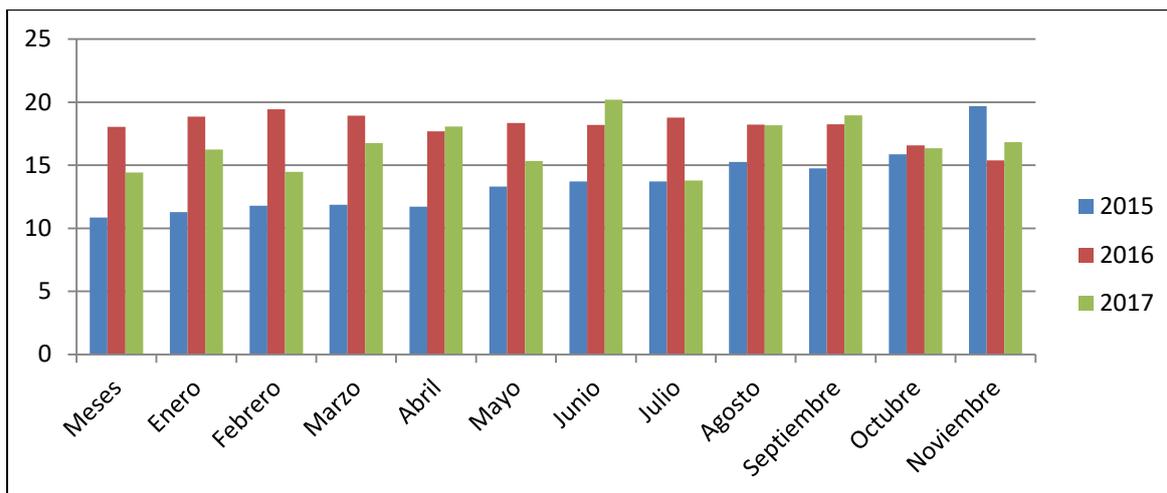


Figura 1: Representación gráfica de los precios de la concha de abanico congelada

2.3.2 Precio FOB de la concha de abanico fresco refrigerada

En la presente Tabla 4 se observa el precio FOB de la concha de abanico fresco refrigerada correspondiente a los años 2015, 2016 y 2017.

Tabla 4: Precios de la concha de abanico fresco refrigerada (USD/KG)

Meses	2015	2016	2017
Enero	16,94	14,75	13,77
Febrero	15,23	15,00	8,04
Marzo	13,96		6,40
Abril		18,83	16,37
Mayo			6,25
Junio		14,96	22,03
Julio			9,80
Agosto		8,49	19,8
Septiembre		18,65	6,43
Octubre		19,44	
Noviembre		15,66	
Diciembre		17,34	

FUENTE: SIICEX, (2018)

En la Tabla 4 y figura 2 se aprecia una mayor fluctuación de los precios de la concha de abanico para los años 2015 y 2016. Presentando un incremento del precio en el primer semestre del año 2016 y precios superiores al histórico en los dos últimos meses del primer semestre del año 2017. Esto debido a la poca oferta del recurso originado por fenómenos climatológicos como el niño. Sin embargo, en el año 2016 los precios de las presentaciones de congelado y fresco refrigerado no difieren mucho de los 18 USD/KG, situación muy

diferente al precio presentado en el año 2017 el cual en comparación es mucho más bajo que el presentado en el año 2016 y en comparación con la concha de abanico congelada.

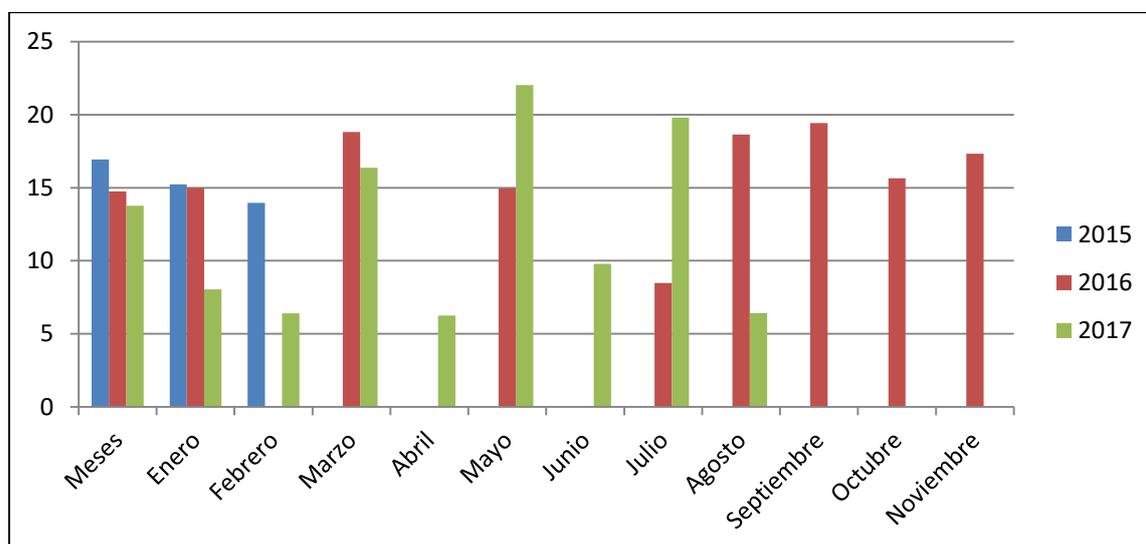


Figura 2: Representación gráfica de los precios de la concha de abanico fresco refrigerada

2.3.3 Exportaciones de concha de abanico proveniente de acuicultura 2006-2016

De acuerdo a las estadísticas presentadas en las Tablas 5 y 6 se puede observar que los ingresos por concepto de exportación de concha de abanico han sufrido una caída en los últimos 3 años, esto debido a los fenómenos climatológicos como el niño, que ha repercutido en la producción de la concha de abanico, presentando altos niveles de mortandad en las zonas de producción al largo del litoral peruano. Además de que a raíz de los fenómenos climatológicos algunas zonas de producción se vean afectadas en su calidad fisicoquímica y microbiológica del agua.

Sin embargo, es importante resaltar que, a pesar de la fuerte caída en la producción y exportación de concha de abanico, la demanda de los tres más importantes importadores de concha de abanico como son los países de Francia, Bélgica y Estados Unidos, se sigue manteniendo, aunque con menores niveles de importaciones, situación que se ve reflejada en el aumento de los precios en el primer semestre del año 2016, tal como se observa en la Tabla 4.

Tabla 5: Principales países importadores de concha de abanico en TM

Especie/País	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Concha de Abanico											
Total	2289	3132	3748	8041	9980	11414	6672	17399	13570	7346	5133
Francia	1697	2169	2706	4477	5377	6654	3311	5793	5937	3853	1837
Bélgica	274	0	0	246	322	571	311	1435	1604	812	738
Estados Unidos	47	257	216	1437	2190	2383	1526	6686	2583	913	435
Italia	177	339	358	558	341	456	600	607	704	306	173
Reino Unido	62	104	80	109	96	208	137	184	257	136	46
Países Bajos	.	21	85	618	1229	311	91	488	477	390	616
España	26	229	191	216	190	238	268	350	398	325	753
Australia	6	9	10	218	10	241	101	505	277	13	23
Alemania	.	.	0	4	.	0	21	13	97	135	166
Otros	.	4	63	158	168	329	296	1254	1144	444	325

FUENTE: PRODUCE, (2018)

Tabla 6: Valor de las exportaciones de concha de abanico en US\$

Especie/País	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Concha de abanico											
Total	3047093 3	2583202 6	3424502 5	4675944 7	9642714 7	13129339 0	7556512 3	15936102 1	12511363 2	8098032 2	7730048 3
Francia	2376723 8	1842565 8	2632724 8	2648667 8	5212901 4	78345740	3869928 1	49919460	54703330	4185638 4	3009749 7
Bélgica	3694668	196	217	1219686	2875099	7023099	3835277	12641408	14908364	1056055 9	1202571 5
Estados Unidos	281518	1785426	1939085	8793308	2342835 5	28582390	1880658 4	66844517	25134770	1081276 3	6749980
Italia	1679404	2563680	2567763	2940908	2720894	3410746	4936664	4476480	5501624	2818550	2033308
Reino Unido	705198	1144035	767476	681656	804858	2134961	1532597	1951247	2558820	1293794	663774
Países Bajos	.	151100	585027	3508295	1076398 3	3528080	819971	4081535	4052115	4548198	1011143 6
España	314590	1641042	1126970	1092259	1399048	1723674	2148085	2618379	2828933	2466153	7483163
Australia	28309	98504	82473	1129815	88881	2480378	1207377	4493971	2535994	119195	326400
Alemania	.	.	3	19892	.	950	153511	111211	831500	1743069	3052913
Otros	8	22385	504604	886950	1629263	3817116	3296646	11424698	11181563	4575412	4447592

FUENTE: PRODUCE, (2018)

2.3.4 Desembarques de concha de abanico

En la figura 3 se observa que hace más de diez años el 90% de los desembarques de concha de abanico son destinados netamente a la producción en congelado, siendo esta presentación la de mayor demanda en el mercado extranjero, a pesar que desde el año 2013 se observa una caída constante de los desembarques.

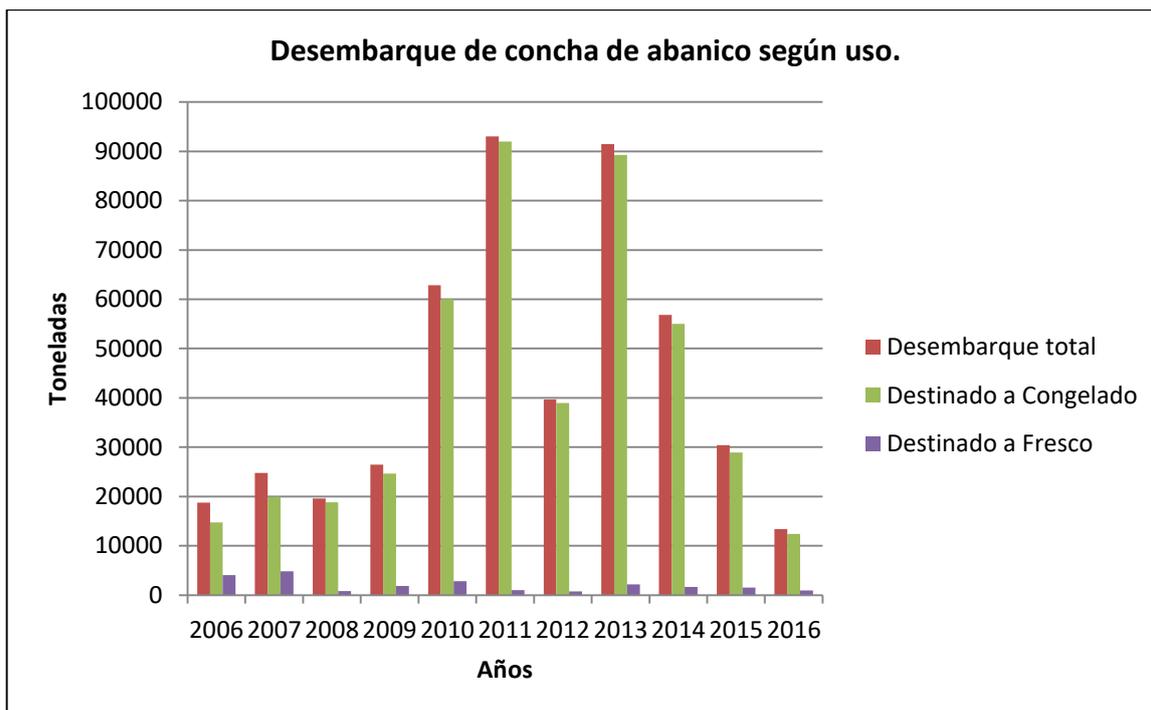


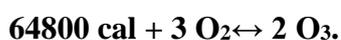
Figura 3: Destino del desembarque de concha de abanico según el tipo de uso

FUENTE: PRODUCE, (2018)

2.4 EL OZONO GENERALIDADES, CARACTERÍSTICAS Y USOS

El ozono, tiene una masa molecular de 48 g/mol y su estructura molecular es un híbrido de resonancia de cuatro formas canónicas o resonantes que tienen un enlace deslocalizado. Tiene un olor picante y es por lo general incoloro, pero en grandes concentraciones puede volverse ligeramente azulado (Khadre et al., 2001). Tiene un potencial de oxidación-reducción de 2.07 V que lo hace un fuerte oxidante; su densidad en estado gaseoso es de 2.14 g L⁻¹ a 0 °C y 101.3 kPa, la cual es mayor que el aire en condiciones similares.

El ozono fue descubierto por el científico Von Marum en el año 1783 mientras trabajaba con máquinas electrostáticas. Así mismo le sucedió a Ciukshank en el año 1801 haciendo la electrólisis del agua. Finalmente, en el año 1840 Schonbein logró detectar y clasificar al ozono dándole el nombre ya conocido por todos hoy en día. Palabra que procede del griego y cuyo significado es olor. En el año 1863 el científico Soret comprobó y demostró que el ozono se compone solamente de oxígeno (Khadre et al., 2001).



Eminentes científicos estudiaron el ozono hasta que M. Otto logró determinar su densidad, constitución molecular y estudió detenidamente su formación. Después de estos estudios ideó el sistema idóneo para producir ozono artificialmente, por medio de descargas eléctricas (como lo produce la propia naturaleza) que rompen la molécula de oxígeno, recombinando sus átomos para formar ozono. Dando lugar de esta manera al sistema Otto, que se aplica actualmente en los generadores de ozono (Rice, 1985).

El uso comercial en relación al gas ozono para la eliminación de contaminantes, fue concebido hace más de 100 años (Boeniger, 1995), las investigaciones realizadas en el siglo XIX sobre las propiedades del ozono mostraron que es capaz de reaccionar con la mayoría de sustancias orgánicas e inorgánicas hasta su oxidación completa, entre ellas muchas sustancias de importancia bioquímica (McNair y Lesher, 1963).

Su primer uso se remonta a los años 1886 donde el científico francés Meritens utilizó el ozono para poder desinfectar agua, seguido de Ohmüller en 1892 y Van Lierhove en 1895.

El ozono es un producto utilizado como desinfectante, pero en estado natural es inestable, se auto descompone rápidamente para producir oxígeno, y por lo tanto no deja residuos en los alimentos o ambientes (Napoli et al., 2012; Shilpa et al., 2003). Este compuesto es uno de los desinfectantes más potentes conocidos (Menzies et al., 2003), es un gas que se puede obtener por procesos electroquímicos, por descarga de arco o someter el oxígeno a radiación ultravioleta con una longitud de onda menor o igual de 200 nm (Sanchis, 2002).

El ozono (O_3), es una molécula oxidante formada por tres átomos de oxígeno, posee un color azulado a temperatura ambiente y de refrigeración, con un característico y penetrante olor acre en estado gaseoso. Es un potente oxidante termodinámico y se encuentra quinto tras el flúor, cloro, trifluoruro, oxígeno atómico y es radical libre hidroxilo (Rice y Netze, 1984).

El ozono es actualmente el agente oxidante de más rápida acción en la desinfección, proporcionando un excelente control microbiológico. El ozono es muy rápido y eficaz en su actuación, siendo además incoloro, insípido y amigable con el medio ambiente ya que no se le conoce residuales o derivados perjudiciales para la salud (Gimferrer, 2011).

Uno de los principales usos del ozono actualmente es para tratar el agua mediante la desinfección y oxidación de contaminantes químicos (USEPA, 1995).

Los compuestos oxidantes son los productos que liberan oxígeno naciente, su efecto generalmente es breve, porque el oxígeno se combina con toda materia orgánica de manera muy rápida. El espectro de actividad de los compuestos oxidantes es sobre bacterias vegetativas, virus, micobacterias y esporas. Los compuestos oxidantes que son utilizados como desinfectantes son el permanganato de potasio, peróxido de hidrógeno, ácido peracético y el ozono; siendo el último el mejor desinfectante, atacando todo tipo de microorganismos, bacterias, virus, protozoos, e inhibiendo su crecimiento (Sánchez y Sáenz, 2005).

El ozono en su fase gaseosa o acuosa está autorizado por la FDA como tratamiento antimicrobiano (USFDA, 2010). Éste es muy efectivo en reducir los microorganismos patógenos más comunes en la industria alimentaria, sin dejar residuos tóxicos y ampliamente compatibles con programas HACCP, BRC y sistemas de gestión de inocuidad. Así ha sido utilizado para la desinfección de plantas frigoríficas; también se ha visto que reduce la carga bacteriana de pescado, mariscos, todo tipo de vegetales, e incluso en utensilios, equipos y estructuras utilizados en la producción y transformación de alimentos (Kim et al., 1999).

El ozono es un desinfectante y oxidante de amplio espectro, matando con eficacia a todos los patógenos conocidos de los seres humanos y de los alimentos, incluyendo *E.coli*, *Listeria*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp, *Pseudomonas* spp que pueden destruir rápidamente los alimentos durante almacenamiento en frío, sin embargo, el ozono no deja residuos nocivos en los productos alimenticios (Guzel-Seydim et., al 2004).

Su uso se está convirtiendo en atractivo por su producto de degradación, el ozono (O₃) no deja residuos en los productos ozonizados y la vida media es muy corta. Los estudios han informado de que la vida media del ozono en los cereales de maíz fue 5,57 min, ya en el agua varió 1-10 min y **en el aire de 20-50 min**. Dada la vida media del ozono es muy corta, este gas debe ser aplicado en el mismo terreno siendo necesario únicamente

electricidad y aire u oxígeno como insumo. Este hecho ofrece varias ventajas, como la exclusión de la necesidad de manipulación y uso de envases de productos químicos, en comparación con los desinfectantes tradicionales (Paes et al., 2010).

En Europa se utiliza ozono para la conservación de carnes desde antes de la segunda guerra mundial. En todos los casos se muestra que la aplicación periódica de ozono en las cámaras de frío previene la aparición de mohos en tiempos de hasta 36 semanas. Las concentraciones de ozono empleadas en la conservación de carnes refrigeradas oscilan entre 1 y 3 ppm (Hernández, 2007).

