



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS**

**EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE FILTROS A
BASE DE ZEOLITA Y CARBÓN ACTIVADO PARA
RETENER MICROORGANISMOS DEL AIRE
INTERNO DE REFRIGERADORES DOMÉSTICOS**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN QUÍMICA EN ALIMENTOS**

**PRESENTA
ENRIQUE ESPINOSA HURTADO**

**ASESOR
DR. JAVIER CASTRO ROSAS**



PACHUCA DE SOTO, HIDALGO 2009.

ÍNDICE GENERAL

		Pág.
	Índice general.	I
	Índice de figuras.	IV
	Índice de tablas.	VII
	Dedicatorias.	VIII
	Agradecimientos	IX
I	INTRODUCCIÒN.	1
II	ANTECEDENTES.	2
2.1	Contaminación en el ambiente.	2
2.1.1	Microbiología del aire.	2
2.1.2	Composición y concentración de la flora aérea.	4
2.1.3	Microbiología del aire en el interior de los edificios.	4
2.1.4	Estudios de los microorganismos del aire.	7
2.2	Filtros.	9
2.2.1	Filtros de carbón activado.	9
2.2.2	Filtros de zeolita.	10
2.3	Materiales que se utilizan en los filtros de refrigeradores y sus características.	11
2.3.1	Carbón activado.	11
2.3.2	Funciones del carbón activado.	11
2.3.3	La zeolita.	13
2.3.4	Uso de la zeolitas.	15
2.4	<i>Escherichia coli</i> .	16
2.4.1	Caracteres de cultivo.	17
2.4.2	Resistencia.	18
2.5	Control de los microorganismos que alteran los	19

	alimentos, en refrigeración.	
2.6	Choque térmico por enfriamiento.	23
III	OBJETIVO GENERAL.	24
IV	OBJETIVOS ESPECÌFICOS.	24
V	METODOLOGÌA.	25
5.1	Materiales.	26
5.1.1	Equipo.	26
5.1.2	Material común.	26
5.2	Soluciones.	27
5.3	Sustancias.	27
5.4	Material filtrante.	27
5.5	Tratamiento de microorganismos.	27
5.6	Evaluación de la capacidad de retención máxima de microorganismos en suspensión acuosa por el material filtrante (zeolita y carbón activado).	29
5.6.1	Inoculación sucesiva de la columna con carbón activado.	30
5.6.2	Acción germicida del permanganato de potasio que contiene la zeolita.	33
5.6.3	Inoculación sucesiva de la columna con zeolita sin permanganato.	35
5.7	Evaluación de la desorción de microorganismos del material filtrante.	37
5.7.1	Desorción a alta concentración de microorganismos.	37
5.7.2	Desorción a baja concentración de microorganismos.	39
5.8	Establecer condiciones para suspender controladamente microorganismos dentro de los refrigeradores con un sistema de aerosoles.	41
5.8.1	Tratamiento del cultivo microbiano.	41

5.8.2	Generación y recuento de microorganismos en aerosoles.	42
5.9	Evaluación de la eficiencia de los materiales filtrantes dentro del refrigerador.	44
5.9.1	Comparación del crecimiento de <i>E. coli</i> en agar soya tripticasa y en agar bilis rojo violeta.	44
5.9.2	Evaluación de microorganismos suspendidos en el refrigerador por medio de cajas petri.	45
5.9.3	Evaluación de la eficiencia del filtro por el método de muestreo con bomba de vacío.	48
5.9.4	Evaluación de la eficiencia del filtro por el método simple de cajas petri.	51
5.10	Evaluación del estrés de <i>E. coli</i> causado por la temperatura.	52
5.10.1	Experimento en refrigeradores.	52
5.10.2	Experimento de evaluación de estrés por temperatura en tubos.	55
VI	RESULTADOS Y DISCUSIONES.	58
VII	CONCLUSIONES.	86
VIII	BIBLIOGRAFIA.	88

ÌNDICE DE FIGURAS.

Figura		Pág.
1	Mecanismo de criba.	9
2	Estructura de una zeolita faujasita.	13
3	Inoculación sucesiva de la columna de carbón activado.	31
4	Diagrama de flujo de inoculación sucesiva de la columna.	32
5	Acción germicida del permanganato de potasio.	34
6	Retención máxima de microorganismos por zeolita sin permanganato.	36
7	Evaluar la desorción de microorganismos.	38
8	Desorción a baja concentración.	40
9	Tratamiento del cultivo microbiano.	41
10	Generación y recuento de microorganismos en aerosoles.	43
11	Comparación del crecimiento de <i>E. coli</i> en AST y en ABRV.	45
12	Diagrama de distribución de cajas petri en el refrigerador.	47
13	Recuento de microorganismos dentro del refrigerador.	48
14	Evaluación de la eficiencia del filtro por el método de muestreo con bomba de vacío.	50
15	Evaluación de la eficiencia del filtro por el método de cajas petri.	52
16	Evaluación del estrés de <i>E. coli</i> causado por la temperatura.	54
17	Evaluación del estrés de <i>E. coli</i> causado por la temperatura.	57

18	Microorganismos retenidos por el carbón.	60
19	Retención y acumulación de microorganismos por carbón vegetal.	61
20	Acumulación de microorganismos por carbón mineral.	62
21	Retención y acumulación de microorganismos por carbón mineral.	64
22	Microorganismos acumulados en la columna de carbón mineral (a).	65
23	Retención y acumulación de microorganismos por carbón mineral (b).	66
24	Microorganismos acumulados en la columna de carbón mineral (b)	67
25	Retención de microorganismo por carbón mineral (triplicado).	68
26	Microorganismos acumulados en la columna de carbón mineral.	69
27	Retención de microorganismo por carbón mineral (triplicado).	70
28	Acumulación de microorganismos por carbón mineral.	70
29	Liberación y retención de células por carbón partiendo de una concentración inicial de microorganismos alta.	71
30	Concentración de microorganismos en el carbón después de los lavados.	73
31	Desorción y retención de células partiendo de una concentración de microorganismos inicial alta.	74
32	Retención de microorganismos por la zeolita.	76
33	Retención y acumulación de zeolita sin permanganato, Exp. 2.	77
34	Retención y acumulación de microorganismos por zeolita.	78

35	Comparación de recuperación de <i>E.coli</i> de aerosoles generados a partir de suspensiones almacenadas previamente a temperatura ambiente o de refrigeración.	84
----	---	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Pág.
1	Tabla de muestreos para sistema de aerosoles.	49
2	Tabla de muestreos para evaluar estrés de <i>E. coli</i> .	56
3	Tabla de comparación de porcentajes de retención y liberación.	74
4	Comparación de crecimiento de <i>E.coli</i> en AST y ABRV.	80
5	Promedio de microorganismos por caja de cultivo recuperados según posición dentro del refrigerador sin filtro (control).	81
6	Promedio de microorganismos por caja de cultivo recuperados según posición dentro del refrigerador con filtro de carbón.	82
7	Promedio de microorganismos por caja de cultivo recuperados según posición dentro del refrigerador con filtro de zeolita.	82
8	Evaluación del estrés de <i>E. coli</i> causado por la temperatura.	84
9	Efecto de la temperatura de almacenamiento previa, de suspensiones de <i>E. coli</i> , sobre el estrés provocado a las células de estas suspensiones debido a un enfriamiento súbito.	85

DEDICATORIAS

En este segmento intentare plasmar mi agradecimiento eterno para todas aquellas personas, que han influido de manera positiva en mi vida y que han hecho de mí una mejor persona.

Antes que nada quiero dedicarle a dios este trabajo por que significa la culminación de un esfuerzo colectivo, significa la culminación de muchos eventos unos buenos, otros no tanto pero lo más importante es que gracias a el he salido adelante. Aún falta un largo camino por recorrer, faltan emociones, alegrías, tristezas, desventuras, quedan cosas por aprender, personas por conocer, retos por superar, problemas que resolver y lo más importante queda vida por vivir. Pero no importa que nos depare el futuro, lo que importa es tener fe en nosotros mismos y en la gente que nos quiere así como también no perder la esperanza de que dios existe y esta con nosotros.

Por mi corazón pasan muchas emociones y la más importante es la alegría y tristeza que siento al dedicarle este trabajo a mi papa que físicamente esta en otro lado gozando de la compañía de mis abuelitos Gregorio, Esperanza y Juana.

Pero en nuestros pensamientos el siempre está con nosotros y nos ayuda para que podamos salir adelante.

Otra persona que ha estado conmigo de manera incansable que la única cosa que me ha dado es amor, que me ha perdonado en las múltiples fallas que he tenido, que me ha cuidado y que siempre me ha amado. A mi mama quisiera decirle simplemente gracias por todo, la quiero y solo espero ser mejor persona cada día para corresponder ese amor incondicional que siente por mi y toda su familia.