Según Moat et. Al. (2009), la OMS indica que los niveles de exposición para el ser humano del gas ozono recomendados son 0,1 ppm durante 8 horas siempre y cuando no se emplee respiradores especiales.

El ozono es un agente antimicrobiano eficiente que tiene un gran potencial de uso en la industria de alimentos. La aplicación del ozono durante el procesamiento y / o almacenamiento aumenta la vida de estante de los productos, pero es importante considerar la concentración aplicada, ya que si es elevada puede causar daño oxidativo, olor desagradable y alteración en la coloración del alimento. El ozono en comparación con el cloro es un potente desinfectante, que se descompone rápidamente y no forma algunos de los subproductos formados por la cloración como, por ejemplo, los trihalometanos (THM). Aún es importante resaltar que la aplicación del ozono requiere algunos cuidados, por ser un gas extremadamente tóxico en concentraciones elevadas y por propiciar, así como el cloro, la formación de compuestos bromados en agua cuando en presencia del ion bromuro (Botelho et al., 2011)

Elford y Tvan (1942), señalan que concentraciones mayores de 0,1 ppm (100 ppb) generan un efecto tóxico para el humano y que aumenta conforme crece la concentración del gas. Estos datos también han sido recopilados por la World Health Organization, y manifiesta que en ambientes donde permanezcan personas más de 8 horas/días la concentración no deberá ser superior a 0,2 mg O₃/m³ o 0.1 ppm de aire ya que, si las personas son sometidas a estas concentraciones durante 3 años, se manifiestan los efectos adversos para la salud.

La FDA es más conservadora y toma como límite 0.05 ppm (0.1 mg O₃/m³ de aire) para las mismas condiciones señaladas por Elford y Tvan en 1942. (Elford y Tvan, 1942; WHO, 2011; FDA, 2011).

2.4.1 Efecto del ozono sobre los microorganismos.

Las características biocidas del O₃ son debidas a la combinación de su alto potencial oxidante y a su habilidad para difundirse por las membranas biológicas (Hunt y Mariñas, 1997). Es un efectivo **bactericida, fungicida y virucida**. Elimina microorganismos por oxidación de su bicapa lipídica, que está en función de la dosis y el tiempo de exposición (Sharrer y Summerfelt, 2007).

La inactivación de bacterias por el ozono es un proceso muy complejo debido a que el ozono ataca numerosos constituyentes celulares incluyendo proteínas, lípidos insaturados y sistemas enzimáticos respiratorios en la membrana celular, peptidoglicanos en la capa celular, enzimas y ácidos nucleicos en el citoplasma, incluyendo peptidoglucanos en capas de esporas. El ozono molecular es el principal inactivador de microorganismos, pero así mismo se enfatiza en la actividad antimicrobiana ya que los productos de su descomposición son: OH, O₂ y HO₃. Además, posee la capacidad única de destruir impurezas industriales tóxicos o nocivos (fenoles, cianuros, tetraetilo plomo y otros) y la inactivación biológica de contaminantes como virus y bacterias. (Murray et al., 2008; Chang, 1971; Glaze y Kang, 1989; Hunt et al., 1997)

Thanomsub et al. (2002) evaluaron el efecto de la exposición del O₃ (0.16 mg/min/L) sobre la estructura celular de bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) y Gram negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella spp.*) las cuales fueron expuestas durante 5, 10, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos. El tratamiento en ambos grupos ocasionó cambios en la superficie bacteriana, la destrucción incrementó con el aumento del periodo de exposición al O₃. El cambio estructural fue dividido en 3 pasos: daño a la integridad celular (30 minutos), colapso y reducción del tamaño celular (60 minutos) y lisis celular y vaciado del contenido intracelular al medio exterior (90 minutos). Los resultados obtenidos en esta investigación soportan reportes previos que mencionan que el primer punto de ataque es la

membrana bacteriana y que a un prolongado tiempo de exposición se ven afectados los componentes intracelulares.

Moat et.al. (2009), indican que al aplicar el gas ozono en la descontaminación de un ambiente y exponer ciertos microorganismos como *E.coli*, *Salmonella* spp., *S. aureus*, *E. faecalis*, indican una disminución en la población microbiana. Estos microorganismos fueron expuestos a diferentes tiempos (min) y diferentes concentraciones (ppm). Los organismos más sensibles en cualquiera de las concentraciones del estudio fueron *E.coli*, y *Salmonella* spp. Se puede considerar que se obtuvo una desinfección mayor cuando se usó una concentración del gas ozono en 5 ppm durante 45 minutos.

El ozono oxida varios componentes de la membrana que dirigen el equilibrio interno celular, causando lisis (Prabha et al., 2015). Cuando la bicapa de lípidos poliinsaturados y los grupos sulfhidrilos de las enzimas es oxidada por el ozono, se interrumpe la actividad celular normal incluyendo la permeabilidad que lleva a una muerte rápida. Según Dave (1999), el tratamiento de *Salmonella* spp., con agua ozonizada interrumpe el proceso normal de la membrana lo que fue evidenciado en el microscopio electrónico, por otro lado, pequeños tiempos de exposición de *Salmonella* spp. con gas ozono compromete la permeabilidad de la membrana, pero no inicialmente. Investigaciones posteriores de Komanapalli y Lau, (1996) concluyeron que esto se obtuvo progresivamente a exposiciones largas.

Khadre et al. (2001) señaló que el ozono ataca la pared celular de las bacterias, y rompe además su actividad enzimática al actuar sobre los grupos sulfhídricos en ciertas enzimas. A partir de este momento la bacteria pierde su capacidad de realizar la degradación de azúcares y producir gases, también indica que los virus son microorganismos acelulares, compuestos solamente de ácido nucleico y una proteína que lo encierra llamada cápside y el ozono actúa sobre estos rompiendo esta cápsula viral, dejando el ácido nucleico desprotegido. Es probable además que el ozono modifique los sitios de la cápsula viral que el virus utiliza para fijarse a la superficie de las células (Khadre et al., 2001).

Ingram y Haines (1949), encontraron que una de las principales enzimas inactivadas por el ozono es la enzima Deshidrogenasa en el sistema enzimático celular; Takamoto et al., (1992) y Chang, (1971) determinaron que el ozono ejerce su efecto bactericida frente a la *Salmonella* a través de la inactivación de enzimas del sistema respiratorio.

Investigaciones señalan que la capa de lipopolisacáridos y lipoproteínas de las bacterias Gram negativas debe ser el primer punto de ataque del O₃ que resulta en un cambio de la permeabilidad celular y por último la lisis bacteriana. Otro sitio de ataque del O₃ en la membrana son los glucolípidos y glucoproteínas, o ciertos aminoácidos. También actúa sobre los grupos sulfidril de ciertas enzimas. Las cadenas laterales de los aminoácidos son el principal sitio de reactividad con el ozono en las estructuras polipeptídicas (Kim et al., 1999).

El O₃ también puede causar daño al material genético microbiano, donde las bases pirimídicas son más sensibles, en particular la timina al originar la ruptura del ADN, así como la formación de enlaces cruzados ADN-proteínas (Kim et al., 1999). Uno de los compuestos formados por la reacción del O₃ con el ADN durante la lisis celular es el 8-oxodeoxiguanosina (Cecarini et al., 2007).

La sensibilidad de los microorganismos al O₃ puede presentar muchas afectaciones por la naturaleza orgánica del medio (Restaino et al., 1995), pues en muchos de ellos pueden no encontrarse como partículas disueltas, en especial si están presentes en los sistemas alimentarios y disminuir así la accesibilidad del O₃ en los ellos (Graham, 2000).

Guzel et al. (2003) confirmaron que el O₃ destruye los microorganismos por una oxidación progresiva de los componentes celulares de los mismos, estos autores demostraron que las bacterias patógenas: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella spp.* fueron muy sensibles a un tratamiento de O₃ de 20 ppm en agua.

Se ha estudiado también el efecto de este sobre bacterias creciendo en medios de cultivos. Los resultados de estos experimentos demostraron que a concentraciones de 0,27 x 10⁻³ g/l

de aire, el ozono demostró ser efectivo en la eliminación de cinco tipos de bacterias que causan putrefacción en pescado congelado (Da Silva, 1998).

El uso del ozono gaseoso se presenta en fábricas procesadoras de carnes en Japón es de 5-6 hr por día y a una concentración de 0,05 – 0,18 ppm, con lo que se ha logrado reducir los contaminantes presentes en el ambiente y en la superficies presentes dentro de las salas de procesamiento (S.naito y H. Takahara, 2006).

El ozono gaseoso se está utilizando actualmente en la industria a concentraciones muy bajas (0,2 - 1 ppm) durante tiempos de exposición muy prolongados, con el fin de inhibir el crecimiento fúngico durante la conservación a bajas temperaturas (Gil et al., 2008).

Feed et al. (2009), Reporta que el efecto del ozono en estado gaseoso, registra disminuciones de 25% en el recuento de aerobios totales y de 26% en enterobacterias (*Salmonella* spp.).

Ripamonti et al. (2009), señala que durante un estudio realizado dentro de las instalaciones de una planta procesadora de carnes, aplicando ozono gaseoso en una sala a 20 ° C y 60% de HR de 60 m², durante 3 horas y a una concentración de 1.1 ppm de O₃ logró reducciones en *Listeria monocytogenes* de 1.8, 2.7, 2.8, 3.1, 3.3 y 3.6 Log en los tiempos de 10, 20, 30, 45, 60 y 120 minutos. Evidenciando la alta sensibilidad al ozono gaseoso del microorganismo en las condiciones señaladas.

Selma et al. (2008), indicaron que la exposición al ozono gaseoso en concentraciones de 10000 ppm por 30 minutos logro reducir entre 2,5 y 3 logaritmos en cubos de melón frescos, obteniendo la mayor reducción en cubos de melón no maduros. Análisis posteriores señalan que la menor reducción en cubos de melón maduros se debe a que existen espacios más protegidos dentro de su corteza que permiten una mejor agregación bacteriana, lo cual causaría una penetración incompleta del ozono a las células.

El uso de ozono gaseoso en concentración constante de 1.5 ppm en tomates de árbol, durante un ensayo en refrigeración a 4 ° C y 8 días logró la reducción de mohos y

levaduras hasta en 1 unidades logarítmicas durante el periodo de estudio (Arcentales-Oña et al., 2018)

Pereira et al. (2016), durante un estudio realizado en leche cruda para evaluar la eficiencia del ozono gaseoso en la reducción del recuento de *Staphylococcus aureus* con tratamientos de ozono en concentraciones de 34,7 y 44,8 ppm de O₃ gaseoso y tiempos de exposición de 5, 10, 15, 20 y 25 minutos. Obteniendo reducciones más significativas a partir del tratamiento de 20 minutos con un máximo de 0.42 unidades logarítmicas.

Oliveira et al. (2013) Señala que durante un estudio realizado para evaluar la eficacia del ozono gaseoso en la inactivación de *E.coli* en un ambiente con humedades relativas de 18 y 30% de humedad del almidón de yuca, concentraciones de ozono de 40 y 118 ppm respectivamente y 15 - 120 minutos de tratamientos. Reportó que en la combinación de 18% de humedad, 118 ppm de concentración y 120 minutos de tratamiento con ozono, causó una reducción de solo 2 decimales en E.coli. Cuando las condiciones del ensayo fueron a 30% de humedad, 40 ppm de concentración y 60 minutos de tratamiento se logró una reducción de E.coli superior a los 7 ciclos logarítmicos.

Maldonado (2014) reporta reducciones de hasta 1 ciclo logarítmico de mohos y levaduras en granada fresca, con una dosis de 0.5 ppm a un tiempo de 20 minutos. Realizado en condiciones de refrigeración y humedades relativas superiores al 90%, la cual favorece la estabilidad y eficacia del ozono gaseoso en el control microbiológico.

(Vite, 2015) Reporta también como lo señala Maldonado (2014) reducciones de hasta 1 ciclo logarítmico en mohos y levaduras en fresas frescas, con una dosis de 0,5 ppm a un tiempo de 10 minutos, realizado en condiciones de refrigeración (4 ° C) y humedad relativa superior al 90%.

2.4.2 Formas de generar ozono

Debido a la alta volatilidad del ozono, este no permite su almacenamiento ni distribución, por lo cual debe ser generado in situ. La reacción química de formación de ozono a partir de oxígeno es de naturaleza endotérmica y no espontánea, por lo cual no es factible obtener

ozono por activación térmica del oxígeno, ya que si la temperatura supera los 50° C la molécula de ozono se desintegra y recombina para formar oxígeno molecular, el cual se reincorpora rápidamente al medio ambiente, evitando así generar alteraciones en el medio donde es generado. Actualmente se conocen diferentes técnicas de producción de ozono en forma artificial: Reacción fotoquímica, Disociación térmica, Reacción radioquímica (Gottschalk et al., 2009).

Los tres métodos principales para la generación comercial de O₃ son: 1) radiación ultravioleta, 2) descarga de corona y 3) electrólisis del agua (Rice, 2002). La descarga eléctrica y electrólisis sobre las moléculas de agua son los métodos más comunes. Sin embargo, en la industria se utiliza principalmente la descarga eléctrica, ya que presenta la mejor relación entre cantidad producida / consumo energético, resaltando que durante el proceso solo un 4% a 12% de la energía suministrada es utilizada para la generación, mientras que el resto se transforma en luz y calor (Parzanese, 2011).

Presentando mayor ventaja económica la radiación ultravioleta, debido a lo compacto del equipo, fácil transporte, bajo consumo energético, sin necesidades de grandes cantidades de energía eléctrica ni un sistema de circulación de agua específico para generar la electrólisis del agua.

2.5 SALMONELLA

2.5.1 Características de la Salmonella

Salmonella es un género del Bergey's Manual, se propone a *S.choleraesuis* como especie tipo (Jay, 1994). Le Minor y Popoff (1987) citado por OMS (1996), han propuesto un cambio a esta clasificación en el cual el género Salmonella pasa a constituirse en solo 2 especies: *Salmonella entérica* con las subespecies *S. entérica* subsp. Enterica, *S. entérica* subsp. Arizonae, *S. entérica* subsp. Diarizonae, *S entérica* subsp. Houtenae y *S. entérica*

La primera cepa de *Salmonella* fue descubierta por el médico veterinario Daniel Salmón en 1885. Desde entonces, las salmonelas han sido identificadas como la causa más importante de fiebre entérica (ICMSF, 1998).

El género *Salmonella spp.* se ubica dentro del orden Enterobacteriales y la familia Enterobacteriaceae. Sus miembros son bacilos Gram negativos, generalmente móviles por flagelos periticos (excepto *Salmonella gallinarum*), anaerobios facultativos no encapsulados y no esporulados de hasta 3µm de longitud (Quinn et al. 2002; Méndes et al., 2006)

La diferenciación entre las especies y subespecies se realiza tomando en cuenta diferentes propiedades bioquímicas. No fermentan la Lactosa, excepto *Salmonella choleraesuis* subsp. *arizonae* y *Salmonella choleraesuis* subsp. *diarizonae*, fermentan Glucosa con producción de gas, no producen Indol, no degradan la urea, descarboxilan Lisina y Ornitina (Quinn et al., 2002).

Las salmonelas se desarrollan entre 25 y 45° C y a un pH de 4 a 8, estando el óptimo entre 6,5-7,5; no sobreviven a temperaturas mayores de 70° C (Lennette, 1982; Koneman et al., 1998; Walker, 1999). Sin embargo, la mayoría de las especies crecen bien a 37 ° C, es importante considerar que algunas especies crecen mejor entre 25-30° C. Las Salmonelas por ser anaerobias facultativas tal como lo indica Quinn et al. (2002), se distribuyen alrededor del mundo y pueden ser encontradas en el suelo, agua, plantas, alimentos y animales (Famiglietti et al. 2005).

La multiplicación de la Salmonella puede ocurrir entre 7 ° C y 47° C, actividad de agua superior a 0.94 y pH entre 4 y 8, siendo 37° C su temperatura óptima de crecimiento (Simonsen, 1987 citado por Jay, 1994). Las temperaturas más bajas de multiplicación corresponden a *S. bredney*, *S. typhimurium*, *S. agona*, *S. senftenberg* y *S. hadar* (Alcock, citado por Granados et al., 1996).

2.5.2 Enfermedades relacionadas con Salmonella

La Salmonella es uno de los géneros bacterianos que se encuentra asociado a brotes de enfermedades de origen hídrico, ya que son aislados de agua fresca, aguas servidas, agua dulce y agua salada, además de ciertos alimentos (Palacios et al., 1999).

La alta frecuencia de agentes que producen enfermedades infecciosas gastrointestinales relacionadas con fiebres infecciosas por el consumo de moluscos es provocada por microorganismos patógenos como *Escherichia coli*, *Vibrio spp.*, *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* Constituyen uno de los problemas de salud pública más extensos en México y en particular del estado de Veracruz (DGE, 1993).

La *Salmonella* puede causar enfermedades diarreicas en los humanos. Son de tamaño microscópico que pasan de las heces de las personas o animales a otras personas u otros animales. Existen dos tipos de salmonellas, *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium*, son los más comunes en los Estados Unidos y son los responsables de la mitad de todas las infecciones en humanos. Si la *Salmonella* está presente en el alimento, usualmente no afecta el sabor, olor o apariencia de los alimentos. La bacteria vive en el tracto intestinal de los animales y humanos infectados (USDA, 2016).

El género *Salmonella* es el agente causal de dos síndromes: "la fiebre entérica" causada por *S. Typhi* y a "la fiebre paratifoidea" causada por *S. Paratyphi* A, B y C; y la gastroenteritis o envenenamiento por alimentos que es una infección restringida a la mucosa intestinal (Quiñones et al., 2000)

Con fines epidemiológicos, las *Salmonellas* pueden clasificarse en 3 grupos de acuerdo a su adaptación a hospederos humanos y animales (Jay, 1994) y son los siguientes:

Grupo 1. Las especies pertenecientes a este orden causan la fiebre entérica más grave de todas las producidas por las *Salmonellas* y solo atacan a humanos y primates superiores. En esta están *S.typhi* y *S. paratyphi*.

Grupo 2. Las especies aquí incluidas causan enfermedades en ciertos animales, rara vez en humanos; en esta se incluye la *S. gallinarum* y *S. pullorum* que atacan a las aves.