Este párrafo se lo dedico a la mejor parte de mi vida. A Emiliano y a Celeste dos seres pequeños de edad, que significan todo para mí y que hacen que todo esfuerzo valga la pena los amo y mi trabajo va en busca de su felicidad.

AGRADECIMIENTOS

Quiero empezar esta lista con una mujer que como todas ellas es incansable, es tenaz, es hermosa y nunca me ha dejado solo desde que decidimos emprender esta aventura que espero y dure por muchos años más. Gracias Viviana por todo y siempre ten ese vicio, que aunque sea el más caro es el más hermoso.

Ya entrados en materia agradezco infinitamente a mis hermanos y a mi familia por apoyarme en todo y creer en mí. Sin hacer a un lado a nadie quiero mencionar en especial a mi tío Sergio que con su forma de ser me ha sacado de múltiples dificultades.

Desde hace un par de años radico en Apaxco de Ocampo Estado de México y aunque como todos los inicios son difíciles creo que hemos sabido entendernos, respetarnos y querernos. Gracias a todos por su apoyo, cariño y aceptación.

Por ultimo pero no por eso menos importante quiero darles las gracias a todos mis amigos sin ellos la estancia universitaria hubiera sido muy difícil y aunque generalmente nuestra unión era una entropía total hubo momentos en que la solidaridad, el apoyo emocional, la palabra precisa salió de sus bocas les deseo lo mejor a cada uno de ustedes no los menciono por que mi maltratada memoria podría traicionarme y omitiría algún nombre cosa que sería terrible. Y como todo cabe en un jarrito sabiéndolo acomodar la parte medular de la estancia universitaria la hicieron los profesores todos ellos comprometidos con su deber, pacientes en su enseñar y siempre dispuestos a agotar hasta la última gota de su paciencia para que la enseñanza llegue a su objetivo y de esa manera podamos engrandecer nuestro espíritu. Gracias a cada uno de ellos en especial al Dr. Javier Castro Rosas sin su invaluable ayuda esto no hubiera sido posible. Para finalizar les dedico a todos esta canción sean felices y nuevamente gracias.

ATENTAMENTE

Q.A. Enrique Espinosa Hurtado.

INVINCIBLE

Follow through
Make your dreams come true
Don't give up the fight
You will be alright
Cause there's no one like you in the universe

Don't be afraid
What your mind consumes
You should make a stand
Stand up for what you believe
And tonight
We can truly say
Together we're invincible

During the struggle
They will pull us down
But please, please
Lets use this chance
To turn things around
And tonight
We can truly say
Together we're invincible

Do it on your own
It makes no difference to me
What you leave behind
What you choose to be
And whatever they say
Your souls unbreakable

I. INTRODUCCIÓN

La generación de alimentos con mayor vida de anaquel, sin deterioro e inocuos, ha llevado a muchas empresas a mejorar sus procesos y tecnologías de producción. No obstante, no sólo las empresas directamente involucradas en la producción de alimentos son las que han evolucionado en este sentido, si no también aquellas indirectamente involucradas como es el caso de las encargadas de generar los sistemas de refrigeración. Algunas de estas empresas, se han preocupado en la generación de equipos con mínimos riesgos de contaminación microbiana dentro del refrigerador. Uno de los principales factores relacionado con la contaminación interna del refrigerador es la introducción de alimentos con alta carga microbiológica (verduras, quesos, carne, pescado). A partir de estos, los microorganismos pueden ser esparcidos al ambiente en forma de pequeños aerosoles. Según el vehículo (tierra o agua), los aerosoles podrían depositarse en las paredes del refrigerador o en los alimentos contaminándolos. Una alternativa que han tomado muchas empresas productoras de refrigeradores para disminuir la contaminación, es colocar filtros dentro de los equipos para retener los microorganismos suspendidos disminuyendo con esto los riesgos de contaminación. No obstante la eficiencia de la mayoría de estos filtros no ha sido evaluada.

La empresa productora de refrigeradores requirió apoyo para evaluar la eficiencia de un tipo de filtro para incorporarlo a los refrigeradores que produce. En el presente trabajo se evaluó la capacidad del filtro y de sus componentes, para retener microorganismos presentes en la atmósfera interna de los refrigeradores, así como también se desarrolló una metodología para evaluar la eficiencia de los filtros.

II. ANTECEDENTES

2.1. Contaminación en el ambiente

2.1.1. Microbiología del Aire

Por si solo el aire es un medio inapropiado para el crecimiento de los microorganismos debido a que carece de nutrientes suficientes y de un suministro constante de agua. Además el aire no es estéril, puede contener partículas de polvo, bacterias, esporas de hongos y granos de polen en cantidades variables según sus condiciones y procedencia. (Hawker y *col.*, 1964)

Con frecuencia los microorganismos que se encuentran en el aire no se multiplican en este medio, no obstante se encuentran dispersos en el, ya sea adheridos a partículas de polvo de la superficie de la tierra o en diminutas gotas de agua. (De Lima y Gadelha, 1983).

Trataremos de dos formas el aire: aire libre y aire refinado. El primero rara vez contiene organismos patógenos para el hombre mientras que el último es el vehículo de transmisión de numerosas especies importantes que causan infecciones de las vías respiratorias. El aire libre a poca distancia por encima del suelo contiene gran variedad de cocos y bacilos cromógenos, esporas de hongos y bacilos aerobios. Los estudios en aeroplanos han demostrado que las bacterias del suelo y del agua se encuentran hasta unos siete mil metros por encima de la tierra y pueden aun cruzar los océanos en las corrientes del aire. La ausencia casi completa de bacterias patógenas en el aire libre se puede explicar por el efecto combinado de la desecación y de los rayos ultravioletas de la luz solar. (Horacio C. Quiroz. 2003).

El aire confinado contiene, en pequeño número, la misma clase de microorganismos que se encuentran en el aire libre y además un número relativamente grande de organismos no patógenos y potencialmente patógenos del hombre, incluso virus. El hombre esparce constantemente microorganismos en el aire. Algunos llegan a él por descamación de la piel; otros por contaminaciones fecales imperceptibles de las manos y de la ropa; pero la mayor parte salen del cuerpo por las vías respiratorias superiores. La conversación tranquila, por ejemplo, expulsa más de 5000 bacterias por segundo, aunque solamente 7.2 % de las gotitas expedidas tienen menos de 4 micras de diámetro. Con mascarillas de gasa, los sujetos expelen sólo diecinueve bacterias contaminantes, pero 63 % de las gotitas tienen menos de 4 micras de diámetros. La tos expulsa más bacterias, y un estornudo fuerte puede dispersar unas veinte mil gotitas, la mayoría de las cuales contienen bacterias o virus. Las gotitas varían desde un diámetro de 10 micras a 2 mm. Y las más grandes recorren una distancia de cinco metros antes de caer al suelo. Por otro lado, las gotas pueden adherirse a partículas de polvo y al secarse dejan los organismos en estas partículas. Las gotitas más pequeñas permanecen suspendidas en el aire y se evaporan en menos de un segundo, dejando "núcleos de gotita" de pocas micras de diámetro que pueden contener o no, uno o más microorganismos. Estos núcleos se sedimentan con mucha lentitud, y en una habitación ordinaria llena de gente los núcleos de gotita son llevados por las corrientes de aire y permanecen en suspensión casi indefinidamente. (McDonald et al., 2000; Chang *et al.*, 1985).

En una habitación cerrada llena de gente el efecto de la luz ultravioleta del sol es nula y por lo tanto las bacterias tienden a sobrevivir por más tiempo. Es evidente que en estas condiciones se acumulan organismos potencialmente infecciosos. (J. A. García Rodríguez 1999).

La lucha contra los microorganismos infecciosos transportados por el aire sigue siendo el problema más importante de salud pública. (Royer Stanier 1996).

La instalación de luz ultravioleta en las salas de operaciones ha eliminado casi por completo las infecciones por el aire. (Zinsser, 1971)

2.1.2. Composición y concentración de la flora aérea

La composición y la concentración de la flora aérea dependen del origen de los organismos, del clima, de la altitud, de la presencia de montañas o de barreras marinas, de la estación y de la hora del día. (Chang et al., 1985).

Las bacterias y las esporas de los hongos van al aire desde las superficies con las que éste está en contacto. Aunque la turbulencia del aire distribuye estos organismos y las corrientes de aire pueden llevarlos a grandes distancias del punto de partida, todas las especies tienden a concentrarse en las cercanías de su lugar de origen. Pasteur, pudo demostrar que los organismos eran más numerosos en el aire que se encuentra por arriba de las ciudades que en el de arriba de las montañas. El número de bacterias disminuye con la altitud. Sobre el mar se hallan pocas esporas de hongos, aun que aquí las bacterias son elevadas constantemente con los aerosoles que se forman por el oleaje. (Hawker y col., 1964)

2.1.3. Microbiología del aire en el interior de los edificios

Muchos organismos de los que se hallan normalmente en la atmósfera exterior están también presentes en el interior de los edificios, donde se introducen a favor de las corrientes de aire, no obstante, el origen principal de los organismos de las atmósferas cerradas está dentro de los mismos edificios.