Grupo 3. Estas especies no tienen preferencia de hospedero, son patógenas para las personas y otras especies animales e incluyen a la mayoría de especies que causan

salmonelosis transmitidas por alimentos de los cuales la *S.typhimurium* es la más frecuente a escala mundial.

Sobre la base de diversas investigaciones se puede afirmar que del 59 al 98% de las Salmonellas son enteropatógenicas (OMS, 1996). Mossel y Moreno (1985) señalan que en las infecciones alimentarias humanas, hay una predominancia casi general de una docena de serotipos. En orden decreciente de presentación estos serotipos son los siguientes: *S. typhimurium*, *S. panamá*, *S. Stanley*, *S. Heidelberg*.

Thatcher (1973), declaró que la salmonelosis es una enfermedad que afecta al tracto intestinal, más grave en niños y ancianos; pudiendo producir, en algunos casos, la muerte en individuos de todas las edades. La lucha contra la salmonelosis exige la actuación en los diversos eslabones del ciclo epidemiológico. Este ciclo comienza con la contaminación de algunos componentes de los piensos para animales, tales como la harina de pescado y otros concentrados proteicos, debido a un inadecuado control sanitario o antihigiénicas prácticas de fabricación. La patogenia comienza con la ingestión de inóculos que pueden variar entre 10^2 y 10^6 células, si el inóculo es suficientemente grande superará la barrera la barrera gástrica que supone el pH ácido. Reportó también que la Organización Mundial de la Salud, sugirió la formación de un “Centro Internacional de Información sobre Salmonelosis” debido a que se la considera un problema internacional.

La dosis infectante es variable, según el serovar y la especie (las especies adaptadas al hombre poseen dosis infectantes menores a las no adaptadas). En general el número de células necesarias para desencadenar la sintomatología oscila entre 10^3 y 10^6 para unas (Varnam y Sutherland, 1998). Y 10^9 a 10^{11} para otras (Jay, 1994). Sin embargo, D’Aoust (1989) citado por Jay (1994) relata haber constatado a través de estudios epidemiológicos que *Salmonella typhimurium* puede presentar una dosis infectante de solamente una célula.

Jay (1994) afirma que, a partir del momento de ingestión de alimentos, los síntomas pueden tardar en aparecer de 12 a 14 horas aunque se han señalado periodos de incubación más cortos o más largos que el indicado. Los síntomas consisten en náuseas, vómito, dolor abdominal, cefalalgia, escalofríos y diarrea. Estos síntomas suelen ir acompañados de

abatimiento, debilidad muscular, fiebre moderada y somnolencia. Estos síntomas pueden durar de 2 a 3 días. Se presenta un índice medio de mortandad es de 4,1%.

Entre los factores de virulencia de la *Salmonella* destacan una enterotoxina y una citotoxina. La enterotoxina puede actuar de modo parecido a las enterotoxinas de *Vibrio cholerae* y *E.coli* Esta toxina es termolábil (100 ° C), tiene un peso molecular de 110 k Dalton y un punto isoeléctrico de 4,3 a 4,8. Además las lesiones que aparecen en las células de la mucosa intestinal durante la salmonelosis son producidas por una citotoxina. Una vez dañada la mucosa intestinal esta es invadida con facilidad por los microorganismos infectantes, que en tal caso pueden ocasionar otras lesiones tisulares (Jay, 1994).

La salmonelosis es producida por un grupo de salmonellas que general una infección gastrointestinal, a veces complicada por una extensión septicémica a localizaciones fuera del tracto intestinal. Los síntomas gastrointestinales se caracterizan por fiebre, diarrea, dolores intestinales y vómito. La gravedad de los síntomas puede variar desde ligero malestar a deshidratación grave. Los porcentajes de casos complicados y la mortalidad son, por lo general, bajos. La enfermedad es grave en niños y ancianos. Sin embargo se han llegado a registrar en 1953 en Suecia 105 muertes a raíz de un brote de *Salmonella* según señala Lundbeck en 1955 (ICMSF, 1999).

El grupo de salmonellas representa colectivamente al conjunto de patógenos bacterianos que presenta mayor transmisión e infección por medio de los alimentos y que afectan de forma negativa al ser humano. La salmonelosis le cuesta a la economía mundial miles de millones de dólares por año, en cuanto a gastos por atención médica y pérdida de la productividad (Anderson et al., 2010).

La Fiebre Tifoidea es producida generalmente por el grupo de *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A. generalmente *Salmonella paratyphi* B., eventualmente *Salmonella paratyphi* C. Las bacterias de *Salmonella* ingeridas alcanzan el intestino delgado, desde el cual penetran a los linfáticos y luego al torrente sanguíneo. Se transportan por la sangre a muchos órganos, incluso el intestino. Los microorganismos se multiplican en el tejido linfoide intestinal y se excretan en las heces. Luego de un periodo de incubación de 10 a 14 días, se presentan fiebre, malestar, cefalea, estreñimiento,

bradicardia y mialgia. La fiebre se eleva hasta una meseta máxima, y el bazo y el hígado se hipertrofian (Melara, 2012).

De acuerdo a los Centros de Control y Prevención de Enfermedades en el 2017 (CDC, por sus siglas en inglés), la Salmonellosis causa un estimado de 1.4 millones de casos de enfermedades transmitidas por alimentos y más de 400 muertes anualmente en los Estados Unidos. El reporte de investigación del Programa Activo de Investigación de Enfermedades Transmitidas a través de los Alimentos (FoodNet, por sus siglas en inglés) del 2007, identifica a la Salmonella cómo la infección bacteriana más común reportada (USDA, 2016).

2.5.3 Alimentos involucrados con presencia de Salmonella

Durante un estudio realizado por Sarcos y Botero (2005). Determinaron la presencia de Salmonella en el 50% de muestras tomadas de almeja *Polymesoda* en una playa del municipio de Miranda en el estado de Zulia durante un estudio de calidad microbiológica de la almeja realizada en agosto del 2002. Lo que señala que la presencia de salmonella en playas y bahías es de muy alta probabilidad en organismos filtradores.

Quiñones et al. (2000). Se determinó la presencia de Salmonella en 11% de las almejas muestreadas en la zona norte del golfo de México, en el estado de Veracruz, atribuyendo la presencia de esta a las condiciones medio ambientales y la fauna presente en la zona, el estudio en mención fue realizado entre los meses de enero y noviembre de 1998, abarcando todas las estaciones del año.

Graham (1980) Afirmó que las *Salmonella enteritidis* y *Typhimorium* se encuentra entre los microorganismos asociados con la infestación de alimentos para humanos y animales. Siendo la harina de pescado en particular, la que puede tener mayor probabilidad de estar contaminada con Salmonella.

La capacidad de sobrevivencia de la Salmonella también está en función al sustrato en el que se desarrolla, así por ejemplo se encontró que una cepa de *S. typhimurium* tenía una sobrevivencia del 10% luego de 393 días almacenadas a -18 ° C en pescado, mientras que

su sobrevivencia fue de 0,01% cuando fueron mantenidas en caldo a la misma temperatura (Noskowa, 1972).

El SANIPES entre los meses de febrero y abril del año 2017 reportó presencia de *Salmonella* en conchas de abanico en las bahías Independencia en Ica, Guaynuna en Ancash y Sechura en Piura. Adicionalmente en el mes de noviembre del año 2014 SANIPES reportó la presencia de *Salmonella* en las áreas de La Pampa en bahía independencia y Gallinazo en Pucusana.

2.5.4 Control de la Salmonella

En la actualidad el control microbiológico empleado sobre los productos pesqueros radica en el uso de compuestos o sustancias cloradas, estos controles pueden ser mediante inmersión en soluciones cloradas y lavado de los productos pesqueros en sustancias cloradas.

Además, los productos pesqueros se procesan, manipulan y comercializan a temperaturas de refrigeración y/o congelamiento, asegurando la destrucción y condiciones no favorables para el desarrollo de los microorganismos mediante la aplicación de un tratamiento térmico y la inocuidad del producto que llega hasta las manos del consumidor.

2.5.5 Técnicas de detección de Salmonella

Las estimaciones de la carga de patógenos son necesarias para poder definir las medidas correctivas que deben de aplicarse en un proceso y para estar en capacidad de probar la eficacia de nuevas estrategias de acción. Las estimaciones de prevalencia no son suficientes para evaluar la eficiencia de los métodos de intervención (tratamientos), lo que surge como un obstáculo y pone de manifiesto la necesidad de enumerar de forma rentable y segura los agentes patógenos a partir de muestras (Brichta-Harhay et al. 2008).

Cada tipo de recuento de microorganismos viables es potencialmente útil para fines específicos. Los recuentos de bacterias viables se basan en el número de colonias que se desarrollan en placas enriquecidas con medios, previamente inoculadas con cantidades

conocidas del alimento a analizar, diluido e incubadas en condiciones ambientales predeterminadas (Padilla, 2007).

Existen diversas metodologías que pueden ser utilizadas para la detección de *Salmonella spp.* Una de estas opciones es la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR). Esta proporciona algunas ventajas en cuanto a la eficiencia, sensibilidad y disminución del tiempo de detección, debido a que lleva a cabo simultáneamente los procesos de amplificación y detección en el mismo vial y determina la cantidad de ADN sintetizado en cada momento de la reacción (Yáñez et al., 2008, Terzolo et al., 2006). Sin embargo, presenta el inconveniente de ser una técnica económicamente costosa (Padilla, 2007).

La técnica se basa en la determinación de presencia o ausencia en réplicas de diluciones consecutivas. El estimado de densidad poblacional se obtiene del patrón de ocurrencia en diluciones seriadas y el uso de una Tabla probabilística. Algunas ventajas del NMP son que provee una recuperación uniforme de las poblaciones microbianas y determina sólo organismos vivos y activos metabólicamente, pero presenta el inconveniente de ser una técnica muy laboriosa, que dificulta la eficiencia del trabajo en el laboratorio (Camacho et al., 2009).

En contraste, se desarrollan otros métodos de enumeración basados en la siembra directa en placa, tales como el método de recuento en placa espiral (SPCM) y el método de filtración con membrana hidrofóbica (HGMF). Estos tienen la ventaja de proporcionar una medida de los recuentos bacterianos viables sin una etapa de enriquecimiento, además se pueden realizar con un costo mucho menor en comparación con NMP o PCR (Brichta-Harhay et al., 2008).

Los caldos de enriquecimiento no selectivo incluyen el agua peptonada y el caldo lactosado (Terzolo, 2011). Estos son utilizados para el cultivo de muestras en las que los organismos han sufrido daños subletales, como los generados durante el procesamiento, debido a la exposición a altas temperaturas, desinfectantes o deshidratación (Elizondo, 2006).

Los agares Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD), *Salmonella-Shigella*, Hektoen-Entérico (HE) y Sulfito de Bismuto (BS) son adecuados para la detección y el aislamiento de la mayoría de colonias de *Salmonellas* (Terzolo, 2011).

Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD), medio para el aislamiento y diferenciación de enterobacteriáceas patógenas, especialmente especies de *Shigella* sp. y *Salmonella* sp. El efecto inhibitor de este medio de cultivo es débil; el desoxicolato genera la inhibición de bacterias coliformes y permite la dispersión de cepas de *Proteus* que puede llegar a confundirse con las colonias producidas por *Salmonella*; adicionalmente, la diferenciación entre *Salmonella spp.* y *Shigella* sp. se da porque la primera produce fermentación de Xilosa, descarboxilación de Lisina y genera ácido sulfhídrico (Hurtado, 2001).

La forma de acción del medio se basa en que la degradación a ácido de la xilosa, lactosa y sacarosa produce un viraje del medio a amarillo, por el indicador rojo de fenol. El tiosulfato y la sal de hierro, revelan la formación de ácido sulfhídrico por la precipitación de sulfuro de hierro (negro) en las colonias. Las bacterias que descarboxilan la lisina, se reconocen por la presencia de un color rojo purpúreo, debido al aumento del pH alrededor de sus colonias, (Merck, 1994; Murray et al., 2004).

La USDA/FSIS (2011) recomienda el Agalar Xilosa-Lisina-Tergitol 4 (XLT4) y Agar Sulfa-Verde Brillante (BBG sulfa) para el aislamiento de cualquier serotipo de *Salmonella spp.* USFDA (1995) recomienda para el aislamiento de *Salmonella*. Partiendo de carnes, un enriquecimiento no selectivo de 25g de muestra en caldo lactosado por 24 ± 2 hr a 35°C para luego proceder un enriquecimiento selectivo de 0,1 mL en 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis con incubación a $42 \pm 0,2^\circ\text{C}$ por 24hr, enseguida estriar dos o más colonias en agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) e incubar por el mismo periodo, luego del cual las colonias de *Salmonella* se ven rosadas pudiendo o no tener centro negro.

El pre-enriquecimiento se puede llevar a cabo o no, dependiendo del grado de probabilidad de que en el alimento existan células dañadas. Se utilizan cuando se analizan alimentos que han sido calentados, congelados o desecados y en aquellos en donde es de esperar que se encuentren células de *Salmonella* en escaso número (ICMSF, 1998).

El enriquecimiento selectivo tiene por finalidad inhibir el crecimiento de otros microorganismos a la vez que permiten que las Salmonelas crezcan. Se consiguen mediante la adición de compuestos químicos inhibidores a una temperatura y duración de la incubación determinada.

2.6 USOS DEL CLORO EN LA DESINFECCIÓN Y LOS TRIHALOMETANOS

El cloro y los desinfectantes químicos son efectivos en mayor o menor medida para matar los microorganismos nocivos. Actualmente se sabe que cualquier desinfectante empleado produce en el agua potable su propia colección de sub productos (Richardson et al., 1998). Esta es la razón por la cual la mayoría de los países más desarrollados han publicado normas o directrices para el control de los sub productos y así minimizar la exposición de los consumidores a sustancias químicas potencialmente peligrosas, manteniendo al mismo tiempo una desinfección adecuada y el máximo control posible de agentes patógenos.

Desde que se detectaron los THMs se han realizado estudios para comprender su formación y los efectos sobre la salud de estos y otros sub productos. Actualmente en la literatura se pueden encontrar más de 600 sub productos (Richardson et al., 1998, GA Boorman 1999, Y-T Woo 2002) que se detectan cuando se emplean como desinfectante algunos de los siguientes reactivos: cloro, cloraminas, dióxido de cloro e incluso el ácido peracético (Monarca et al., 2002). plata-peróxido de hidrógeno (Batterman, 2000) y UV-dióxido de titanio (Richardson et al., 1998).

2.6.1 Trihalometanos

En la década de los 70, a través de investigaciones desarrolladas en Estados Unidos mediante cromatografía de gases y espectrómetro de masas, se detectó la formación de subproductos de la cloración, entre los que destacan los trihalometanos (THM), especialmente el cloroformo, bromodiclorometano, dibromometano y bromoformo, posibles causantes, precursores o incentivadores de diversas dolencias y enfermedades. (Olmedo, 2008).

Los trihalometanos constituyen un grupo de compuestos orgánicos, que como su nombre lo indica, se considera por su nomenclatura como derivados del metano (CH₄), en cuya

molécula, tres átomos de hidrógeno han sido sustituidos por igual número de halógenos como el cloro, flúor, bromo o yodo. (Olmedo, 2008). La formación de los trihalometanos se desarrolla en dos fases; la primera supone el 20 al 25% del total, tiene lugar en las primeras 24 horas y, la segunda, durante los 4 ó 5 días siguientes. Con esta cinética de reacción tan lenta, la formación de THM se ve favorecida por la presencia de materia orgánica en el agua, además del aumento del pH, aumento de la temperatura, aumento de la dosis de cloro y aumento del tiempo de contacto del cloro con el agua. (Olmedo, 2008).

Existen variables importantes que influyen en la formación de THMs, como son: tiempo de contacto, temperatura y pH. Aumentando el tiempo de contacto la formación de THMs aumenta. Sin embargo, la concentración de otros sub productos como trihalocetonas, trihaloaldehídos y trihalonitrometanos disminuye con el tiempo como resultado del proceso de hidrólisis dando lugar, generalmente, a los correspondientes THMs. Esto indica que estos compuestos son intermediarios en la formación de THMs. (De Ciurana, 2000). Respecto al pH, se demostró cómo afecta dicha variable en la formación de THMs, con una relación directamente proporcional (Peters et al., 1980).

Se han realizado diversos estudios científicos sobre los efectos de los THM sobre la salud humana, concluyendo que el cáncer de vejiga está asociado a la exposición a concentraciones superiores a los 75 mg/l de THM durante 35 o más años. Del mismo modo, incrementa el índice de cáncer de colon y se cree, aunque los estudios no son concluyentes todavía, que puede incidir en otros tipos de cáncer. (Olmedo, 2008).

Según la OMS, este tipo de riesgo se considera a largo plazo, ya que requeriría el consumo de agua durante toda una vida, como es el caso de la mayoría de los productos cancerígenos. Según esta organización, la exposición a estas sustancias, que se pueden visualizar en la Tabla 7 suponen un riesgo de cáncer de 10-5%, es decir, un caso de cáncer por 100.000 personas que consumen el agua en un periodo mínimo de 70 años. (Sanchez, 2008).

Tabla 7: Principales Trihalometanos

Trihalometanos	
Benzaldehido	Cloropicrin
Benzilcianida	Dibromoacetanitrilo
Bromoetano	Dibromiodometano
Bromobutano	Dibromometano
Bromocloroacetanitrilo	Ácido dicloro acético
Bromocloriodometano	Diclorodibromometano
Bromoclorometano	Dicloroacetanitrilo
Bromodiclorometano	Dicloriodometano
Bromoformo	Diclorofenol
Bromopentacloroetano	Dicloropropano
Bromotricloroetileno	Hexacloropentadieno
Tetracloruro de carbono	p-hidroxibenzilcianida
Cloral	Iodoetano
Clorobutano	Metilbromodicloroacetato
Clorodibromometano	1,1,1 - tricolo acetanitrilo
Clorodimetano	Tricloro fenol

FUENTE: Sanchez, (2008)

El ozono está siendo empleado frecuentemente para el control de los THM y otros sub productos de la desinfección realizada con compuestos clorados. El tratamiento que emplea ozonización seguida por cloración es el más efectivo para reducir THM y otros subproductos halogenados, aunque se encuentran incrementos en algunos compuestos como el cloropicrin y aldehídos (Sanchez, 2008).