La cantidad de microorganismos y sus esporas dentro de un edificio es generalmente mayor que afuera. Los productos alimenticios, los textiles, la piel y el pelo del hombre constituyen un importante origen de muchos de los organismos del aire. (Irving et al., 1997).

Por lo general en el aire de un edificio están presentes bacterias saprofitas y parásitas, esporas de la especies *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* y otros hongos, *Rhodotorula* y otras levaduras, las cuales pueden ser peligrosas por originar enfermedades y reacciones alérgicas. Las bacterias patógenas y comensales de la nariz y de la garganta son lanzados al aire en gotitas de agua al toser o estornudar, y pueden quedar suspendidas en el aire o adherirse a las partículas de polvo. Los microorganismos una vez adheridos pueden permanecer viables por mucho tiempo. Muchos de los virus, entre los que se incluyen los de la gripe, el del resfriado común, el de la neumonía, el del sarampión, el de la rubéola y el de la viruela se diseminan por el aire y pueden provocar una infección al ser inhalados. (Riesenman y Nicholson, 2000).

El polvo sea de origen animal, vegetal o mineral, puede estar muy contaminado por los microorganismos. Las partículas más densas se depositan rápidamente, pero se vuelven a levantar con facilidad por las corrientes de aire o por actividades como el barrer. Las partículas de un diámetro de 1μ o menor quedan suspendidas permanentemente. Cuando se inhala el polvo, las partículas mayores quedan atrapadas en las superficies mucosas de las vías respiratorias superiores, de donde las eliminan el paso de la saliva y el estornudo. Las partículas de menos de 10μ de diámetro pueden pasar directamente a los alvéolos pulmonares y pueden llevar con ellas organismos patógenos. Tienen una importancia particular las habitaciones, las salas de hospitales, el sacudir los pañuelos y trajes. (Heidelberg *et al.*, 1997; Seller, 1983).

Se ha demostrado que los organismos que producen la escarlatina (*Streptococcus pyogenes*), la tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*) y la difteria (*Corynebacterium diphtheriae*) están presentes en el polvo de las salas de los hospitales. Diversas enfermedades profesionales se producen a consecuencia de la inhalación de polvo contaminado en relación con la ocupación de cada uno. (Holt et al., 1994).

Así, la enfermedad de los clasificadores de lana se debe a la inhalación de partículas de polvo contaminadas con esporas del bacilo carbuncoso, procedente de la lana importada de las partes del mundo en las que es común el carbuncio, y la tos de los catadores de té resulta del número anormal de esporas de las especies de *Aspergillus*, incluso del patógeno *A. fumigatus*, en los almacenes de té. Puede proceder, al igual que otras especies de *Aspergillus* y de *Penicillium* del grano, paja o cualquier otro material vegetal húmedo enmohecido. (Riesenman y Nicholson, 2000).

La contaminación del aire es ordinariamente elevada en las cuadras, debido a la presencia de las camas, forraje, heces secas y a la contaminación por el pelaje de los animales. Los organismos aéreos no están diluidos ni dispersos, como en el aire exterior, de modo que están continuamente aumentando en número, y sobreviven más largo tiempo en las atmósferas húmedas a cubierto de la luz del sol, ya que los rayos solares bactericidas penetran solamente en parte a través del vidrio de las ventanas. El número de organismos presentes depende del número de animales alojados, de la ventilación, del movimiento del polvo (en un experimento se elevaron enormemente los recuentos que se realizaban después de la hora de la comida, la cual lleva consigo un gran movimiento del grano) y de las medidas de la lucha contra el polvo. (Hawker y col., 1964)

2.1.4. Estudio de los microorganismos del aire

Para el estudio de cualquier aspecto de la aerobiología es esencial poseer un método seguro para apreciar e identificar los microorganismos del aire. (Sutton *et al.*, 1998; Jones y Cookson, 1983; Marcher y First, 1983).

El método más sencillo es exponer unos portaobjetos microscópicos pegajosos y estudiar posteriormente al microscopio la “trampa”. Este método no distingue entre las células vivas y las muertas. (Irving *et al.*, 1997).

De una manera semejante pueden exponerse placas petri que contengan un medio apropiado y aun más conveniente es exponerlas en un “colector de ranura” que permita proyectar sobre el medio un volumen de aire conocido. El método no sirve para detectar a los parásitos obligados, ni para ninguna clase de microorganismos que no crezcan en las condiciones particulares que se hayan utilizado, y los organismos que crecen con lentitud son enmascarados fácilmente por los más vigorosos. El método de los portas o placas contaminados por la gravedad, por el que se permite que las células bacterianas y las esporas fúngicas caigan sobre la superficie receptora tienen la desventaja adicional de que las partículas de gran tamaño tienden a depositarse más fácilmente y se ha demostrado que la captura no está en relación con la concentración de las bacterias y esporas en el aire. (Holt *et al.*, 1994)

Se han ideado distintos métodos por los que se colectan y estudian las muestras de un volumen conocido de aire. En unos el aire se hace pasar a través de unos filtros que se lavan a continuación, realizándose el recuento sobre los lavados. Para rastrear la atmósfera superior han sido utilizados colectores de esta clase transportados por aviones. Para su utilización a bajas altitudes ha mostrado su utilidad un aparato diseñado originalmente para tomar muestras con polvo o aerosoles. (Blom *et al.*, 1984).

En este caso se equipa el aparato con una veleta y se monta de modo que su orificio de toma mire siempre en dirección al viento. (Blom et al., 1984).

El aire es conducido por orificios cada vez más pequeños, por cada unos de los cuales se estrella contra una superficie preparada, fraccionándose de este modo la muestra en cuatro grupos según sus tamaños. Las esporas de los hongos están ordinariamente ausentes de la última de estas superficies y en la trampa para esporas de "Hist" se omite esta superficie. En este aparato las superficies receptoras se mueven al pasar la corriente de aire, de manera que se puede hacer un registro continuo y se cree que se captura un porcentaje muy grande de las esporas presentes. Este método es menos apropiado para el estudio de las bacterias debido a su menor tamaño. (Hawker y col., 1964)

Los microorganismos del aire, a bajo nivel, pueden ser recolectados con el método simple de dejar que el polvo se deposite en una placa de petri abierta que contenga agar común. Este procedimiento es útil en espacios cerrados. El polvo y los microorganismos pueden también ser recogidos haciendo pasar aire por un tubo que contenga un filtro de arena o algodón húmedo. El algodón o la arena se agitan después en el caldo. Este es uno de los métodos más antiguos y sencillos. (Marthi et al., 1990; Blom et al., 1984; Burge et al., 1977).

Existen muchos otros tipos de mecanismos para recoger la microflora del aire. El procedimiento del impacto consiste en un cilindro recubierto de agar, que rueda lentamente alrededor de su eje vertical. En la superficie del agar viscoso choca una corriente de aire, que transporta el polvo y los microorganismos, a medida que el cilindro gira. Existen también procedimientos de burbujeo, atomizantes y electrostáticos. Además, el filtro de membrana es adaptable para la recogida directa por medio de la filtración del aire. En seguida se presentan algunos mecanismos representativos. (Sutton et al., 1998; Jones y Cookson, 1983; Marcher y First, 1983).

Ninguno de ellos recoge y cuenta absolutamente todos los microorganismos del aire en la muestra comprobada. Algunas células microbianas pasan totalmente a través del filtro, o son destruidas en todos los procesos. (Sutton et al., 1998; Jones y Cookson, 1983; Marcher y First, 1983).

Mecanismo de criba.-Este mecanismo es una forma ingeniosa de mecanismo de impacto, con caja y cubierta, que contiene una placa corriente de Petri con agar, contra el cual chocan la mayoría de las partículas de polvo. Las flechas muestran el curso del aire a través de las perforaciones por toda la superficie del agar y su salida por debajo de la placa de Petri. La placa cribada con alas se ha presentado separadamente. (St. Germain y Summerbell, 1996).

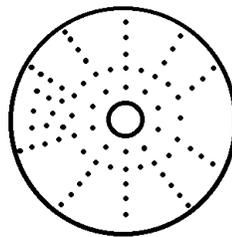


Figura 1. Mecanismo de criba.

Mecanismo burbujeador. Este es un mecanismo con cuentas de vidrio, compuesto por un frasco aspirador de 250 cm³ que contiene caldo, cuentas de vidrio de 5 mm de diámetro y un burbujeador de vidrio mantenido en su sitio por un tapón de goma perforado. Con el caldo se prepara un recuento en placa después de obtenida suficiente muestra de aire. (Frobisher, 1969)

2.2 Filtros

2.2.1 Filtros de carbón activado

El filtro de carbón funciona por el mismo principio que el filtro de arena, la diferencia radica en los elementos filtrantes y su finalidad. El carbón activado es un material natural que con millones de agujeros microscópicos que atrae, captura y rompe moléculas de contaminantes presentes. (Bansal y col.,1988).

Se diseña normalmente para remover cloro, sabores, olores y además químicos orgánicos. También es uno de los procesos finales del sistema de tratamiento de agua, su función es pulir la descarga final. Son fabricados en acero al carbón de alta resistencia y recubrimiento interno de polietileno para evitar la corrosión. (Bautista-Toledo, I. y col. 1997).

Características

- Remoción de cloro, olor y sabor
- Remoción de compuestos orgánicos

2.2.2 Filtros de Zeolita

La zeolita es un material con múltiples propiedades y funciones, la cual se utiliza como medio filtrante por su capacidad de intercambio iónico y por su función como tamiz molecular debido a que tiene un tamaño de poro uniforme. (Cornelius Klein y col. 1998).

Toda zeolita cuya composición química y mineralógica esté en el rango establecido por las normas de medios filtrantes para la arena sílice y la antracita puede utilizarse como medio filtrante, según el estudio denominado “Características físico-químicas de las zeolitas naturales como medio filtrante” realizado en la Facultad de Ing. Química, Instituto Superior Politécnico “José Antonio Echeverría” (ISPJAE), Cuba. (Ingeniero ambiental, 2002).

La zeolita se utiliza en diferentes tipos de filtros, pueden ser de aire para retener contaminantes del medio ambiente como compuestos orgánicos volátiles (COV), o en filtros de agua, donde se utilizan para remover olores y una diversidad de compuestos no deseados; todo depende del tipo de zeolita que se use y el tamaño de poro que esta tenga. (Llabre, G., 1989).

2.3 Materiales que se utilizan en filtros de refrigeradores y sus características.

2.3.1 Qué es el carbón activado.

Desde tiempos remotos los egipcios descubrieron que el carbón de madera podía utilizarse para purificar otros productos e incluso usarse con fines medicinales. (Jagtoyen, M. and Derbyshire, F. 1993).

En la actualidad, el carbón activado es utilizado para remover color, olor y sabor de una infinidad de productos, por lo cual lo podemos encontrar en aplicaciones tan sencillas como peceras o filtros de refrigerador, hasta complejos sistemas industriales como modernas plantas de tratamiento de aguas residuales o delicados sistemas de elaboración de antibióticos. (Dubinin, M.M. 1989).

2.3.2 Funciones del carbón activado.

Es conveniente analizar primero el proceso de adsorción, para así comprender mejor como es que el carbón activado realiza su función. La adsorción es un proceso por el cual los átomos en la superficie de un sólido, atraen y retienen moléculas de otros compuestos. Estas fuerzas de atracción son conocidas como "fuerzas de Van Der Waals". Por lo tanto al ser un fenómeno que ocurre en la superficie mientras mayor área superficial disponible tenga un sólido, mejor adsorbente podrá ser. (Jagtoyen, M. and Derbyshire, F. 1993).

El proceso se inicia con la etapa de carbonización, de modo que se logre la deshidratación y la desvolatilización de forma controlada, obteniéndose un carbonizado con elevado por ciento en carbono fijo y una estructura porosa inicial. (Anmadpour, A. and Do, D.D. 1996).

Durante la carbonización los elementos no carbonosos, como el hidrógeno y oxígeno, presentes en la materia prima, son eliminados en parte por la pirólisis del material y los átomos de carbono se organizan en estructuras microcristalinas. (Anmadpour, A. and Do, D.D. 1996).

Entre estos microcristales hay espacios libres, debido a que su ordenamiento es irregular. Estos espacios son bloqueados por carbono amorfo, alquitranes y otros residuos de la descomposición pirolítica del material celulósico. (Anmadpour, A. and Do, D.D. 1996).

El carbón activado es un producto que posee una estructura cristalina reticular similar a la del grafito; es extremadamente poroso y puede llegar a desarrollar áreas superficiales del orden de 1,500 metros cuadrados ó más, por gramo de carbón. (Anmadpour, A. and Do, D.D. 1996).

Todos los átomos de carbón en la superficie de un cristal son capaces de atraer moléculas de compuestos que causan color, olor o sabor indeseables; la diferencia con un carbón activado consiste en la cantidad de átomos en la superficie disponibles para realizar la adsorción. En otras palabras, la activación de cualquier carbón consiste en " multiplicar" el área superficial creando una estructura porosa. Es importante mencionar que el área superficial del carbón activado es interna. Para darnos una idea más clara de la magnitud de la misma, imaginemos un gramo de carbón en trozo el cual moleremos muy fino para incrementar su superficie, como resultado obtendremos un área aproximada de 3 a 4 metros cuadrados, en cambio, al activar el carbón logramos multiplicar de 200 a 300 veces este valor. Por todo ello, cuando se desea remover una impureza orgánica que causa color, olor o sabor indeseable, normalmente la adsorción con carbón activado suele ser la técnica más económica y sencilla. (Clarimex, 2001).

2.3.3 La zeolita

Las zeolitas son aluminosilicatos hidratados altamente cristalinos que al deshidratarse desarrollan, una estructura porosa con diámetros de poro mínimos (3 a 10 Å), se dice que en su estructura forma cavidades ocupadas por iones grandes y moléculas de agua con gran libertad de movimiento que permiten el intercambio iónico y la deshidratación reversible, observar figura 2. (Chen-Guo-Tian and R. I. L. Guuthrie. 1995).

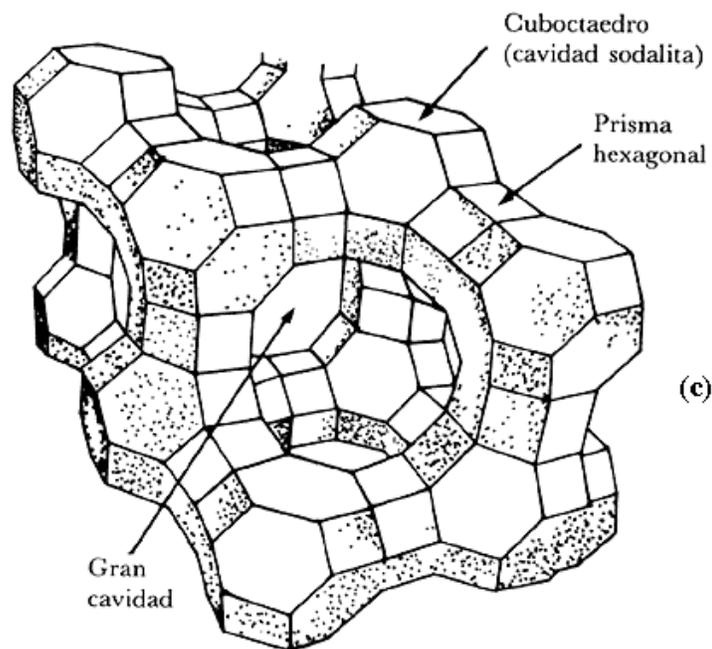


Figura 2. Estructura de una zeolita faujasita.

Las zeolitas están constituidas por aluminio (Al), silicio (Si), sodio (Na), hidrógeno (H) y oxígeno (O). La proporción de la cantidad de átomos de aluminio (x) respecto a la cantidad de átomos de silicio (y) es: $x/y = 0.408$. (D. Barnes and F. Wilson 1984).

Lo cual le permite proponer la siguiente fórmula química*, determinada experimentalmente: $\text{Na}_{56}\text{Al}_{56}\text{Si}_{136}\text{O}_{384} \cdot w\text{H}_2\text{O}$. (D. Barnes and F. Wilson 1984).

En donde w_{H_2O} sólo significa un número variable de moléculas de agua (H_2O). (D. Barnes and F. Wilson 1984).

Se localiza en una variedad de regiones del mundo donde la actividad volcánica prehistórica ocurrió cerca del agua, o donde el agua ha estado presente por milenios desde las erupciones. El origen del nombre zeolita se deriva de dos palabras griegas, zeo: que ebulle, y lithos: piedra. Por lo tanto, zeolita significa “piedra hirviente”. (Arthur Holmes 1980).

Las zeolitas naturales tienen ventanas de tamaño limitado (“tamaño de poro”) y todas son hidrofílicas (tienen afinidad por el agua). Algunas zeolitas sintéticas se parecen al carbón absorbente, dado que ambas pueden considerarse hidrofóbicas (tienen afinidad por los compuestos orgánicos, con poca o ninguna afinidad por el agua), y pueden adsorber vapores orgánicos con moléculas de tamaño más pequeño que el de sus poros. Tanto el carbón como la zeolita pueden adsorber agua y moléculas orgánicas; sin embargo, aquello por lo que tenga mayor afinidad, desplazará las demás moléculas. La zeolita tiene un “tamaño de poro” uniforme, lo cual hace que se le denomine como un “tamiz molecular”, mientras parece que los carbones tienen poros que se comunican con poros más pequeños que a su vez se comunican con poros todavía más pequeños. (Arthur Holmes 1980).