2.7 VALOR DE REDUCCIÓN DECIMAL

La sensibilidad de un organismo hacia el ozono se expresa en términos de la dosis de ozono requerida para destruir una determinada fracción de la población. Si se emplea una dosis de 10 ppm de O₃ gaseoso para destruir el 90% de una población de un microorganismo en particular, entonces este valor es conocido como dosis de reducción decimal o que es la dosis necesaria para reducir una población microbiana por un factor de 10, la cual se obtiene de la expresión:

$$\text{Log} \frac{N}{N_0} = -1 \frac{D}{\text{Valor } D}$$

No = Población inicial

N = Población luego de la dosis D

D = Dosis de ozono en ppm

Valor D = Tiempo de tratamiento para reducir la población en un ciclo logarítmico.

Mulder (1983) enumera diferentes factores que se deberían tener en cuenta durante la determinación del valor D y son los siguientes:

- Biotipo
- Serotipo
- Número de UFC/g inicialmente presente (N_0)
- Distribución homogénea o heterogénea de las colonias en la muestra.
- Condición fisiológica de las colonias
- Competición de Salmonella. con otros microorganismos presentes.
- Medio de ozonización y temperatura (Fisher y Pflug, 1976)
- Ozonización como proceso
- Métodos de aislamiento y recuento de las células supervivientes
- Técnicas de muestreo
- Temperatura de conservación luego de la ozonización

Vestergaard (2001) Señala que, al llevar un estudio de reto microbiológico, un número de factores deben de ser considerados, los cuales son:

- Selección de agentes patógenos apropiados
- Nivel de inóculo de exposición
- Preparación del inóculo y el método de inoculación
- La duración del estudio
- Factores de formulación y condiciones de almacenamiento / transporte

III. METODOLOGÍA

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

La investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Pesquera de la UNALM, las instalaciones de la empresa Tecnofood SAC y en el laboratorio de Microbiología de la empresa FS Certificaciones, Donde fue desarrollado el análisis microbiológico de las muestras post tratamiento.

3.2 MUESTRA DE ESTUDIO

Tallo de concha de abanico (*Argopectum purpuratus*)

3.3 MATERIALES Y EQUIPOS

Los materiales y equipos empleados en el presente trabajo de investigación fueron los siguientes:

3.3.1 Materiales

- Bolsas estériles Whirl pak®
- Cepa de *Salmonella spp.*
- Medios de cultivo TSB, TSA
- Bolsas de primer uso de polietileno
- Agua destilada estéril
- Solución salina al 85%
- Alcohol 70°
- Algodón
- Cajas isotérmicas
- Gelpack

- Termohigrómetro
- Guantes
- Tubo de ensayo patrón con solución Mc Farland 0.5
- Pinzas de acero inoxidable
- Materiales de laboratorio: Pipeta graduada, piseta, tubos de ensayo, asa Kolle, Mechero Bunsen y grilla.
- Tiosulfato sódico al 1.8% ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)
- Solución clorada de 10 ppm

3.3.2 Equipos

- Balanza analítica ($s = 0.01\text{g}$)
- Equipo generador de ozono Flo D mini, marca JIMCO
- Tolla ozonizadora (volumen = 0.12 m^3)
- Vortex o Agitador
- Autoclave
- Estufa / Secadora
- Incubadora

En la figura 4. Se observa el equipo de la marca JIMCO modelo FLO D MINI de fabricación danesa, el cual cuenta con las características y certificaciones de ser un equipo aprobado para su uso en el procesamiento de los alimentos por la FDA y el USDA-NOP. Los cuales permiten que el ozono sea aplicado en procesos como la desinfección de alimentos y ambientes donde se elaboran alimentos. Este equipo se encontró ubicado en las instalaciones de la empresa TECNOFOOD S.A.C en el distrito de Chorrillos, Lima, Perú.



Figura 4: Equipo ozonizador con tolva de exposición

3.4 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La presente investigación comprendió un estudio del tipo experimental, en razón que de manera intencional se realizó la manipulación de variable dependiente tiempo, a fin de conocer y evaluar el efecto del ozono gaseoso a una concentración de 10 ppm en diferentes tiempos de exposición (5, 20, 40 y 60 min) y concentraciones de inóculo de *Salmonella spp.* distintas.

En la figura 5 se observa las cinco etapas que conformaron la metodología experimental desde la preparación del inóculo hasta el análisis de resultados.

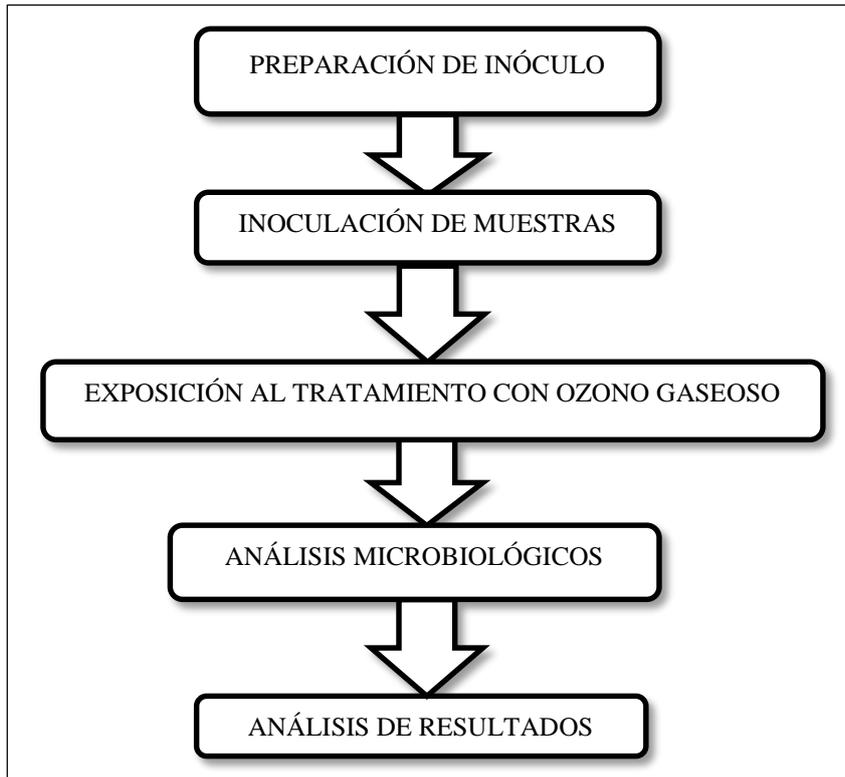


Figura 5: Flujo de proceso

En la Figura 6 se presentan las etapas que conformaron el diagrama experimental, desde la toma de muestras, verificación de la concentración de inóculos, número de repeticiones aplicadas y tiempos de exposición al ozono gaseoso.

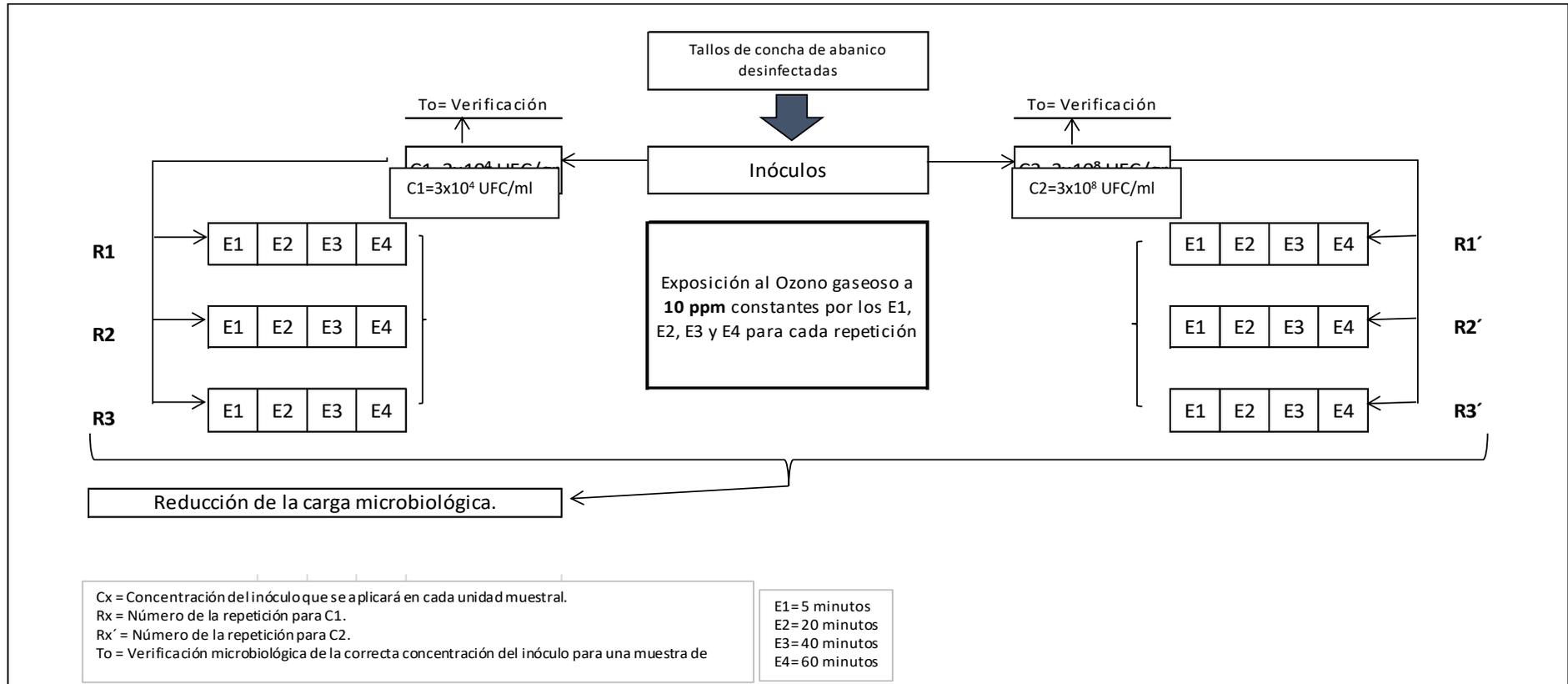


Figura 6: Diagrama experimental

3.4.1 Preparación del inóculo

La cepa de *Salmonella spp* fue cultivada en el caldo Trypticase de soya (TSB) a 37 °C por 24 horas, posteriormente se realizó la siembra en placas con Trypticase soya agar a 37 °C por 24 horas. El inóculo se preparó según el patrón Mc Farland 0.5 y con el uso de diluciones decimales sucesivas se obtuvieron los inóculos teóricos de 3×10^8 UFC/ml (concentración alta) y 3×10^4 UFC/ml (concentración baja) a utilizar en el estudio (**Ver anexo II**)

Los niveles de inóculo son los recomendados por la FDA en estudios de reducción microbiológica o también conocidos como de desafío, donde se indica que para este tipo de estudios al menos debe de emplearse concentraciones de 6–7 log UFC/g para estudios que pretendan demostrar o documentar el grado de inactivación de los microorganismos generalmente patógenos con algún tratamiento aplicado (FDA, 2001). Además, se empleó un inóculo de baja concentración (2-3 log UFC/g) el cual podría reflejar un escenario de contaminación con origen natural. Según los autores Varnam y Sutherland, (1998). Señalan que las dosis infecciosas para algunas serovariedades de *Salmonella* están alrededor de 10^3 UFC y 10^6 UFC Y 10^9 UFC a 10^{11} UFC según (Jay, 1994).

3.4.2 Verificación microbiológica para la concentración de inóculos

La concentración de ambos inóculos se verificó mediante el recuento en placa de *Salmonella spp.*, empleando el medio de cultivo tripticase soya agar (TSA), con la finalidad de poder confirmar el valor real del recuento de la concentración teórica de los inóculos que se emplearon en las muestras trabajadas (T_0 de Verificación en la figura 6).

3.4.3 Inoculación de muestras

I. Obtención de muestras

Las conchas de abanico fueron obtenidas al azar en el terminal pesquero de Villa María del Triunfo, teniendo en consideras que las mismas sean comercializadas frescas (valvas cerradas) El traslado de las muestras fue realizado dentro de un contenedor isotérmico a una temperatura promedio de 4 °C, el tiempo de traslado hasta las instalaciones del laboratorio fue de 30 minutos donde se realizó la limpieza de las valvas e inicio del proceso de inoculación.

II. Limpieza y desinfección de muestras

Los tallos fueron retirados de sus valvas, vísceras, líquido inter valvar y gónadas. Los tallos limpios fueron sometidos a un proceso de desinfección mediante inmersión en 3 litros de una solución clorada a temperatura de aproximada de 5°C, con una concentración de 10 ppm por un tiempo de 30 segundos, la cual permitió asegurar que los tallos de concha de abanico se encuentren libres de patógenos y microorganismos antes de ser empleados en las pruebas de desafío en el presente estudio.

Luego de realizada la desinfección con la solución clorada de 10 ppm, se lavó los tallos de concha de abanico en 3 litros agua destilada estéril y se realizó la adición de 6 ml de Tiosulfato sódico al 1.8% por 60 segundos, con la finalidad de neutralizar el efecto residual del cloro proveniente de la solución clorada, para finalmente verificar la ausencia del *Salmonella spp* en las muestras mediante una prueba de ausencia en 25g de muestra.

La metodología que fue empleada en el presente estudio para la inoculación fue la sugerida por la (FDA, 2001). Se procedió a seleccionar 26 unidades experimentales (tallos de concha de abanico); cada unidad experimental registró un peso de $25g \pm 0,01g$. Una vez pesadas todas las unidades experimentales se procedió a dividir las en dos grupos de 13 unidades cada uno. Al primer grupo se le inoculó 2.5 ml de inóculo a cada unidad experimental bajo una concentración teórica de 3×10^4 UFC/ml o su equivalente real de 2.31×10^2 UFC/g (concentración baja) de *Salmonella spp*. Al segundo grupo se le inoculó también 2.5 ml a cada unidad experimental bajo una concentración teórica de 3×10^8 UFC/ml o su equivalente real de 2.30×10^6 UFC/g (concentración alta) de *Salmonella spp*. Una vez realizado el proceso de inoculación se dejó reposar por 20 segundos en un ambiente refrigerado las unidades experimentales para la absorción del inóculo.

III. Exposición de las muestras al tratamiento con ozono gaseoso

La aplicación de los tratamientos con ozono gaseoso se realizó dentro de las instalaciones de la empresa Tecnofood SAC. Tomando las medidas de seguridad necesarias para desarrollar el estudio sin riesgos hacia la salud del personal involucrado. Durante el desarrollo de la presente etapa del estudio se extrajo una unidad experimental de cada grupo, las cuales (02 unidades experimentales) representaron las muestras blanco (To:

Tiempo de exposición al ozono gaseoso = 0 min), quedando 24 unidades experimentales divididas en grupos de 12 unidades experimentales con la concentración de inóculo correspondiente

Los tratamientos de exposición al ozono gaseoso se realizaron bajo condiciones normales y con una concentración constante de ozono a 10 ppm o su equivalente de 19.62 mg O₃/m³; se empleó la concentración de 10 ppm para desinfección, considerando que en procesos exclusivamente de conservación en productos hidrobiológicos frescos (Parzanese, 2011), se utilizó 3 ppm. Además, no existe contraindicación o limitación por la FDA sobre la concentración de ozono gaseoso que se puedan emplear en procesos donde se vean involucrados alimentos, debido a que el ozono presenta la característica de ser un gas altamente inestable, el cual no genera resistencia por los microorganismos y que después de su acción bactericida termina disociándose en átomos de oxígeno (Gimferrer, 2011).

La concentración del ozono gaseoso dentro de la tolva de exposición fue monitoreada durante la aplicación de todos los tratamientos, con la ayuda del propio sensor incorporado internamente en el equipo Flo D Mini, el cual se encuentra ubicado dentro de la tolva de exposición. Los tiempos de exposición que se aplicaron de manera aleatoria fueron de 5, 20, 40 y 60 minutos y los cuales fueron realizados por triplicado. La exposición al ozono gaseoso fue en forma nebulizada ascendente y descendente, las muestras se mantuvieron estáticas dentro de la tolva de exposición, la cual se encontraba herméticamente sellada y desinfectada previamente.

La tolva de exposición se encontraba anexada en la parte superior del equipo generador de ozono gaseoso, generando una conexión directa entre la zona de producción de ozono gaseoso y la tolva de exposición. El proceso de exposición y retiro de muestras de la tolva de exposición fue según el orden determinado mediante la Tabla de diseño aleatorizada elaborada por el Minitab, retirando cada unidad experimental de manera individual a una bolsa estéril Whirlpak, procediendo a rotularla y colocarla en un cooler isotérmico, para ser trasladada al laboratorio para el análisis de recuento de *Salmonella spp* según el esquema experimental. El traslado de las unidades experimentales hacia las instalaciones donde se realizó la exposición al ozono gaseoso se realizó empleando un cooler isotérmico con el uso de gelpacks en su interior a una temperatura promedio de 4 ° C y un tiempo de traslado

de 30 minutos. La distribución de las unidades experimentales se muestra en las figuras 7, 8, 9 y 10. A continuación, se presenta la leyenda para poder interpretar la codificación las cuales fueron rotuladas durante su exposición al ozono gaseoso.

Leyenda:

MxTxRx

Mx = Concentración de inóculo teórico (10^6 UFC/g; la cual corresponde al valor de 2.30×10^6 UFC/g y Concentración de inóculo teórico 10^2 UFC/g; la cual corresponde al valor de 2.31×10^2 UFC/g).

Tx = Tiempo de exposición (5, 20, 40 y 60 minutos)

Rx= Número de la repetición del tratamiento (1, 2 y 3)

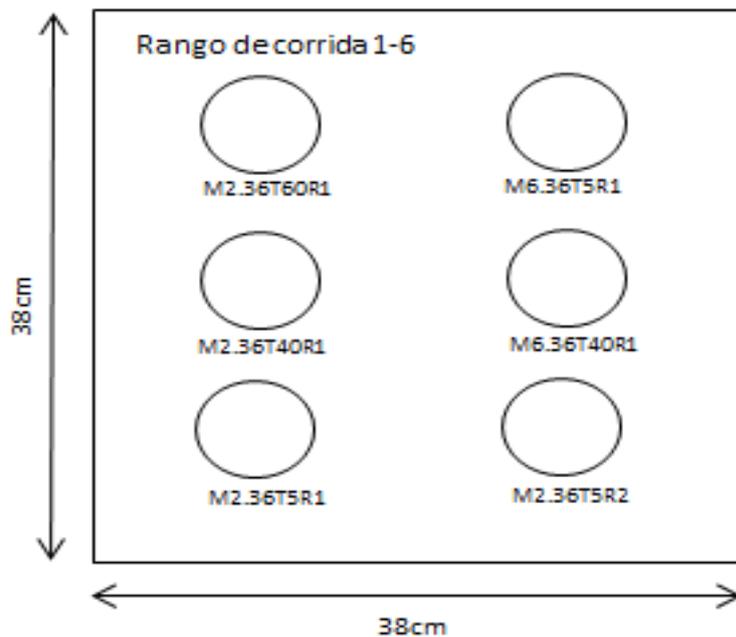


Figura 7: Distribución de las muestras dentro de la tolva del ozonizador orden 1-6

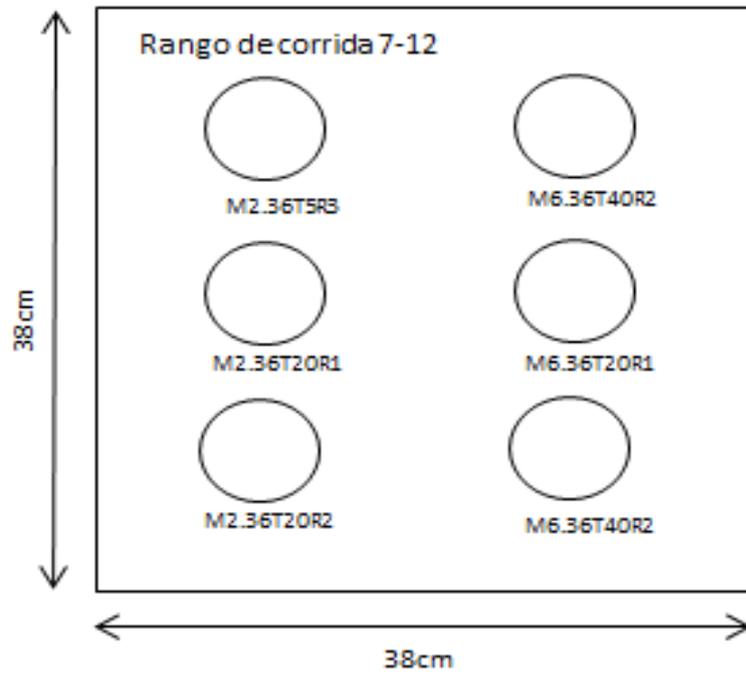


Figura 8: Distribución de las muestras dentro de la tolva del ozonizador orden 7-12

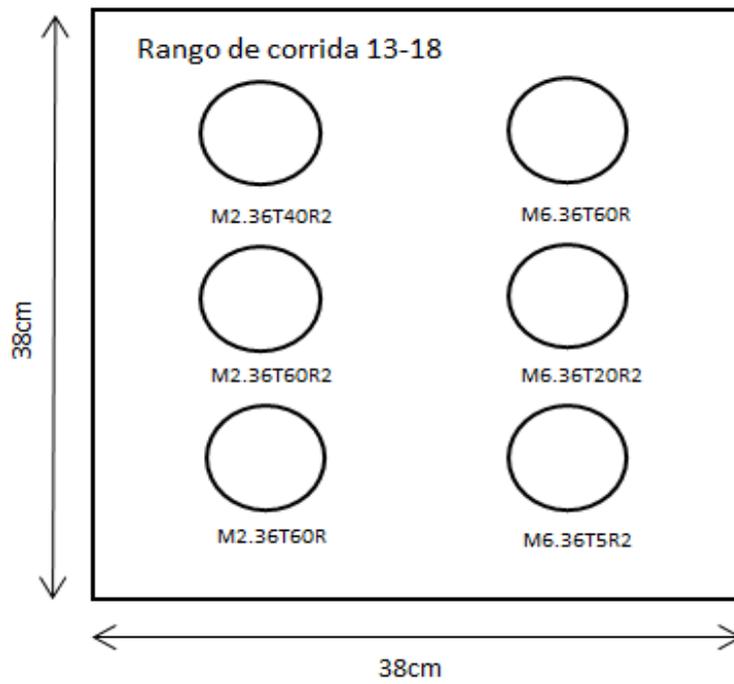


Figura 9: Distribución de las muestras dentro de la tolva del ozonizador orden 13-18

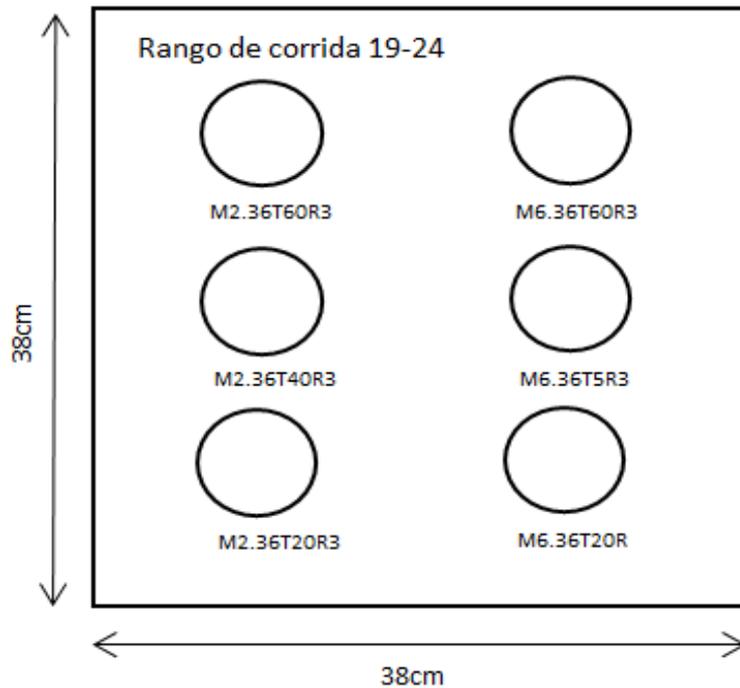


Figura 10: Distribución de las muestras dentro de la tolva del ozonizador orden 19-24

IV. Recuento de Salmonella

Las muestras luego de ser sometidas a los diferentes tiempos de exposición con ozono fueron trasladadas en bolsas Whirl pak® de manera independiente y bajo condiciones de refrigeración en un cooler isotérmico durante 30 minutos hacia el laboratorio de microbiología de la empresa Grupos FS. Las cuáles fueron analizadas por triplicado y utilizando para el recuento el medio TSA.

V. Sobrevivencia y Reducción de Salmonella

Para determinar la sobrevivencia del *Salmonella spp.* a los diferentes tratamientos aplicados con ozono gaseoso, se trazaron las curvas de sobrevivencia correspondiente a cada concentración inicial del inóculo para *Salmonellas/g*; en donde se plotearon los logaritmos de los promedios de sobrevivencia versus los tiempos de exposición al que fueron expuestos. (ploteo semilogarítmico).

Con el mencionado ploteo también se pudo hallar el valor D para la desinfección de *Salmonella spp.* en la concha de abanico correspondiente a cada concentración de inóculo, mediante una regresión lineal la cual permitió hallar gráficamente el valor D. Siendo el

significado físico del valor D; el tiempo de aplicación de 10 ppm de ozono gaseoso necesario para causar la inviabilidad del 90% de la población inicial o reducir la población en un ciclo logarítmico.

3.5 DISEÑO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La investigación comprendió un diseño experimental, bajo el esquema DCA factorial (2 x4), empleando el estadístico F (relación de dos X_i^2), análisis de varianzas, verificación del cumplimiento de supuestos y la prueba de múltiples de comparaciones de Tukey entre inóculos. Para lo cual se obtuvo dos muestras de inóculo de salmonella, (C1 y C2), los cuales fueron sometidos a cuatro tiempos de exposición (T_1 , T_2 , T_3 y T_4), con una concentración de 10 ppm y flujo constante de ozono gaseoso, cada una de las casillas comprendió un tratamiento experimental y dos tratamientos blanco.

En la figura 11 se observa cómo fueron distribuidas las unidades experimentales dentro de la tolva ozonizadora para el diseño aleatorizado por MiniTab. Además, es posible observar el interior de la tolva de exposición donde se realizó la exposición de las conchas de abanico al ozono gaseoso, se observa que en la parte inferior de la tolva se encuentran siete paletas de aireación de acero inoxidable en sentido oblicuo las cuales permiten que se genere el flujo envolvente del ozono hacia la concha de abanico, así mismo se aprecia que el material por el cual se encuentra elaborado el equipo de la tolva es completamente en acero inoxidable.

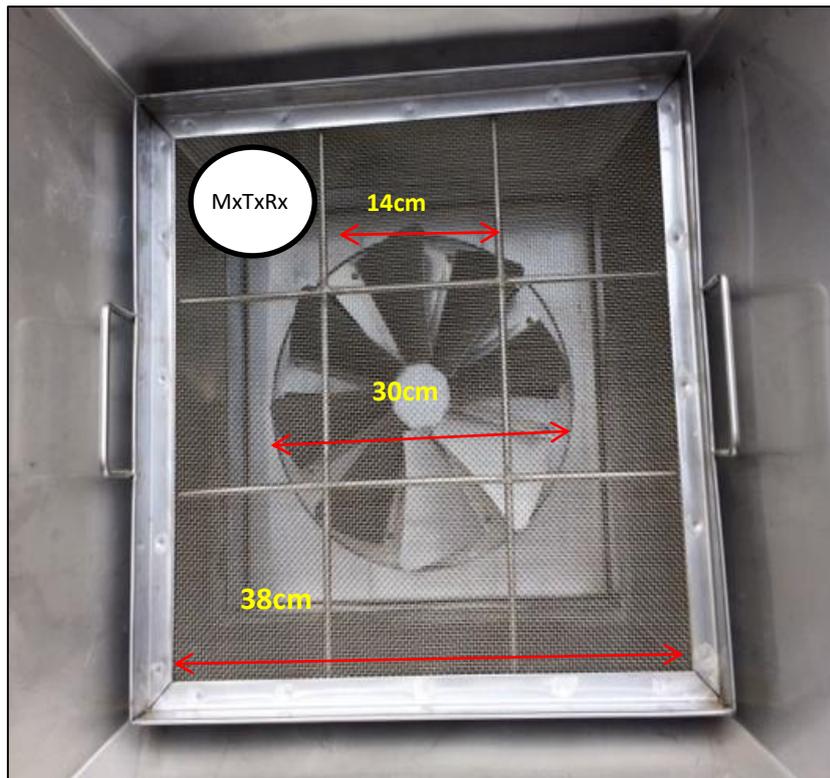


Figura 11: Vista superior de la tolva de exposición al tratamiento con ozono gaseoso

Los valores del logaritmo del recuento de *Salmonella spp.* se evaluaron con la finalidad de determinar la tendencia que permita confirmar o predecir el comportamiento ante los tratamientos aplicados, para lo cual se tomó la media aritmética del logaritmo del recuento para las tres repeticiones realizadas por tratamiento con ozono gaseoso a 10 ppm, tal como lo sugiere (Dasso, 1989). Lo cual permitió trabajar con el logaritmo de los promedios de logaritmo del recuento y así poder realizar la prueba ANVA al arreglo factorial, donde se evaluó la variabilidad de los resultados por tipo de tratamiento.

Para realizar la comparación entre la interacción y significancia entre la concentración de inóculo (2.31×10^2 UFC/g y 2.30×10^6 UFC/g) y tiempos de exposición al ozono gaseoso (5, 20, 40 y 60 min), se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para ambos factores.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 VERIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE INÓCULO

Se confirmó que las muestras a inocular no presentaron *Salmonella spp.* y en la Tabla 8 se observan los resultados de la concentración real del inóculo respecto a la concentración del inóculo teórico de las muestras 1 y 2. (Valor “ $T_o = 0$ minutos” indicado en el diagrama experimental) que corresponden a la verificación de la concentración real del inóculo preparado con la ayuda de la escala de Mc Farland.

Tabla 8: Verificación de la concentración teórica de los inóculos

Concentración teórica del Inóculo UFC <i>Salmonella</i> /g	Tiempo (min)	Muestra N°	Concentración real del inóculo
2.31×10^2	0	1	7.54×10^2
2.30×10^6	0	2	7.46×10^6

4.2 SOBREVIVENCIA DE LA *SALMONELLA SPP* A LA EXPOSICIÓN DEL OZONO GASEOSO

En la Tabla 9 se aprecian los valores del promedio aritmético del número de sobrevivientes de *Salmonella spp* expresado en valores de recuento y logarítmicos para las dos concentraciones de inóculo. Se evidenció el grado de efectividad de los 10 ppm de ozono gaseoso aplicados durante todos los tiempos de exposición, produciendo una reducción logarítmica sobre el número de *Salmonellas* inoculadas. Además, se observó que a partir del tiempo de exposición de 20 minutos en las dos concentraciones de inóculo, la sobrevivencia promedio fue disminuyendo, siendo el tiempo de exposición de 5 minutos poco efectivo para disminuir la sobrevivencia de *Salmonella spp.* Komanapalli y Lau

(1996) señalaron que pequeños tiempos de exposición de la *Salmonella* al ozono gaseoso interrumpe la permeabilidad de la membrana y cómo es posible verificar en el Tabla 9 donde para tiempos de exposición de 5 y 20 minutos hay menor sobrevivencia en bajas concentraciones de inóculo, sin embargo, a partir de los 20 minutos de exposición el nivel de sobrevivencia empieza a reducirse con una mayor tasa. En estudios posteriores señalan que a mayores tiempos de exposición se altera completamente la permeabilidad de la membrana, condición que llevaría a la destrucción del microorganismo. Analizando los resultados de sobrevivencia entre 20 y 60 minutos, se logró reducciones de 1.03 y 0.92 log UFC/g, evidenciando la caída en la gradiente de sobrevivencia con mayor intensidad que para tiempos de exposición menores a los 20 minutos.

Según señalan Restaino et al. (1995), la sensibilidad de los microorganismos al ozono gaseoso depende de la naturaleza orgánica del medio, es por ello que las reducciones microbiológicas con ozono gaseoso no son homólogas cuando es aplicado en distintos sustratos, siendo más difícil la reducción en medios con alto contenido de humedad y proteína, como son los tallos de concha de abanico (78.2% y 15.9% respectivamente)

Graham, (2000) señaló que al no encontrarse los medios como partículas disueltas, la accesibilidad del ozono se ve mermada, disminuyendo el efecto bactericida sobre los microorganismos. Lo que explica la existencia de una película superficial de agua sobre el microorganismo, la cual impide en tiempos cortos la acción oxidativa del ozono, es por ello que al aumentar este tiempo de exposición al ozono se logra eliminar esta película superficial y la acción oxidativa puede ser más efectiva.

Cuando se realiza la comparación entre ambas concentraciones de inóculo, se puede observar que la sobrevivencia hasta el tiempo de 40 minutos es mayor en concentraciones altas de *Salmonella spp.* Además, se observó que para altas concentración de inóculo (10^6), la sobrevivencia es menor a partir de los 40 minutos de tratamiento.

El tratamiento con ozono gaseoso a 10 ppm presentó una menor sobrevivencia (1.54 y 5.69 log UFC/g, en el inóculo 7.54×10^2 y 7.46×10^6 UFC *Salmonella spp/g* respectivamente),

fue la exposición por 60 minutos. Sin embargo, a partir de los 20 minutos de tratamiento se evidencio una disminución apreciable en el número de sobrevivientes

De acuerdo a Thanomsub et al. (2002), Indica que el primer daño a la *Salmonella* es sobre la integridad celular y este se presenta alrededor de los 30 minutos tras ser expuesta al ozono gaseoso, afirmación que guarda una cercana relación con los resultados del presente experimento y donde se observa que el efecto de la reducción logarítmica es claramente notorio a partir de los 40 minutos de tratamiento como se puede visualizar en la figura 12 donde se aprecia tasa de sobrevivencias de 83% y 53% respectivamente para los inóculos iniciales de 7.54×10^2 y 7.46×10^6 UFC *Salmonella*/g en el tratamiento de 60 minutos.

Tabla 9: Logaritmo del recuento promedio de sobrevivientes en unidades experimentales para los inóculos 7.54×10^2 y 7.46×10^6 UFC *Salmonella*/g

Inóculo real		0 min	5 min	20 min	40 min	60 min
7.54×10^2	Recuento UFC/g	754	588	368	155	35
	Log UFC/g	2.88	2.77	2.57	2.19	1.54
7.46×10^6	Recuento UFC/g	7461538	6153846	4076923	1005128	484615
	Log UFC/g	6.87	6.79	6.61	6.00	5.69

Thanomsub et al. (2002) no señala con mayor precisión las condiciones donde fueron realizados los tratamientos, tanto como humedad relativa del ambiente y temperatura del aire con el cual fue generado el ozono gaseoso, dado que ambas variables pueden afectar la sobrevivencia de la *Salmonella spp.* ya que humedades relativas altas y temperaturas de aire comprendidas entre 20 °C y 37 °C favorecen el desarrollo de microorganismos y hasta su mayor resistencia a los tratamientos de desinfección.

En la Tabla 10 la sobrevivencia fue expresada como relación de tasa en base a los promedios aritméticos del recuento microbiológico, sin embargo, para la mejor visualización y manejo de los datos se empleó la notación logarítmica, la cual fue empleada también para los cálculos realizados en el análisis estadístico respectivo.