El carbón absorbente, el cual es en realidad un adsorbente, también tiene afinidad por el agua en algunos sitios, lo que disminuye su capacidad para adsorber las moléculas orgánicas de las corrientes que contienen moléculas de agua. Esto puede ser cierto o no en el caso de la zeolita, dependiendo del tipo de zeolita que se seleccione. Generalmente, entre mayor sea la razón de silicio y aluminio, más hidrofóbica es la zeolita. Las zeolitas hidrofóbicas tienen que ser sintetizadas, ya que no se encuentran en la naturaleza. (Epa.gov, 1999)

2.3.4 Uso de las zeolitas

- ❖ La zeolita es capaz del intercambio selectivo de iones. (epa.gov, 1999)
- ❖ Tienen la propiedad de intercambiar cationes, capacidad que ha permitido usarla en detergentes de uso común, estas eliminan rápidamente los iones de Ca y Mg. (Ilce.edu, 1997)
- ❖ La zeolita puede adsorber moléculas en su gran área interna, siempre que puedan pasar por las ventanas. La zeolita y el carbón son iguales en este aspecto, y se diferencian solamente en el área de adsorción a la que puede tener acceso una molécula dada que pase por sus “poros”.
- ❖ La zeolita puede ser un catalizador ácido sólido. Puede funcionar como un ácido fuerte (aunque se mantiene como un sólido) cuando la hidratación ha sustituido un hidrógeno, por un electrón de valencia adicional, o un intercambio isoelectrónico con el aluminio.
- ❖ Se puede usar la zeolita como un tamiz molecular debido a que tiene un tamaño de ventana (o poro) uniforme. (Epa.gov, 1999)
- ❖ Se usan como medios filtrantes.
- ❖ Tienen propiedades catalíticas, y se utilizan en la transformación del alcohol en gasolina, o bien la obtención de petroquímicos útiles a partir del petróleo.
- ❖ La zeolita es metaestable; quiere decir, es estable siempre que se mantenga a una temperatura y a un pH adecuados. Dentro de este rango, no se ve afectada por oscilaciones grandes de temperatura, presión, o radiación ionizante. (Epa.gov, 1999)
- ❖ Las zeolitas en el sistema digestivo de animales absorben una parte de los nutrientes ingeridos en sus cavidades, reteniéndolos y dosificándolos poco a poco.
- ❖ Permiten controlar el olor y contenido de humedad de los desechos animales.(Ilce.edu, 1997)
- ❖ Actualmente se utiliza la zeolita hidrofóbica para concentrar los compuestos orgánicos volátiles (COV) antes de destruirlos, es decir son muy eficientes para adsorber y desorber los COV.

- ❖ En el tratamiento de desechos radiactivos, la zeolita se utiliza para remover el cesio y el estroncio radiactivos de las aguas residuales.
- ❖ La zeolita también se utiliza en los refrigeradores para resecar el refrigerante. Esto previene la formación de cristales de hielo que pudieran obstruir el flujo y las válvulas.
- ❖ La zeolita se utiliza para secar aire comprimido. Funciona como desecante para adsorber humedad. Puede retener hasta una cuarta parte de su peso en agua sin un incremento significativo en la presión de vapor.
- ❖ La zeolita se utiliza para separar el nitrógeno del oxígeno del aire. Esta técnica se usa para generar oxígeno para las tripulaciones de aviones, procesos industriales y en los acuarios. (Epa.gov, 1999)

2.4 *Escherichia Coli.*

En estos estudios se utilizara *E. coli*. Este es un microorganismo nativo del intestino humano y de todos los animales de sangre caliente. Es una bacteria no patógena que es ampliamente utilizada para evaluar una diversidad de condiciones fisiológicas y bioquímicas de los microorganismos. Además, es un microorganismo que se utiliza para evaluar la eficiencia de procesos de desinfección y una diversidad de tratamientos encaminados a eliminar, reducir o evitar la presencia de microorganismos patógenos en los alimentos. (J.M. J.A.Y. 1973).

E. coli es un bacilo grueso, corto, de 0.4 a 0.7 micras de grosor y 1 a 4 micras de longitud. Con frecuencia se encuentran en los exudados y cultivos jóvenes formas cocoides y cadenas cortas. (J.M. J.A.Y. 1973)

La motilidad varía grandemente en los cultivos; algunas cepas presentan movilidad activa, otras movilidad lenta y algunas son inmóviles. No forman esporas, pero una pequeña proporción de las cepas presentan cápsulas. Estos bacilos son gramnegativos. (J.M. J.A.Y. 1973)

2.4.1 Caracteres de cultivo

Los colibacilos son aerobios, pero también son anaerobios facultativos. Se desarrollan rápidamente, en veinticuatro horas, en todos los medios usuales a temperaturas que varían entre 20 y 40 °C. Su poder de síntesis es tal que los bacilos crecen en un medio compuesto de sales inorgánicas, una sal amónica y glucosa. (Zinsser, 1971).

En placas de agar, las colonias superficiales aparecen de doce a veinticuatro horas, en cuarenta y ocho horas alcanzan un tamaño de 2 a 3 mm. Hay variación considerable en el aspecto individual de las colonias, la colonia típica es poco elevada, convexa, lisa e incolora, aunque algo opaca, con borde entero. Algunas colonias son menores y la forma de cápsula es más acentuada, mientras que otras producen una colonia típica en forma de hoja vid. (Epstein W 1996).

En caldo se produce enturbiamiento homogéneo de doce a veinticuatro horas, y de veinticuatro a cuarenta y ocho horas tiene lugar la formación de una ligera película, y en el fondo del tubo se acumula un depósito viscoso.

Fermentan la glucosa, lactosa, maltosa y otros azúcares, con producción de ácido y gas. Alrededor de 50 % de las cepas fermentan la sacarosa; a éstas se les ha denominado *E. coli communior*. (Epstein W. 1996)

Mientras que el otro 50 % que no fermentan este azúcar se les llama *E. coli communis*. La incapacidad de hacer fermentar la sacarosa no tiene significación biológica. El ácido formado por la fermentación de los carbohidratos es principalmente ácido láctico con pequeñas cantidades de ácido fórmico y acético. Se producen bióxido de carbono e hidrógeno en cantidades aproximadamente iguales. (Winkelman J. 1986).

2.4.2. Resistencia.

Los bacilos coli sobreviven durante semanas, en cultivos conservados a la temperatura de habitación y durante meses en el suelo y en el agua. Su resistencia a los antisépticos usuales es igual o mayor que la de los micrococos. (Winkelman J. 1986).

La mayor parte de las cepas mueren en quince a veinte minutos a la temperatura de 60 °C, pero algunas sobreviven al proceso de pasteurización y pueden alterar el color y el sabor de la leche, para la purificación del agua, el cloro, en concentraciones de 0.5 a 1 parte por un millón, es bactericida eficaz para *A. aerogenes*, *E. coli* y varias especies de *Salmonella* y *Shigella*. (Zinsser, 1971).

El verde brillante inhibe selectivamente el desarrollo de especies de *E. coli*, *Aerobacter* y *Shigella*, pero es menos eficaz contra organismos *Salmonella*. El desoxicolato en presencia de citrato sódico inhibe el desarrollo de *E. coli* y *Aerobacter*. La cafeína, el cloruro de litio, telurito potásico, sales de selenio y tetrionato tienen acción inhibitoria diferencial sobre el desarrollo de miembros del grupo entérico. (Winkelman J. 1986).

Estas sustancias inhibitorias se añaden a los medios selectivos y diferenciales para suprimir el desarrollo de *E. coli* y organismos grampositivos y favorecen el de *Shigella* y *Salmonella*. (Zinsser, 1971).

2.5. Control de los microorganismos que alteran los alimentos, en refrigeración.

Las bajas temperaturas conservan los alimentos retardando o evitando el crecimiento de los organismos alterantes, y en el caso de los alimentos frescos (recientes), inhibiendo la acción de las enzimas autolíticas naturales.

(Ingraham y Stokes) llamaron la atención sobre el hecho de que las bacterias que se desarrollan a bajas temperaturas, denominadas antes psicrófilas, generalmente crecen mejor a temperaturas comprendidas entre 20 y 30 °C e incluso, en algunos casos, a temperaturas mayores. Mossel propuso que los microorganismos que crecían por debajo de los 5 °C, pero con temperaturas óptimas superiores, se clasifican en “psicrotróficos o psicrótofos”. (Ingraham y col. 1977).