En la Tabla 10 se observan las tasas de sobrevivencia de *Salmonella spp* de los dos inóculos evaluados a diferentes tiempos de exposición al ozono en la concha de abanico, donde las concentraciones de 2.88 Log UFC/g y 6.87 Log UFC/g lograron una sobrevivencia de 53% y 83% respectivamente (valores promedio de tres repeticiones). Además, se observa que ambas tasas son muy diferentes, permitiendo notar el efecto que tiene la concentración del inóculo sobre la sobrevivencia de *Salmonella spp* ante los tratamientos con ozono gaseoso. Feed et al. (2009), indica que el ozono gaseoso logra disminuciones en el recuento microbiológico de Enterobacterias (*Salmonella spp.*) de hasta 26 %, lo que significa una sobrevivencia de 74%, afirmación que difiere en aproximadamente 21% con el valor de porcentaje de sobrevivencia para el inóculo correspondiente de 7.54×10^2 UFC/g, donde se registró el valor equivalente al 53 %.

Tabla 10: Tasa de Sobrevivencia Log promedio de *Salmonella spp* por gramo en concha de abanico ozonizada

Tiempo (min)	Log Promedio (7.54×10^2)	Tasa	Log Promedio (7.46×10^6)	Tasa
0	2.88	1.00	6.87	1.00
5	2.77	0.96	6.79	0.99
20	2.57	0.89	6.61	0.96
40	2.19	0.76	6.00	0.87
60	1.54	0.53	5.69	0.83

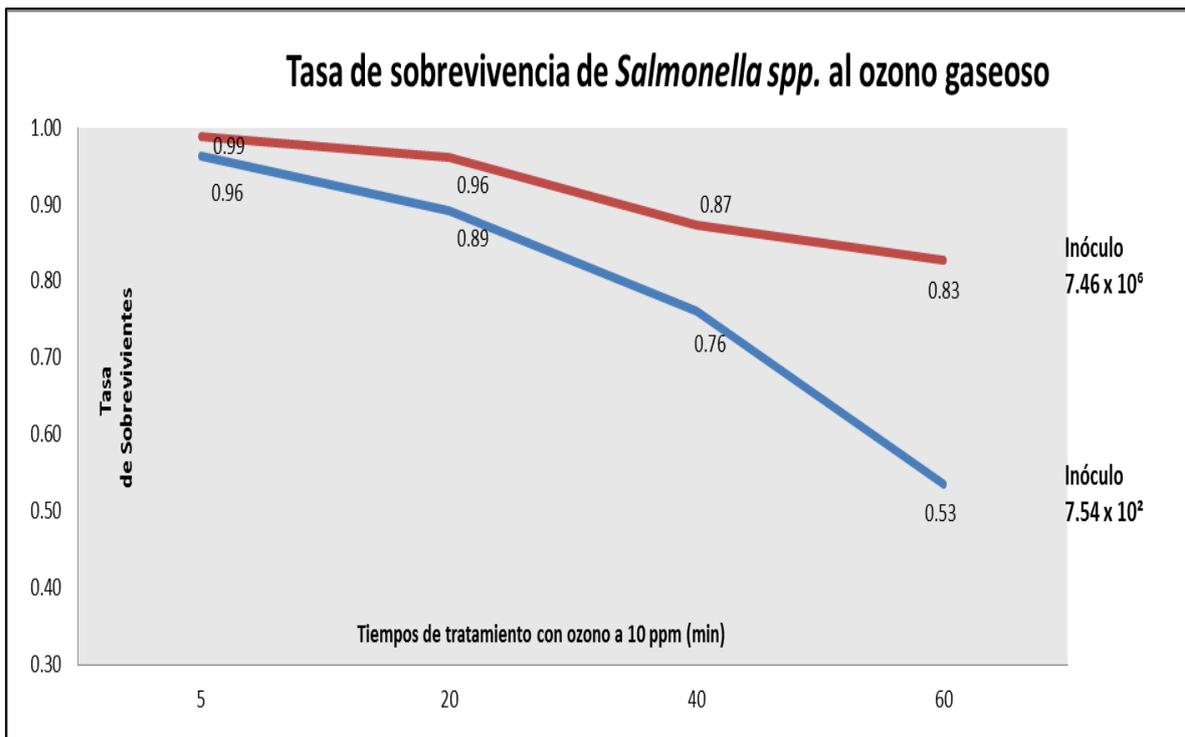


Figura 12: Tasa de sobrevivencia de la *Salmonella* spp al ozono gaseoso

4.3 REDUCCIÓN DE LA *SALMONELLA* SPP EN LA EXPOSICIÓN DEL OZONO

En la Tabla 11 y figura 13 se puede observar una reducción logarítmica a los diferentes tiempos de exposición aplicados, en los dos inóculos estudiados. A los 5 minutos la reducción fue de 3.81% en el inóculo bajo (2.88 log) y de 3.78% en el inóculo alto (6.87 log), eso quiere decir que en los primero 5 minutos la reducción es similar a inóculos diferentes, pero a partir de 20 minutos la reducción es mayor cuanto menos es el número inicial de *Salmonella* spp expuesta a 10 ppm de ozono, alcanzando un nivel de reducción de 1.34 ciclos logarítmicos (46.53%) a los 60 minutos de exposición, pero se alcanza una reducción de 1.18 ciclos logarítmicos (17.17%), cuando el número inicial de *Salmonella* spp es alta. Ante esto primero podemos evidenciar el efecto sanitizante del ozono gaseoso a 10 ppm en los diferentes tiempos de exposición para los dos tipos de inóculo. Selma et al. (2008), se refiere que se han logrado reducciones logarítmicas de hasta 3 unidades empleando ozono gaseoso en concentraciones de 10000 ppm por espacio de 30 minutos, Además señala que el efecto del ozono gaseoso se puede ver dificultado por la presencia de humedad en la parte superior y forma estructural de la superficie, que puedan permitir la mejor adherencia de los microorganismos y el menos efecto del ozono gaseoso, dicha

afirmación puede extrapolarse a la naturaleza húmeda e irregular con pliegues que presenta los tallos de concha de abanico, en los cuales solo se ha logrado la reducción de hasta 1.34 ciclos logarítmicos con tratamientos de 60 minutos y 10 ppm. Es posible observar que cuando la concentración de inóculo es baja, la reducción es mayor cuan mayor sea el tiempo de exposición de ozono que cuando el inóculo es alto.

Según el parámetro de estadística F (Anexo 4) la dispersión para el inóculo uno (7.54×10^2 UFC/g) es mayor que para el inóculo dos, lo cual es interpretado como una mayor diferencia o significancia en la reducción logarítmica, en comparación con el inóculo dos (7.46×10^6 UFC/g). Para los tiempos de exposición aplicados a 10 ppm de ozono gaseoso tanto en el inóculo uno y dos. Cuando se evidencia una mayor dispersión de los residuos, se interpreta que el efecto del ozono gaseoso ha sido mayor en el inóculo que presenta mayor dispersión, traduciéndose en un menor recuento de sobrevivientes. En la figura 15 también es posible analizar que existe una significancia entre las agrupaciones de concentración de inóculo, lo que se interpreta como que los tiempos de exposición tienen un efecto diferente cuando se aplican en cada concentración distinta de inóculo.

Existe una diferencia porque hay mayor reducción de *Salmonella* en el inóculo correspondiente a 7.54×10^2 UFC/g, donde se obtiene un efecto ligeramente mayor de los tratamientos aplicados, esto debido que al presentar una población con mucho menor densidad y/o presencia en las unidades experimentales, el efecto global de las moléculas de ozono gaseoso sobre la *Salmonella* es mayor, se cuenta con mayor cantidad de moléculas de ozono que degradan directamente la pared celular de manera más efectiva en concentraciones menores de *Salmonella*, ya que la concentración de ozono aplicada es la misma para ambos inóculos. Según los resultados obtenidos a partir de la prueba de múltiples comparaciones de Tukey, la dispersión de los residuos empieza a partir del tratamiento de 40 minutos en comparación con los demás tiempos de exposición y manteniendo la tendencia hasta el tiempo de exposición de 60 minutos. Entendiéndose que se logró la mayor reducción microbiológica o mayor efecto oxidativo del ozono gaseoso a partir de los 40 minutos de tratamiento.

Según lo indicado por Guzel et al. (2003), el cual reporta alta sensibilidad de la *Salmonella* al agua ozonizada en concentraciones de 20 ppm en tratamientos de 10 minutos, lo cual

guarda relación con la sensibilidad presentada por la *Salmonella* al ozono gaseoso en concentraciones de 10 ppm con tiempos de exposición superiores a los 40 minutos. Considerando que los tratamientos con agua ozonizada tal como lo indica Dave (1999), presentan una mayor eficacia en la reducción microbiológica.

Cuando analizamos en términos de porcentuales también se observa que se tiene un porcentaje mayor de reducción a la concentración baja de 2.88 log que a la concentración alta de 6.88 log, por lo que el efecto de la exposición de 10 ppm de ozono gaseoso es mayor en un número menor de *Salmonella spp* inoculada en los tallos de concha de abanico, el comportamiento de la reducción de *Salmonella* guarda relación a los reportado por Flessa. Et al. (2005), quien realizó estudios de reducción logarítmica en *Listeria monocytogenes* en concentraciones altas (10^7) UFC y bajas (10^4), concluyendo que las reducciones presentan mayor gradiente para tratamientos de 1 hora en *Listeria monocytogenes* en concentraciones bajas, dicho comportamiento es equivalente al de la *Shigella* y *Salmonella*.

En la figura 13 se observa que la tasa de reducción de un inóculo bajo de *Samonella spp* (0.0214) es similar a la tasa de reducción de un inóculo alto de *Salmonella spp* (0.0206), eso quiere decir que a medida que aumenta el tiempo de exposición con 10 ppm de ozono gaseoso, se reduce el mismo número de *Salmonella spp* eso se comprueba con el valor D que para el inóculo de 2.88 log es de 46.7 min y para el inóculo de 6.87 fue de 48.5 min

Tabla 11: Reducción logarítmica del recuento para dos inóculos de *Salmonella/g*

Inóculo		Tiempo (0)	Tiempo (5)	Tiempo (20)	Tiempo (40)	Tiempo (60)
7.54 x 10 ²	Log	2.88	2.77	2.57	2.19	1.54
	UFC/g Δ De Log		0.11	0.2	0.38	0.65
7.46 x 10 ⁶	Log	6.87	6.79	6.61	6.00	5.69
	UFC/g Δ De Log		0.08	0.18	0.61	0.31

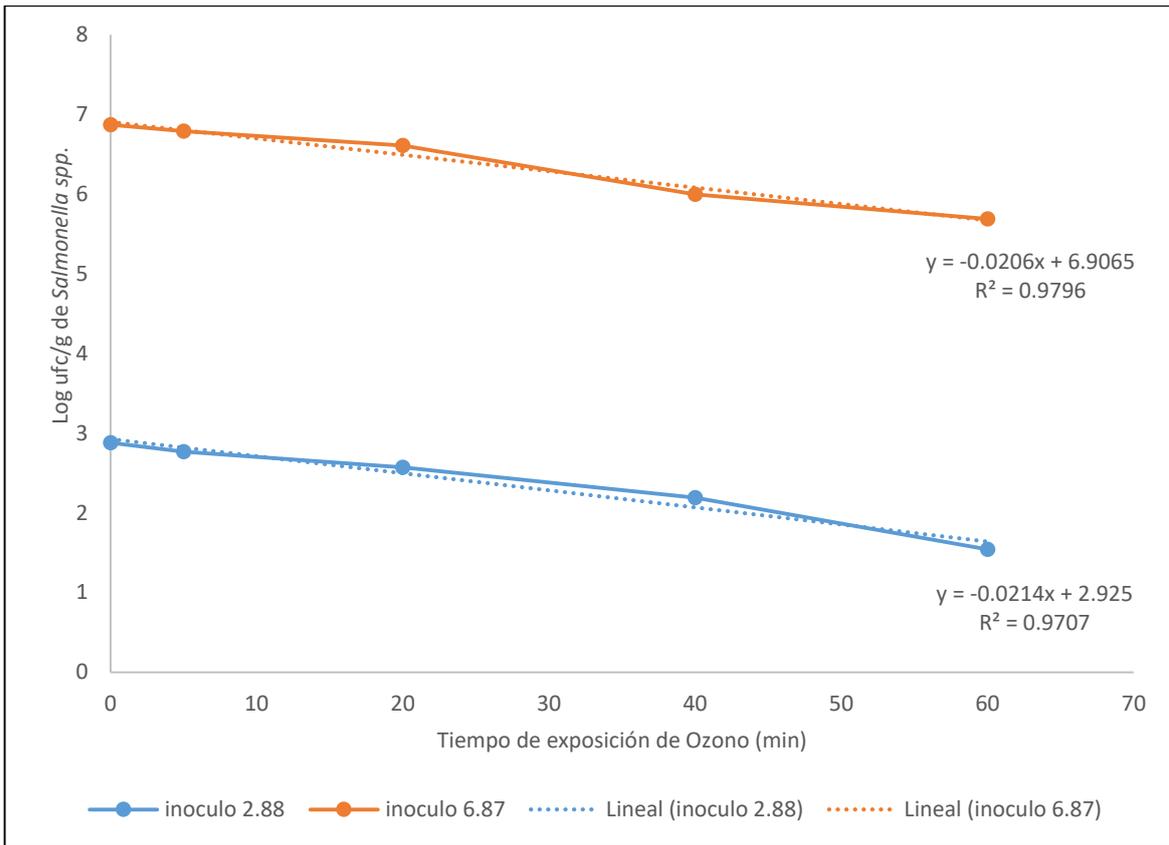


Figura 13: Reducción de *Salmonella* spp a la exposición de 10 ppm de ozono

El resultado del análisis realizado de manera individual para la interacción del tiempo de exposición 4 (60 minutos) nos permite identificar que en ambas concentraciones de inóculo la interacción es significativa, donde se observa que el inóculo 1 está asociado a una mayor reducción de la población, situación contraria que se presenta en el inóculo 2: Esto quiere decir que a un tiempo de exposición de 60 minutos se obtienen mayores reducciones de *Salmonella* spp en concentraciones bajas de inóculo definidas por la FDA (2001) en pruebas de desafío.

V. CONCLUSIONES

1. Existe un efecto significativo estadístico (p-value < 0.05) entre la concentración de inóculo inicial y el tiempo de exposición al ozono gaseoso, presentando mayor efecto en la reducción para bajas concentraciones de *Salmonella spp*
2. Bajo las condiciones en las cuales se realizó el experimento todos los tratamientos presentaron significancia estadística (p-value < 0.05) para la reducción de *Salmonella spp.* en concentraciones iniciales de 7.54×10^2 y 7.46×10^6 UFC *Salmonella/g* en concha de abanico.
3. Las dosis de 10 ppm de ozono gaseoso para el tratamiento correspondiente de 60 minutos resulto ser el de mayor significancia (p-value < 0.05) para ambas concentraciones de inóculo, manteniendo la diferencia estadística.
4. Se determinó un porcentaje de sobrevivencia de *Salmonella spp.* de 53% y 83% para las concentraciones iniciales de 7.54×10^2 UFC *Salmonella spp.* /g (2.88 log UFC/g) y 7.46×10^6 UFC *Salmonella spp.* / g (6.87 log UFC/g) respectivamente con una concentración constante de 10 ppm de O₃ gaseoso y 60 minutos para el tiempo de exposición.
5. Se encontró un porcentaje de reducción de *Salmonella spp* de 47% y 17% para las concentraciones iniciales de 7.54×10^2 UFC *Salmonella spp.* /g (2.88 log UFC/g) y 7.46×10^6 UFC *Salmonella spp.* / g (6.87 log UFC/g) respectivamente con una concentración constante de O₃ gaseoso y 60 minutos para el tiempo de exposición.
6. El valor D para la *salmonella spp* en tallos de concha de abanico frescas a la exposición de una dosis de 10 pm de ozono gaseoso fue de 47-49 minutos.

VI. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios de los cambios físico-químicos específicos de la concha de abanico expuesta al ozono gaseoso.
2. Realizar ensayos con sub productos de concha de abanico empleando ozono gaseoso.
3. Realizar el estudio sobre la efectividad del ozono gaseoso en la desinfección de *Argopecten purpuratus* para todos los microorganismos indicados en el Manual de indicadores sanitarios emitido por el SANIPES.
4. Evaluar el efecto bactericida del ozono gaseoso aplicado en condiciones de vacío sobre recursos hidrobiológicos.
5. Evaluar el efecto bactericida del ozono gaseoso aplicado durante el proceso de congelado de la concha de abanico en túneles continuos.
6. Evaluar el uso de mayores concentraciones de ozono gaseoso para la desinfección, ya que actualmente no existen límites establecidos por la FDA ni otro ente regulatorio para este tipo de procesos.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Álamo, V. (1981). Algunos aspectos del cultivo de moluscos en pisco. P 1337. En: R. Ruiz (ed.). Segundo Simposium sobre desarrollo de la Acuicultura en el Perú. Lima-Perú.
2. Álamo, V. y V. Valdivieso. (1997). Lista sistemática de moluscos marinos del Perú. Segunda edición. Callao-Perú. 183p.
3. Alcázar, A. (2008). Crecimiento y supervivencia de juveniles de concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) cultivados a diferentes densidades en sistemas de fondo y suspendido en la zona de Casma (Ancash-Perú). Tesis de Ingeniero Pesquero. 79p.
4. Anderson, P.; M. Hume; J. Byrd; C. Hernandez; S. Stevens; K. Stringfellow and D. Caldwell. (2010). Molecular analysis of *Salmonella* spp. serotypes at different stages of commercial turkey processing. *Poult. Sci.* 89:2030-2037.
5. Arcentales-Oña, B.; C. Padilla-Torres; M. Guijarro-Fuertes y M. Andrade-Cuvi. (2018). Calidad fisicoquímica y microbiológica de Tomate de Árbol (*Solanum betaceum*) mínimamente procesado tratado con radiación UV-C y ozono gaseoso. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha* [en línea] 2018, 19 (January-June): [Fecha de consulta: 24 de agosto de 2018] Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81355612008>> ISSN 1665-0204
6. Batterman, S. (2000). Performance evaluation of a sorbent tube sampling method using short path thermal desorption of volatile organic compounds. "Journal of Environmental Monitoring, 2(4), 313-324.
7. Boeniger, M. (1995). "Use of ozone generating devices to improve indoor air quality". *AM. IND. HYG. ASSOC. J.* 1995; 56: 590-598.
8. Botelho da Silva, S.; L. De Mello; M. Curtinovi; M. Geyer e I. Prá. (2011). Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. *Semina: Ciências Agrárias* [en línea] 2011, 32 (abril-junio): [Fecha de consulta: 24 de agosto de 2018] Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445744101026>> ISSN 1676-546X

9. Brichta-harhay D. y A. Koohmaraie. (2008). Enumeration of *Salmonella* spp. from poultry carcass rinses via direct plating methods. *J. Appl. Microbiol.* 46:186-191.
10. Calvario, O. y L, Montoya. (2003). Manual de Buenas Prácticas de Producción Acuícola de Moluscos Bivalvos para la Inocuidad Alimentaria. Pp. 18.
11. Camacho, A.; A. Giles; A. Ortegón; M. Palao; B. Serrano y O. Velázquez. (2009). Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México. 17 p.
12. CDC (Centros de Control y Prevención de Enfermedades), USA. (2017). (en línea). Consultado el 15 de mayo del 2017. Disponible en <https://www.cdc.gov/spanish/>
13. Cecarini, V.; J. Gee; E. Fioretti; M. Amici; M. Angeletti; A. Eleuteri and J. Keller. (2007). Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. *Molecular cell Research*, 1773(2): 93–104.
14. Dasso, J. (1989). “Efecto de la radiación Gamma sobre la sobrevivencia de *Salmonella* spp. en Harina de Anchoveta”. P. 37
15. Da Silva, G. K. (1998). Sensorial and microbial effects of gaseous ozone on fresh scad (*Trachurus trachurus*). *Journal of Applied Microbiology*, 84(5), 802-810.
16. Dave, S. (1999). “Efficacy of ozone against *Salmonella* spp. in aqueous suspensions and on poultry meat (MSc thesis). Columbus, Ohio, U.S.A: Ohio State University. P. 26-28
17. De Ciurana, C. (2000). “Dióxido de cloro y su efecto en la formación de trihalometanos”. *Revista Tecnología del Agua*. (en línea). Consultada el 30 de mayo del 2016. Disponible en <http://cidta.usal.es/cursos/ETAP/modulos/libros/dioxido.pdf>
18. DGE (Dirección General de Epidemiología), México. (1993). Boletín semanal de vigilancia de la epidemiológica del cólera en México. Semana 46. SSA 46: 1-4.
19. Elford, W.; D. Tvan and J. Ende. (1942). “An investigation of the merits of ozone as an aerial disinfectant”. 42(3): 240-265
20. Elizondo, R. (2006). Diagnóstico serológico de *Salmonella enteritidis* y *Salmonella thiphymurium* en pollos de engorde, aves reproductoras pesadas y gallinas de postura de huevo comercial, utilizando los ensayos de ELISA de Biochek. Trabajo Final de Licenciatura, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica. 60 p.
21. Famiglietti, A.; M. Quinteros; M. Vázquez; M. Marín; F. Nicola; M. Radice; M. Gal; F. Pasterán; C. Bantar; J. Casellas; J. Kovensky y E. Couto. (2005). Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en *Enterobacteriaceae*. *Rev. Argentina de Microbiología*. 37:57-66.

22. FDA (Food and Drugs Administration), USA. (2001). "Evaluation and Definition of Potentially Hazardous Foods" P 47-48. Consultado el 10 de agosto del 2018. Disponible en: <https://www.fda.gov/downloads/food/foodborneillnesscontaminants/ucm545171.pdf>
23. FDA (Food and Drugs Administration), USA. (2011). (Citado 2014 junio 30); (1 página). Disponible en: <http://www.fda.gov/>
24. Feed, O.; M. Franco; J. Franco; O. Bentancur y S. Sosa. (2009). La atmósfera ozonizada, una alternativa para reducir la población bacteriana de medias reses durante la maduración en cámaras. *Revista La Industria Cárnica Latinoamericana*; N° 162: 44-48. Consultado el: 12 de junio del 2017. Disponible en: <http://132.248.9.34/hevila/Abanicoveterinario/2013/vol3/no3/3.pdf>
25. Fisher, D. y Pflug, I. (1976). "Effect of combined heat and radiation on microbial destruction". *Applied an environmental microbiology* Vol. 33 N° 5p. 1170-1176.
26. Flessa, S.; L. Dawn and H. Linda. (2005). "Survival of *Listeria monocytogenes* on fresh and frozen strawberries". *International Journal of Food Microbiology* 101 (2005) 255-262.
27. Gimferrer, N. (2011). "El ozono como conservante de alimentos". Consultado el 20 de mayo del 2017. Disponible en: <http://www.ozono21.com/actualidad-interna/el-ozono-como-conservante-alimentos/286/>
28. Gil, M.; A. Allende y V. Selma. (2008). *Nuevas Tendencias de Procesado y Conservación de Alimentos Vegetales de IV Gama [Electronic Version]*, 146-151. Recuperado 21 de febrero de 2017 en http://digital.csic.es/bitstream/10261/5778/1/CEBAS_AGROCSIC.pdf.
29. Gottschalk, C.; J. Libra and A. Saupe. (2009). *Ozonation of water and wastewater* (2nd ed.). Weinheim: WILEY-VCH.
30. Graham, D. (2000). Direct food add petition (Ozone as an antimicrobial agent for the treatment, storage, and processing of foods in gas and aqueous phases)
31. Graham, H. (1980). "Safety and Wholesomeness of Irradiated Foods" en *Safety of Foods*. P. 765. Conneticut, Avis Westport.
32. Granados, P. y M. Villaverde. (1996). *Microbiología*. Editorial Paraninfo. Madrid. España. P.323
33. Guzel-seydim, Z.; A. Greene and A. Seydim. (2004). Use of ozone in the food industry. *LWT - Food Science and Technology*, v. 37, n. 4, p. 453-460.

34. Guzel, Z.; A. Greene and A. Seydim. (2003). Use of ozone in the food industry. *Swiss Society of Food Science and Technology*, 37, 453 - 460.
35. Hernández, I. (2007). “Efecto de la temperatura y tiempo de ozonización en la despigmentación del grano de maíz nixtamalizado”. Tesis Mg. México. Instituto politécnico nacional P.33. (en línea). Consultada el 29 de mayo del 2017. Disponible en http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/1706/2471_2007_CICATA-LEGARIA_MAESTRIA_hernandez_osorio_ignacio.pdf?sequence=1
36. Hurtado, F. (2001). Obtención de un hidrolizado proteico utilizando excedentes de la industria pesquera y agrícola. Ingeniero de Alimentos. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción. Tesis de Pregrado. Guayaquil -. Ecuador. p. 108
37. ICMSF. (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). (1998). *Microorganismos de los alimentos*. Editorial Acribia. Zaragoza España. P. 458
38. ICMSF. (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). (1999). *Microbiología de los alimentos*. Editorial Acribia S.A. 2ª edición. España. P. 439-480.
39. IMARPE. (Instituto de Mar del Perú), Perú. (2011). PROTOCOLO PARA LA EVALUACIÓN DE CONCHA DE ABANICO *Argopecten purpuratus*. Consultado el 12 de agosto del 2016. Disponible en: <http://biblioimarpe.imarpe.gob.pe:8080/bitstream/handle/123456789/2171/INF%2038%284%29-1.pdf?sequence=1>
40. Ingram, M. y R. Haines. (1949). Inhibition of bacterial growth by pure ozone in the presence of nutrients. Consultado el 15 de marzo del 2018. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2234931/citedby/>
41. ITP/SANIPES (Instituto Tecnológico de Producción), Perú. (2010). Manual de indicadores o criterios de seguridad alimentaria e higiene para alimentos o piensos de origen pesquero y acuícola. P. 15-20.
42. Jay, Y. (1994). *Microbiología moderna de los Alimentos*. 3era edición, Editorial Acribia. Zaragoza España. P.804
43. Kanagusuku, G. (2009). “Evaluación de los Bioincrustantes presentes en sistemas de cultivo suspendido de *Argopecten purpuratus* en la Bahía de Samaco”. Tesis Blgo. Perú. Universidad Ricardo Palma. P.47. (en línea). Consultada el 14 de marzo del 2016. Disponible en <http://www.urp.edu.pe/pdf/biologia/Tesis%20Kanagusuku.pdf>

44. Khadre, M.A.; A. Yousef and J. Kim. (2001). "Microbiological aspects of Ozone applications in food". Journal of Food Science. Rev. US. Ent. 66 (9). P. 1242-1252.
45. Kim, J.; A. Yousef and S. Dave. (1999). Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. Journal of Food Protection, 62(9): 1071-1087.
46. Komanapalli, I. and B. Lau. (1996). "Ozone-induced damage of Escherichia coli K-12. Appl Environ Biotechnol. 46:610-614.
47. Koneman, E.; V. Allen; V. Dowerl and H. Sommers. (1998). Diagnóstico Microbiológico 3 ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana.
48. Lennette, E. (1982). Microbiología Clínica. 3er edición. Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires.
49. Maldonado, O. (2014). Efecto del tiempo de exposición con ozono gaseoso y tiempo de almacenamiento sobre las características fisicoquímicas, recuento de mohos y levaduras y aceptabilidad general de arilos de granada (*Punica granatum* L.) mínimamente procesada. Tesis Ing. Perú. Universidad Privada Antenor Orrego. P.114. (en línea). Consultada el 25 de julio del 2017. Disponible en: <http://repositorio.upao.edu.pe/handle/upaorep/853>
50. Mc Farland, J. (1907). The nephelometer: an instrument for estimating the numbers of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. J.am. Med. Assoc. 49:1176-1178.
51. McNair, D. and E. Lesher. (1963). "Effect of Ozone on Survival and Permeability of *Escherichia coli*. J. BACTERIOL. 85:567-576.
52. Melara, S. (2012). "Determinación de la multi resistencia a los antimicrobianos de Salmonella aislada a partir de muestras de chorizos comercializados en mercados de santa tecla". Tesis. Consultada el 20 de diciembre del 2017. Disponible en: http://ri.ues.edu.sv/2279/1/AISLAMIENTO_DE_SALMONELLA_AC..pdf
53. Méndes, I.; N. Mossos; D. Mogollón; R. Poutou and S. Máttar. (2006). Epidemiological relationships among strains of *Salmonella enterica* subsp. enterica isolated from humans, poultry and food. Universitas Scientiarum. Revista de la Facultad de Ciencias. 11 (1): 5-13.
54. Mendo, J.; M. Wolff; W. Carbajal; I. Gonzales y M. Badjeck. (2008). Manejo y explotación de los principales bancos naturales de concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) en la costa peruana.

55. Mendo, J. y M. Wolff. (2003). El impacto del fenómeno el Niño sobre la producción de concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) en Bahía Independencia, Pisco, Perú. *Ecología Aplicada* 2(1).
56. Menzies, D.; J. Popa; J. Hanley, T. Rand and K. Donald. (2003). “Effect of ultraviolet germicidal lights installed in office ventilation systems on workers, health and wellbeing: double-blind multiple crossover trial”. *Lancet*. 2003; 362: 1785-1791.
57. Merck, E. (1994). *Manual de Medios de Cultivo*. Darmstadt- Alemania.
58. Moat, J.; J. Cargill; J. Shone; M. Upton. (2009). “Application of a novel decontamination process using gaseous ozone.” *Can. J. Microbiol.* 55:928-933.
59. Mossel, D y G. Moreno. (1985). *Microbiología de los Alimentos*. Editorial Acribia, Zaragoza, España. P.375
60. Mulder, R. (1983). “Ionising energy treatment of poultry. National Symposium on Ionising Treatment of Foods”. Sydney 5-6 October 1983. p.4.
61. Murray, B.; S. Ohmine; D. Tomer; K. Jensen; F. Johnson and J. Kirsi. (2008). “Virion disruption by ozone-mediated reactive oxygen species. *Journal of Virological Methods*. 2008; 153: 74-77.
62. Murray, P y Y. Shea. (2004). *Pocket Guide to Clinical Microbiology*. 3rd edition. ASM Press. Washington, D.C. p. 406.
63. Napoli, C.; V. Marcotrigiano y M. Montagna. (2012). “Air sampling procedures to evaluate microbial Contamination: a comparison between active and passive methods in operating theatres. *BMC Public Health*. 2012; 12(594):1-6.
64. Noskowa, G. (1972). *Microbiología de las carnes conservadas por frío*, Editorial Acribia, España, P.111
65. Olmedo, T. (2008). “Subproductos de la desinfección del agua por empleo de compuestos de cloro”. (en línea). Disponible en [http://www.salud-publica.es/secciones/revista/revistaspdf/bc51018bc59c356_Hig.Sanid.Ambient.8.335-342\(2008\).pdf](http://www.salud-publica.es/secciones/revista/revistaspdf/bc51018bc59c356_Hig.Sanid.Ambient.8.335-342(2008).pdf).
66. Oliveira, A.; Emanuele, T; Alline, A y Pedro, C. (2013). Inactivation of *E. coli* and *B. subtilis* spores in ozonized cassava starch. *Ciencia e Tecnología de Alimentos* [en línea] 2013, 33 (Abril-Junio) : [Fecha de consulta: 24 de agosto de 2018] Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=395940116012>> ISSN 0101-2061
67. OMS (Organización Mundial de la Salud). (1996). *Contaminación microbiana de los alimentos vendidos en la vía pública*. Cali. Colombia. P.176.

68. Padilla, J. (2007). Validación secundaria del método de recuento en placa en superficie de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y Bacterias Entéricas en muestras de alimentos en un laboratorio de referencia. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
69. Palacios, M.; P. Lupiola; E. Del Nero; A. Pardo; F. Rodríguez; M. Pita y M. Tejedor. (1999). Primeros resultados del estudio de la persistencia de *Salmonella* en la zona no saturada del suelo agrícola. Estudios de la Zona No Saturada del suelo. Eds. R. Muñoz-Carpena, A. Ritter, C. Tascçon. ICIA: Tenerife.
70. Parzanese, (2011). “Tecnologías para la industria alimentaria”, MINAGRI, Argentina. Consultado el 12 de junio del 2016. (en línea). Disponible en http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Tecnologia/tecnologia/Ficha_04_Ozono.pdf.
71. Prabha, V.; D. Barma; R. Singh and A. Madan. (2015). Ozone Technology in Food Processing: A Review. Trends in Biosciences 0974-8. 6. 4031-4047. Consultado el 02 de abril del 2017. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/305399037_Ozone_Technology_in_Food_Processing_A_Review
72. PRODUCE (Ministerio de la producción), Perú. (2018). “Anuario estadístico pesquero y acuícola 2016”. Disponible en: <http://ogeiee.produce.gob.pe/index.php/shortcode/oe-documentos-publicaciones/publicaciones-anales/item/775-anuario-estadistico-pesquero-y-acuicola-2016>. Consultado el 10 de Julio del 2018.
73. Pereira, E.; E. Rodrigues; V. Picão; A. Pereira; J. Lamounier y M. De Aguiar. (2016). Effect of ozonation on the *Staphylococcus Aureus* inoculated in milk. Semina: Ciências Agrárias [en línea] 2016, 37 (Julio-Agosto) : [Fecha de consulta: 24 de agosto de 2018] Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445749546045> ISSN 1676-546X
74. Peters, CJ.; RJ. Young and R. Perry. (1980). “Factors influencing the formation of haloforms in the chlorination materials. Environ Sci. Technol. 14 1391-95.
75. Quinn P.; B. Markey; M. Carter; W. Donnelly and F. Leonard. (2002). Veterinary microbiology and microbial disease. Blackwell Science. USA. 517 p.
76. Quiñones, E.; F. Vázquez; F. Pedroche; L. Moreno y O. Rodas. (2000). Presencia de los géneros *Vibrio* y *Salmonella*, y detección de coliformes fecales en almejas del Golfo de México. Hidrobiológica 70 (2): 131-138.

77. Restaino, L. (1995). Eficacy of ozonated water against various food related microorganisms, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 61, No 9 P, 3471-75, 1995 Broadwater 1973 Broadwater W.T, et. al, Sensitivity of three selected bacterial species to ozone, *Appl, Microbial.*, 26:391-93, 1973
78. Rice, R. and A. Netze. (1984). *Handbook of Ozone Technology and Applications. Volumen II.* Butterworth-Heinemann. United States. Pp. 325.
79. Rice, R. (2002). Century 21 Pregnant with ozone: *Science & Engineering*, 24(2): 1-15.
80. Rice, R. (1985). "The use of ozone in non-conventional treatment techniques for controlling organics in drinking water. *Ozone in water treatment applications, operations and technology*". AWWA. USA. pp 47-70.
81. Richardson S.; A. Thurston and T. Collette. (1998). "Multispectral identification of chlorine dioxide disinfection by products in drinking water". *Environmental Science and Technology*, 28:1526-1536.
82. Ripamonti, B.; S. Bersani y S. Pirani. (2009). Studio dell'utilizzo dell'ozono gassoso come sanificante nell'industria delle carni- In: *RIVISTA DELL'ASSOCIAZIONE ITALIANA DEI VETERINARI IGIENISTI.* - ISSN 1974-8620. - 3:1(2009), pp. 62-67. Consultado el 02 de agosto del 2018. Disponible en: <https://air.unimi.it/handle/2434/143837?mode=simple.6#.W4sfWyRKi01>
83. Román, G.; M. Campos; J. Cano y C. Acosta. (2000). *Biología y cultivo de Pectínidos.* Pp. 215-240- En: J. Méndez (ed.). *Los moluscos bivalvos: aspectos citogenéticos, moleculares y aplicados.* Monografías, No 87. Universidad de da Coruña España.
84. Rombouts, A. (1991). *Guidebook to pecten shells: recent Pectinidae and Propeamussiidae of the world.* Universal Book Services/Dr. W. Backhuys, Oegstgeest, The Netherlands. XIII + 157 pp.
85. Monarca, S.; D. Richardson; M. Feretti; AD. Grottolo and J. Thruston. (2002). "Mutagenicity and disinfection by products in surface drinking water disinfected with peracetic acid". *Environ Toxicol. Chem.* 21 309-18.
86. Sanchez, A. (2008). Efectos de Trihalometanos sobre la salud. Consultado el 20 de marzo del 2017. (en línea). Disponible en [http://www.salud-publica.es/secciones/revista/revistaspdf/bc51018a2311531_Hig.Sanid.Ambient.8.280-290\(2008\).pdf](http://www.salud-publica.es/secciones/revista/revistaspdf/bc51018a2311531_Hig.Sanid.Ambient.8.280-290(2008).pdf).
87. Sánchez, L. y Sáenz, E. (2005). "Antisépticos y desinfectantes". *Dermatología Peruana.* 2005; 15(2): 92-103.