Hemos adoptado esta denominación para referirnos a los microorganismos que crecen a temperaturas de refrigeración, capaces, por lo tanto de alterar los alimentos refrigerados. Las principales bacterias incluidas en este grupo pertenecen al género *Pseudomonas*, pero también existen otras especies pertenecientes a los géneros *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* y *Alcaligenes*, así como levaduras del tipo *Torulopsis* y especies fúngicas de los géneros *Penicillium*, *Cladosporium*, *Mucor* y *Thamnidium*. (Lee JH. 1988)

Los gérmenes psicrotróficos presentan frecuentemente un crecimiento relativamente rápido a 0 °C, y aunque a esta temperatura su ritmo de crecimiento es menor que a temperaturas superiores, el número total de células puede ser mayor. . (Lee JH. 1988)

El límite inferior a que tiene lugar el crecimiento de los microorganismos en los alimentos no está determinado sólo por la temperatura, siendo un factor muy importante la cantidad de agua congelada del substrato. . (Lee JH. 1988)

Cuando hay formación de hielo, se retarda el crecimiento de las bacterias, mientras que los mohos y levaduras predominan, porque son capaces de resistir mejor la mayor presión osmótica que resulta de la concentración de los solutos que sigue a la separación del agua como hielo. Por

esta misma razón el crecimiento de las bacterias en medios superenfriados tiene lugar a menor temperatura que el crecimiento en medios congelados. Jensen establece que el crecimiento bacteriano en medios superenfriados puede ocurrir a $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$, mientras que la temperatura límite en los medios congelados está en la región de $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ingraham ha señalado que los organismos capaces de resistir concentraciones altas de soluto pueden ser excepcionalmente resistentes a las bajas temperaturas. Según Haines, la temperatura límite de crecimiento del grupo psicrófilo, incluidos bacterias, levaduras y mohos, cae entre los -5 y $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ y esta probablemente cerca de los $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$. Lea encontró que el almacenamiento a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ no impedía el desarrollo de las levaduras y mohos en la carne congelada, en la que aparecían colonias después de 7 semanas. Berry y Magno señalaron el crecimiento de especies de *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Monilia* y *Penicillium* a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y especies de *Cladosporium* y *Sporotrichum* a $-6.7\text{ }^{\circ}\text{C}$. (Ingraham y col. 1977).

Datos procedentes de múltiples investigadores indican que la temperatura mínima de crecimiento bacteriano, en la mayoría de los alimentos, es de aproximadamente $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, si bien las endoenzimas siguen activos, incluso a temperaturas inferiores. (Ingraham y col. 1977).

La alteración de los alimentos mantenidos en frigoríficos recae predominantemente en su superficie. Por lo tanto, puede controlarse, en gran parte, el grado de alteración regulando el flujo de aire y la humedad relativa de la cámara, con lo que se consigue cierta desecación superficial. (McCleskey y Christopher. 2008).

Generalmente se necesita llegar a un compromiso entre pérdidas ocasionadas por el deterioro alimenticio y pérdidas de peso a causa de la evaporación. (McCleskey y Christopher. 2008).

El crecimiento de la mayoría de las bacterias causantes de toxi-infecciones alimenticias se evita a temperaturas inferiores a 4.4 °C. Sin embargo, (Schmidt *et. Al*). Demostraron que alguna esporas de *Clostridium botulinum* tipo E sometidas a choque térmico, se desarrollaban entre los 31 y 45 días de incubación a 3.3 °C. Aunque se utilizaron inóculos grandes (4 a 12 millones de esporas por tubo), los resultados, sin embargo, indican que una temperatura de 3.3 °C no es necesariamente suficiente segura para prolongar la vida de almacén de aquellos alimentos en los que puede desarrollarse el *Clostridium. botulinum*; las comprendidas entre 2.2 y 1.1 °C sí lo fueron. (McCleskey y Christopher. 2008).

La congelación produce, invariablemente, una disminución inicial rápida del número de organismos viables. Dependiendo de la temperatura, naturaleza del substrato, tipo de organismo y otros factores. (McCleskey y Christopher. 2008).

Los supervivientes pueden sufrir una reducción lenta ulterior o, en el caso de los organismos psicrófilos, a la disminución inicial puede seguir un período de latencia y desarrollo de los supervivientes. (McCleskey y Christopher. 2008).

Los pH extremos aumentan la susceptibilidad de los microorganismos al frío, mientras que la presencia de azúcares, glicerina y coloides los protegen. Estas observaciones no son válidas para las esporas bacterianas, que, según (Haines,) son prácticamente inafectadas por el enfriamiento o almacenamiento en estado de congelación.

No está de acuerdo acerca de la causa íntima de la muerte de las bacterias por el frío; las explicaciones sugeridas suponen la existencia de traumatismos mecánicos por los cristales de hielo extra o intracelulares y la alteración de las proteínas bacterianas. (Straka y Stokes 1960).

(Straka y Stokes) han demostrado la existencia de alteraciones metabólicas que se manifiestan por un aumento de las necesidades nutritivas bacterianas. Varios investigadores han señalado que la muerte de las bacterias no aumenta al descender las temperaturas, una vez que el substrato está congelado. (Straka y Stokes 1960).

En general, los microorganismos son muy resistentes a las bajas temperaturas, incluso los tipos patógenos sobreviven largos períodos de tiempo. *Escherichia coli* no sobrevive tan bien como los enterococos. (Straka y Stokes 1960).

(McCleskey y Christofer,) investigando las bacterias patógenas en fresas sometidas a “congelación brusca” (-18 °C), encontraron que *Salmonella* sobrevivía seis meses y *Staphylococcus aureus* cinco meses. (McCleskey y Christopher. 2008).

(Raj y Liston) estudiaron la supervivencia de diversas bacterias patógenas en caldo de infusión de cerebro y corazón, que había sido congelado a -34.4 °C y almacenado a -17.8 °C. Transcurridos 393 días, *Salmonella typhimurium* había sido virtualmente eliminada, *E. coli* y *Staphylococcus aureus* reducidos en gran parte, *Streptococcus pyogenes* ligeramente disminuido. *Streptococcus bovis* y *Clostridium perfringens* muy poco afectados. En pescado homogeneizado esterilizado solamente se redujeron significativamente *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*, (Herson y Hulland, 1974).

2.6 Choque térmico por enfriamiento.

Las bacterias se conservan en general en el refrigerador, si bien el enfriamiento súbito de las células de algunas especies que se hallan en crecimiento (*E. coli*, *Pseudomonas*), causa una muerte sustancial (>90%). (Straka y Stokes 1960).

Este fenómeno, curioso e inexplicado, no se observa con el enfriamiento gradual o con pases progresivos a distintas temperaturas, es posible que esté en relación con la variable composición de los lípidos de membrana que resulta de los cambios térmicos y de fase de crecimiento, (Davis, 1978).

III. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficiencia del filtro a base de zeolita y carbón activado para retener microorganismos dentro de refrigeradores domésticos.

IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Evaluar la capacidad de retención máxima de microorganismos de la Zeolita y Carbón Activado en suspensiones acuosas
2. Establecer condiciones para suspender controladamente microorganismos dentro de los refrigeradores
3. Evaluar la capacidad de retención máxima de microorganismos de los filtros dentro de los refrigeradores

V. METODOLOGÍA

Existe una diversidad de microorganismos (bacterias, hongos, levaduras) que pueden alterar un alimento, aun cuando estos son conservados a temperaturas bajas de acuerdo a Herson y Hulland (1974) referidos en los antecedentes. Muchos de estos microorganismos no causan problemas de salud al consumidor o bien pueden causar diferentes enfermedades al mismo y por ello son organismos patógenos. Para llevar a cabo la evaluación de la capacidad de retención de microorganismos por un material filtrante no es necesario utilizar microorganismos patógenos (debido a los riesgos que implica su manipulación); en lugar se debe seleccionar uno cuyo comportamiento sea similar y con ello inferir lo que pudiera pasar con otro tipo de microorganismos deterioradores o patógenos.

Se utilizó para los estudios una cepa de *Escherichia coli* no patógena, aislada en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos.

Este microorganismo es nativo del intestino humano y de todos los animales de sangre caliente. Es una bacteria no patógena que es ampliamente utilizada para evaluar una diversidad de condiciones fisiológicas y bioquímicas de los microorganismos. Además, es un microorganismo que se utiliza para evaluar la eficiencia de procesos de desinfección en una diversidad de tratamientos encaminados a eliminar, reducir o evitar la presencia de microorganismos patógenos en los alimentos.