88. Sanchis, J. (2002). “Los nueve parámetros más críticos en el muestreo biológico del aire”. *Técnicas de laboratorio*. 2002; 24(276): 858-86
89. Sarcos, M. y L. Botero. (2005). Calidad microbiológica de la almeja *Polymesoda solida* recolectada en playas del Municipio Miranda del estado Zulia. *Ciencia*. 13: 34-43. 2005.
90. Selma, M.; A. Ibáñez; M. Cantwell y T. Suslow. (2008). Reduction by gaseous ozone of *Salmonella* spp. and microbial flora associated with fresh-cut cantaloupe. *Food Microbiology*, 25: 558-565.
91. Sharrer, M. and S. Summerfelt. (2007). Ozonation followed by ultraviolet irradiation provides effective bacteria inactivation in a freshwater recirculation system. The Conservation Fund’s Freshwater Institute. *Aquacultural Engineering*, 37(2): 180–191
92. Suarez, V. (2012). “Estimación del riesgo a la salud por consumo del Ostión Americano depurado mediante tecnologías avanzadas de oxidación (Mezclas UV/Ozono)” Tesis Mg. México. Universidad Veracruzana P.6. Consultado el 29 de mayo del 2017 (en línea). Disponible en <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/30451/1/SuarezValencia.pdf>.
93. SIICEX (Sistema integrado de información de comercio exterior), Perú. (2018) Disponible en: http://www.siicex.gob.pe/siicex/portal5ES.asp?_page_=172.17100#anclafecha. Consultado el 19 de agosto del 2018
94. Takamoto Y.; H. Maeba y M. Kamimura. (1992). “Changes in survival rates of enzyme activities in *Escherichia coli* with ozone”. *Apply Microbiol Biotechnol* 37:393-395.
95. Terzolo, H. (2011). Estudio bacteriológico de las salmonelosis de las aves (*S. pullorum*, *S. gallinarum*, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*) en América Latina. Memorias del Seminario Internacional sobre Salmonelosis Aviar. Rio de Janeiro, Brasil. 19 p.
96. Terzolo H.; S. Feingold y A. Velilla. (2006). Avances en el diagnóstico molecular de *Salmonella* spp.. *Mundo Lácteo y Cárnico*. Enero/febrero: 18-20.
97. Thanomsub, B.; V. Anupunpisit; S. Chanphetch; T. Watcharachaipong; R. Poonkhum and C. Srisukonth. (2002). Effects of ozone treatment on cell growth and ultrastructural changes in bacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 48(4): 193–199.

98. Thatcher, D. (1973). *Análisis Microbiológico de los Alimentos*. Editorial Acribia, Zaragoza.
99. UNC. (Universidad Nacional de Colombia), Colombia. (2011). “Conceptos y práctica de microbiología general”. (en línea). Consultado el 14 de abril del 2017. Disponible en <http://www.bdigital.unal.edu.co/4999/1/albertorojastrivino.2011.pdf>
100. USDA (United States department of agricultura), USA. (2016). *Salmonella* and Salmonellosis. Consultado el 15 de agosto del 2017. Disponible en: https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/footer/!ut/p/a0/04_Sj9CPykyssy0xPLMnMz0vMAfGjzOJNAyxDDU28DbwsvIxdDDzDnA3NLIONjdzCjPQLsh0VAZaJ_MY!/?1dmy¤t=true&urile=wcm%3Apath%3A%2Ffsis-content%2Finternet%2Fmain%2Ftopics%2Ffood-safety-education%2Fget-answers%2Ffood-safety-fact-sheets%2Ffoodborne-illness-and-disease%2Fsalmonella
101. USDA/FSIS (United States department of agriculture/food safety and inspection service), USA. (2011). Isolation and identification of *Salmonella* spp. from meat, poultry, pasteurized egg and catfish products. Chapter revised MLG 4.05. Washington, DC 16 p.
102. USEPA. (U.S. Environmental Protection Agency), USA. (1995). Ozone Generators in Indoor Air Settings. Report prepared for the Office of Research and Development by Raymond Steiber. National Risk Management Research Laboratory. U.S. EPA. Research Triangle Park. EPA-600/R-95-154
103. USFDA. (United States Food and Drug Administration), USA. (1995). “Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition. MD. USA. p.618.
104. USFDA. (United States Food and Drug Administration). (2010). “Secondary direct food additives permitted in food for human consumption”, final rule. Federal Register 66, 2001, p.33829-33830.
105. Varnam, A. and J. Sutherland. (1998). “Carne y productos cárnicos: tecnología, química y microbiología. Editorial Acribia. España. p.423.
106. Vestergaard, E. (2001). Building product confidence with challenge studies. *Dairy Food Environ Sanit* 21(3):206-9.
107. Vite, D. (2015). “Efecto del Tiempo de Exposición al Ozono Gaseoso y Tiempo de Almacenamiento sobre las características Fisicoquímicas, Microbiológicas y Aceptabilidad General en Fresas”. Tesis Ing. Perú. Universidad Privada Antenor Orrego. P.124. (en línea). Consultada el 25 de enero del 2016. Disponible en

http://repositorio.upao.edu.pe/bitstream/upaorep/816/1/VITE_DIEGO_TIEMPO_EXP_OSICI%C3%93_OZONO.pdf.

- 108.** Walker, S. (1999). Microbiología. Mc Graw Hill Interamericana. México.
- 109.** WHO (World Health Organization), USA. (2011). (Citado 2014 junio 30); (1 página).
Disponible en: <http://www.who.int/en/>.
- 110.** Yáñez, E.; S. Máttar y A. Durango. (2008). Determinación de *Salmonella* spp. por PCR en tiempo real y método convencional en canales de bovinos y en alimentos de la vía pública de Montería, Córdoba. Rev. Asoc. Colombiana de Infectología. 12(04):246-254.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Preparación del nefelómetro de Mc farland.

El nefelómetro de Mc Farland es una escala de densidad cuya turbidez equivalente va de 300 en 300 millones de bacterias por mililitro (10^6 UFC/ml).

Tubo	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
BaCl₂ 1% (ml)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
H₂SO₄ 1% (ml)	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0
Turbidez Equivalente	300	600	900	1200	1500	1800	2000	2400	1700	3000

Anexo 2. Metodología y Escala de Mc farland

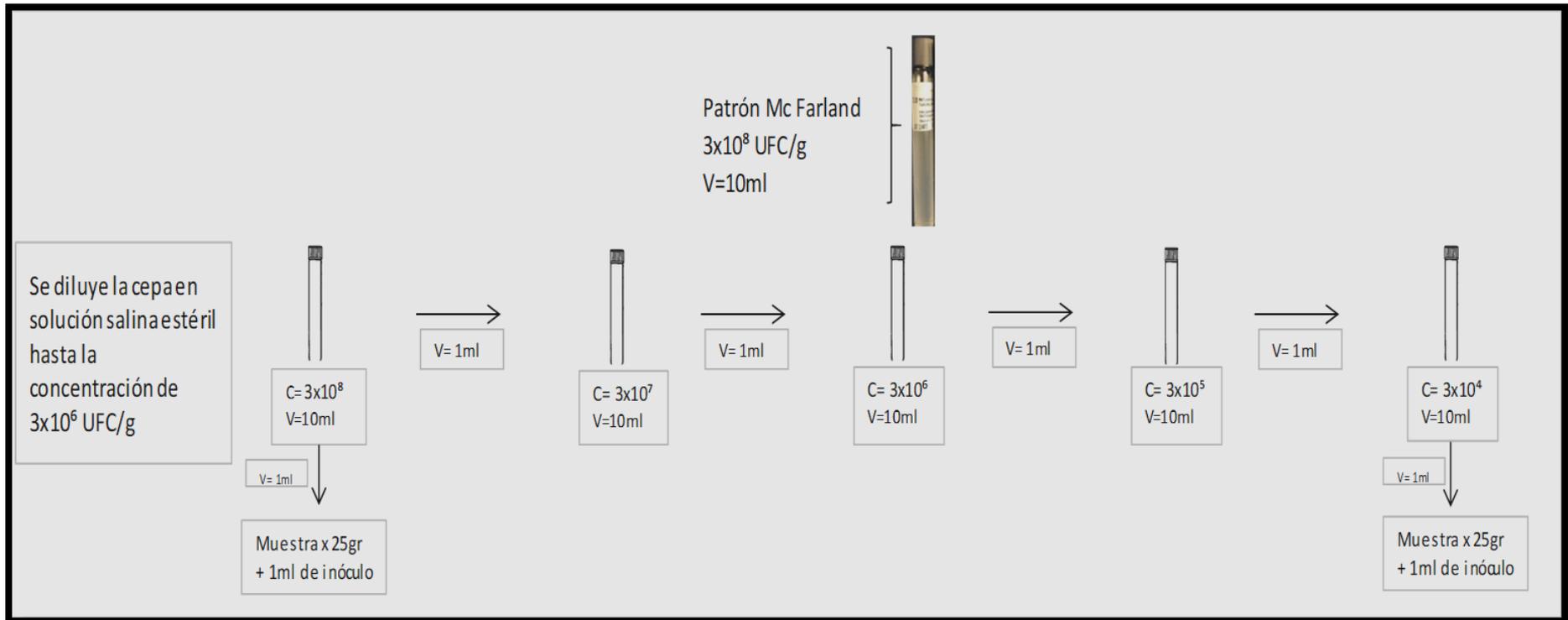
Es la técnica basada en la turbidimetría; La escala se basa en la capacidad de precipitación del Cloruro de Bario en presencia de Ácido Sulfúrico y su utilidad, es la de poder elaborar suspensiones bacterianas ajustadas a un patrón y valorando su concentración; para esto, se toma una alícuota de la muestra de bacterias y se inocula en un tubo conteniendo solución salina al 85%. El objetivo es lograr ajustar una concentración de bacterias a uno de los patrones requeridos (UNC, 2011).

Escala Mc Farland y proporciones de preparación.

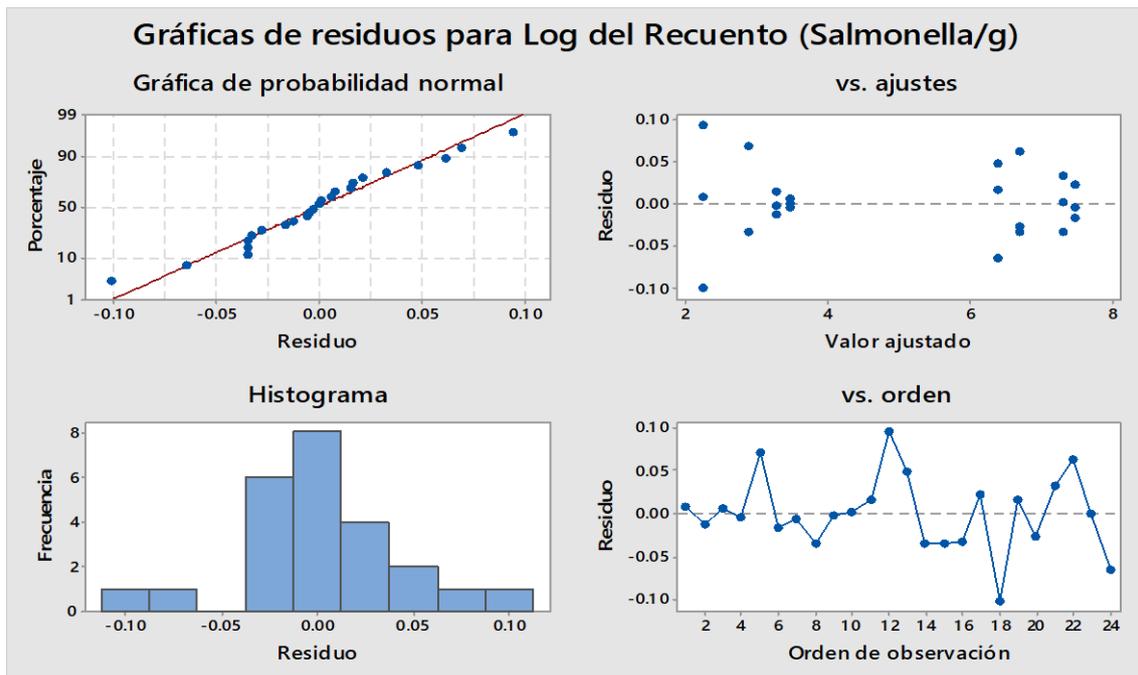
Escala de McFarland	BaCl ₂ 1% (mL)	H ₂ SO ₄ 1% (mL)	UFC/mL
4	0,1	9,9	3,0 x 10 ⁸
3,7	0,2	9,8	6,0 x 10 ⁸
3,5	0,3	9,7	9,0 x 10 ⁸
3,4	0,4	9,6	1,2 x 10 ⁹
3,3	0,5	9,5	1,5 x 10 ⁹
3,2	0,6	9,4	1,8 x 10 ⁹
3,15	0,7	9,3	2,1 x 10 ⁹
3,1	0,8	9,2	2,4 x 10 ⁹
3,04	0,9	9,1	2,7 x 10 ⁹
3	1	9	3,0 x 10 ⁹

FUENTE: UNC, (2011)

Anexo 3. Preparación de diluciones sucesivas



Anexo 4. Verificación de supuestos estadísticos en DCA



Anexo 5. Respuesta del análisis estadístico con Minitab

Diseño factorial de múltiples niveles

Factores: 2 Réplicas: 3
Corridas base: 8 Total de corridas: 24
Bloques base: 1 Total de bloques: 1

Número de niveles: 2, 4

Tabla de diseño (aleatorizada)

Corrida	Blq	A	B
1	1	1	4
2	1	1	2
3	1	1	1
4	1	2	1
5	1	1	3
6	1	2	1
7	1	1	1
8	1	2	3
9	1	1	2
10	1	2	2
11	1	1	2
12	1	1	4
13	1	2	4
14	1	1	3
15	1	1	3
16	1	2	2
17	1	2	1
18	1	1	4
19	1	2	4
20	1	2	3
21	1	2	2
22	1	2	3
23	1	1	1
24	1	2	4

Leyenda:

A: Inóculo	B: Tiempo de Exposición
1= 3×10^4	1 = 5 minutos
2= 3×10^8	2 = 20 minutos
	3 = 40 minutos
	4 = 60 minutos

Modelo lineal general: Log del Recuento (Salmonella/g) vs. Inóculo, Tiempo de Exposición

Método

Codificación de factores (-1, 0, +1)

Información del factor

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Inóculo	Fijo	2	1, 2
Tiempo de Exposición	Fijo	4	5, 20, 40, 60

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Inóculo	1	96.313	96.3125	13780.12	0.000
Tiempo de Exposición	3	4.981	1.6605	237.57	0.000
Error	19	0.133	0.0070		
Falta de ajuste	3	0.090	0.0301	11.34	0.000
Error puro	16	0.042	0.0027		
Total	23	101.427			

Resumen del modelo

S= 0.0836017 R-cuad= 99.87% R-cuad (ajustado)= 99.84% R-cuad(pred)= 99.79%

Ecuación de regresión

$$\begin{aligned}\text{Log del Recuento (Salmonella/g)} = & 4.9830 - 2.0033 \cdot 3.96 \cdot 10^3 + 2.0033 \cdot 3.88 \cdot 10^7 \\ & + 0.5122 \cdot 5 \\ & + 0.3205 \cdot 20 \\ & - 0.1731 \cdot 40 \\ & - 0.6596 \cdot 60\end{aligned}$$

Prueba de valores atípicos: Log del Recuento (Salmonella/g)

Método

Hipótesis nula: Todos los valores de los datos provienen de la misma población normal

Hipótesis alterna: El valor más pequeño o más grande de los datos es un valor atípico

Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

Prueba de Grubbs

Variable	N	Media	Desv.Est.	Mín.	Máy.	G	P
Log Recuento (Salmonella/g)	24	4.983	2.100	2.146	7.526	1.35	1.000

*** NOTA * No hay valor atípico en el nivel de significancia de 5%**

Anexo 6. Prueba de múltiples comparaciones de Tukey

Comparaciones por parejas de Tukey: Respuesta = Log del Recuento (Salmonella/g), Término = In

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Inóculo	N	Media	Agrupación
2	12	6.98629	A
1	12	2.97979	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de Inóculo niveles	Diferencia de medias	EE de diferencia	IC simultáneo de 95%	Valor T ajustado	Valor p
2 - 1	4.0065	0.0341	(3.9351, 4.0779)	117.39	0.000

Nivel de confianza individual = 95.00%

Comparaciones por parejas de Tukey: Respuesta = Log del Recuento (Salmonella/g), Término = Ti

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tiempo de Exposición	N	Media	Agrupación
1	6	5.49528	A
2	6	5.30358	B
3	6	4.80990	C
4	6	4.32340	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de Tiempo de Exposición niveles	Diferencia de medias	EE de diferencia	IC simultáneo de 95%	Valor T ajustado	Valor p
2 - 1	-0.1917	0.0483	(-0.3275, -0.0559)	-3.97	0.004
3 - 1	-0.6854	0.0483	(-0.8212, -0.5495)	-14.20	0.000
4 - 1	-1.1719	0.0483	(-1.3077, -1.0360)	-24.28	0.000
3 - 2	-0.4937	0.0483	(-0.6295, -0.3578)	-10.23	0.000
4 - 2	-0.9802	0.0483	(-1.1160, -0.8443)	-20.31	0.000

4 - 3 -0.4865 0.0483 (-0.6223, -0.3507) -10.08 0.000

Nivel de confianza individual = 98.89%

Leyenda:

A: Inóculo	B: Tiempo de Exposición
1 = 3×10^4	1 = 5 minutos
2 = 3×10^8	2 = 20 minutos
	3 = 40 minutos
	4 = 60 minutos