5.1 Materiales

5.1.1 Equipó

- ❖ Autoclave eléctrica de mesa
- ❖ Campana de flujo laminar
- ❖ Cuenta colonias
- ❖ Incubadora a 35 °C
- ❖ Baño maría, precisión
- ❖ Balanza analítica
- ❖ Potenciómetro
- ❖ Vortex, Fisher Scientific Ind.
- ❖ Material común de laboratorio de microbiología
- ❖ Pipeta automática
- ❖ Refrigeradores

5.1.2 Material común

- ❖ Cajas Petri desechables
- ❖ Tubos de ensayo con tapón de rosca de 15 x 150
- ❖ Frascos de dilución
- ❖ Puntas para pipeta automática
- ❖ Columna de vidrio cromatografica de 10 cm de largo por 2 cm de diámetro
- ❖ Soporte universal
- ❖ Pinzas de tres dedos
- ❖ Probetas de 50 ml
- ❖ Asas de platino
- ❖ Mechero

5.2 Soluciones.

- ❖ Solución salina isotónica (SSI) al 0.9 %
- ❖ Alcohol etílico al 70%
- ❖ Solución Yodofora

5.3 Sustancias.

- ❖ Cloruro de sodio
- ❖ Agar Soya Trypticasa (AST)
- ❖ Agar Bilis Rojo Violeta (ABRV)
- ❖ Caldo soya Trypticasa (CST)

5.4 Material filtrante.

- ❖ Zeolita con permanganato
- ❖ Zeolita sin permanganato
- ❖ Carbón Activado

5.5 Tratamiento del microorganismo.

La cepa se preservó durante todo el estudio en agar soya tripticasa (AST) inclinado mantenido en refrigeración. Para cada estudio, se tomó una asada de la cepa y se transfirió a tubos con 10 ml de caldo soya tripticasa (CST). Los tubos inoculados se incubaron a 35 °C de 18 a 24 h (el medio de cultivo se torno turbio debido al crecimiento de microorganismos). Después del tiempo de incubación los tubos se centrifugaron a 3000 RPM durante 15 minutos.

El sobrenadante de cada tubo se desecho y la pastilla se resuspendió en 1 ml de solución salina isotónica (SSI; cloruro de sodio al 0.1 %), todo este procedimiento es conocido como “lavado de cultivo”. La suspensión del microorganismo se lavó por este procedimiento dos veces.

En el último lavado, después de eliminar el sobrenadante se agregaron 1 ml ó 10 ml de solución salina isotónica (SSI) según se requiera para cada estudio y así formar la solución stock de microorganismos. La solución stock de microorganismos se conservo en refrigeración.

El recuento del número de células se efectuó a través de la técnica de vaciado en placa. Para ello se realizaron diferentes diluciones de la muestra dispuesta a realizar el recuento, para esto de una “x” muestra se tomó 1 ml y se transfirió a un tubo de ensaye con 9 ml de SSI se agitó en vortex por 10 segundos; de este tubo se tomó 1 ml y se transfirió a un segundo tubo con 9 ml de SSI, se agitó nuevamente y posteriormente se transfirió de este 1 ml a un tercero, y así sucesivamente hasta completar las diluciones requeridas.

Una vez hechas las diluciones, se tomó un mililitro, se depositó en una caja petri y se adicionó aproximadamente 15 ml de AST fundido, el cual debe tener una temperatura de 44 - 45 °C. El inculo se mezcló con el medio de cultivo agitando la caja 8 veces en dirección vertical, 8 en horizontal, 8 en el sentido de las manecillas de reloj y 8 en contra de las manecillas del reloj. Se dejó solidificar el medio de cultivo y las cajas se incubaron a 35 °C de 18 – 24 horas. Después de la incubación se contaron las colonias del microorganismo en cada una de las cajas para estimar el número de microorganismos presentes en la muestra.

El medio de cultivo que se utilizó para preparar la solución stock de *Escherichia coli* fue Caldo soya tripticaseina (CST) (Bioxon Ref. 211670); para el recuento se utilizó Agar soya tripticaseina (AST) (Bioxon Ref. 210800). Estos medios se prepararon de acuerdo al procedimiento descrito por el fabricante. Treinta gramos en un litro de agua para CST y cuarenta gramos en un litro de agua para AST, después de disuelto el material se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos a 15 libras de presión.

5.6 Evaluación de la capacidad de retención máxima de microorganismos en suspensión acuosa por el material filtrante (zeolita y carbón activado).

Debido a la escasa información metodológica para cuantificar la retención de microorganismos suspendidos en el aire sobre una superficie sólida y que el objetivo inicial es cuantificar el número máximo que puede retener el material del filtro, antes de iniciar los estudios con microorganismos suspendidos en el aire se trabajó primero con suspensiones acuosas del microorganismo. Esto para explorar de manera general y rápida si los materiales filtrantes pueden retener o no microorganismos. Para ello se hizo pasar un medio acuoso con un número definido de células a través de los materiales filtrantes contenidos en una columna de vidrio cromatográfica.

La capacidad de saturación máxima de los filtros para retener los microorganismos, es definida como el número de microorganismos que saturan los sitios de adsorción de un gramo de material filtrante, se estimó haciendo pasar en repetidas ocasiones volúmenes preestablecidos del cultivo stock del microorganismo (con el número de células conocido) a través de una cantidad conocida del material y contando, en cada ocasión, el número de células que salen a través del filtro, denominada Inoculación sucesiva de la columna, como a continuación se describe:

5.6.1 Inoculación sucesiva de la columna con carbón activado.

Para conocer la capacidad de retención del carbón activado se propuso hacer inoculaciones sucesivas a dicho material como sigue:

1. La solución stock de microorganismos se repartió en diferentes tubos de ensaye con 10 ml cada tubo.
2. El contenido de cada tubo se vertió en la columna, que contenía 10 g del material del filtro previamente esterilizado (15 minutos a 121 °C).
3. El líquido de salida se recolectó en una probeta estéril.
4. Enseguida la columna se lavó vertiendo dentro de ella 20 ml de SSI; el líquido de salida se recolectó en la misma probeta del paso anterior.
5. Se midió el volumen de todo el líquido que atravesó la columna y se hizo el recuento de los microorganismos presentes en este líquido por la técnica de vaciado en placa.
6. Se repitió el procedimiento del punto 2 al 5.
7. Se incubaron todas las cajas del recuento a 35 °C por 18 – 24 hrs.
8. Se realizó el conteo del número de colonias en cada una de ellas utilizando un cuenta colonias (Figura 3 y 4).

Este procedimiento de inoculación sucesiva se realizó primero con diez inoculaciones, seguido de experimentos con veinte inoculaciones y finalizando con experimentos de tres repeticiones simultaneas con veinte inoculaciones cada una.

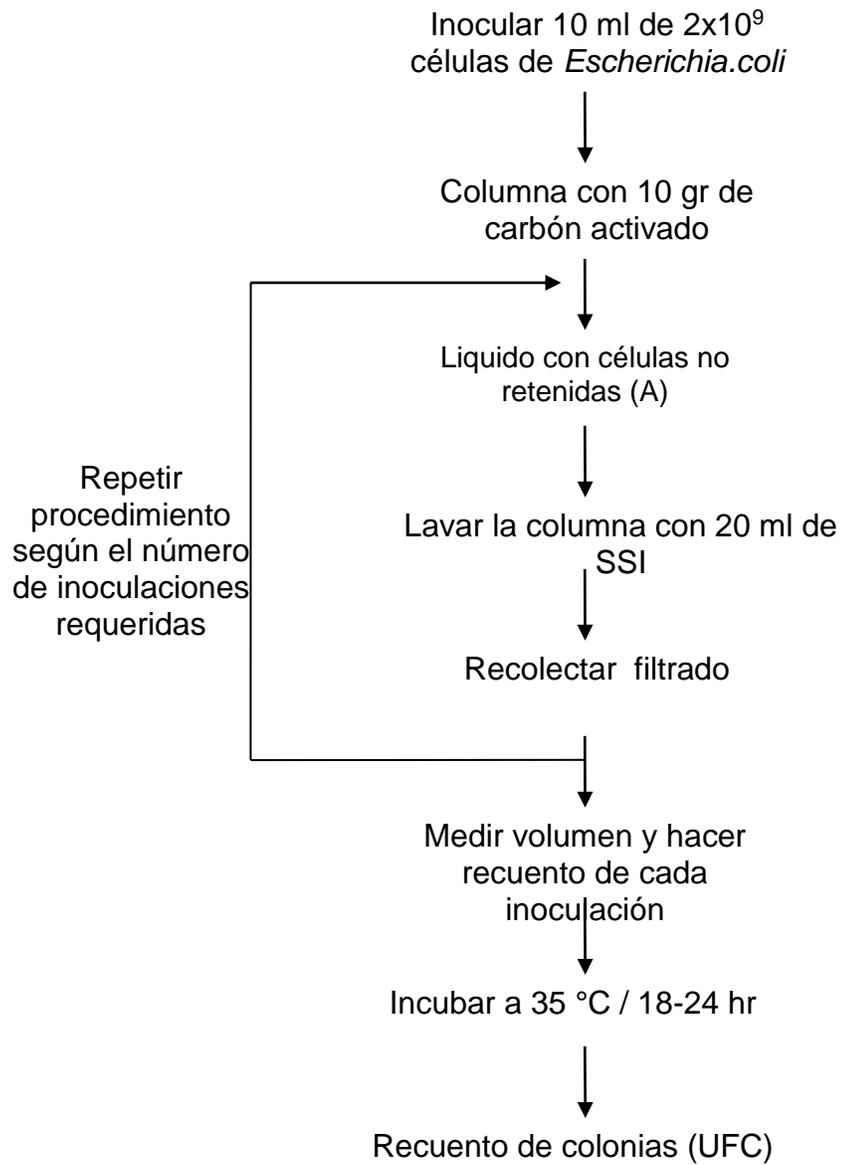


Figura 3. Inoculación sucesiva de la columna de carbón activado.

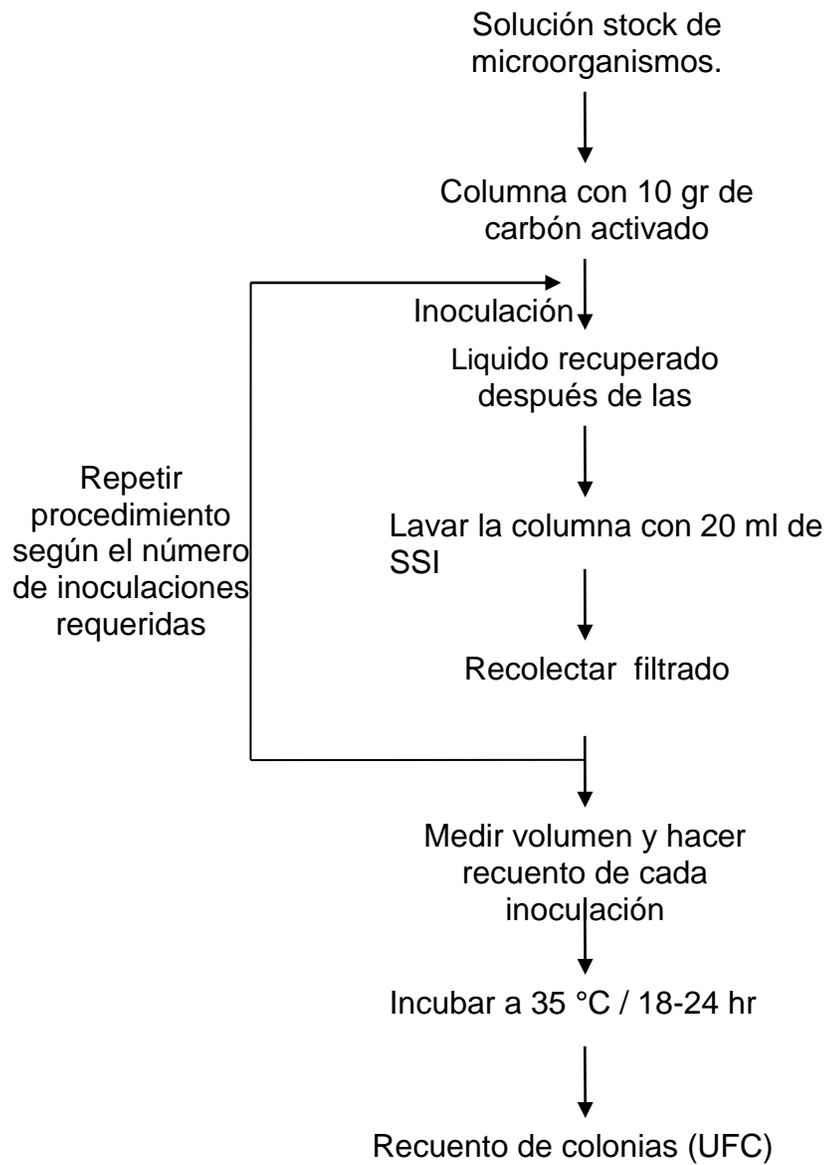


Figura 4. Diagrama de flujo de inoculación sucesiva de la columna.

5.6.2 Acción germicida del permanganato de potasio que contiene la zeolita.

1. Se puso 5 gr. de zeolita estéril en la columna de vidrio.
2. Se paso 30 ml de SSI por la columna.
3. Se recolectó el líquido de salida en una probeta estéril.
4. Se tomo 1 ml del filtrado y se puso en un tubo con 9 ml de SSI.
5. En este tubo se inoculo 1 ml de microorganismos con una concentración de 1×10^6 UFC/ml.
6. El microorganismo se dejo en contacto con el líquido de lavado por una hora.
7. A los tiempos: 0', 10', 30' y 1 hr. se efectuó el recuento de los microorganismos sobrevivientes, esto por la técnica de vaciado en placa.
8. Se incubaron todas las cajas del recuento a 35 °C por 18 – 24 hr.
9. Se hizo el recuento del número de colonias (UFC) en cada una de ellas utilizando un cuenta colonias (figura 3).

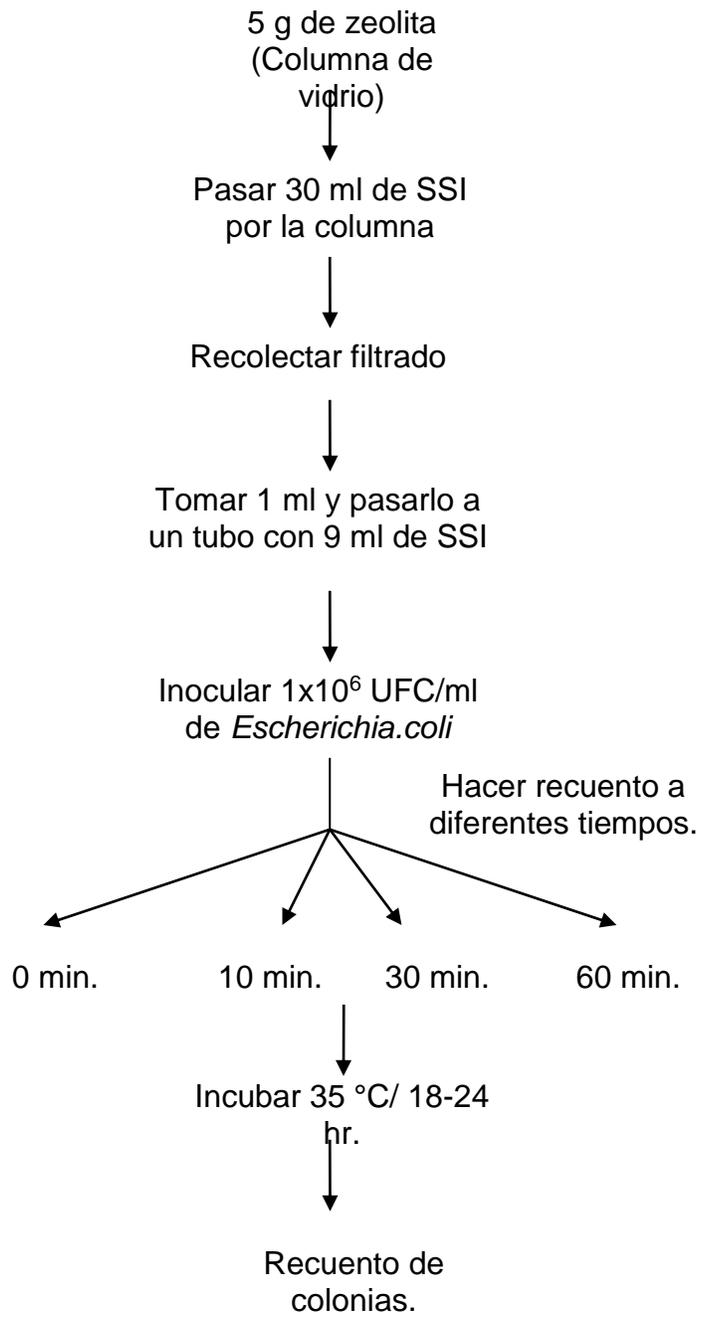


Figura 5. Acción germicida del permanganato de potasio.

5.6.3 Inoculación sucesiva de la columna con zeolita sin permanganato.

Para conocer la capacidad de retención máxima de la zeolita sin permanganato se realizaron inoculaciones sucesivas a dicho material como sigue:

1. La solución stock de microorganismos se repartió en diferentes tubos de ensaye con 10 ml cada tubo.
2. El contenido de cada tubo se vertió en la columna, que contenía 10 g de zeolita sin permanganato previamente esterilizada (15 min. a 121 °C).
3. El líquido de salida se recolectó en una probeta estéril.
4. Enseguida la columna se lavó vertiendo dentro de ella 20 ml de SSI; el líquido de salida se recolectó en la misma probeta del paso anterior.
5. Se midió el volumen de todo el líquido que atravesó la columna y se hizo el recuento de los microorganismos presentes en este líquido por la técnica de vaciado en placa.
6. Se repitió el procedimiento del punto 2 al 5.
7. Se incubaron todas las cajas del recuento a 35 °C por 18 – 24 hrs.
8. Se realizó el conteo del número de colonias en cada una de ellas utilizando un cuenta colonias (Figura 4).

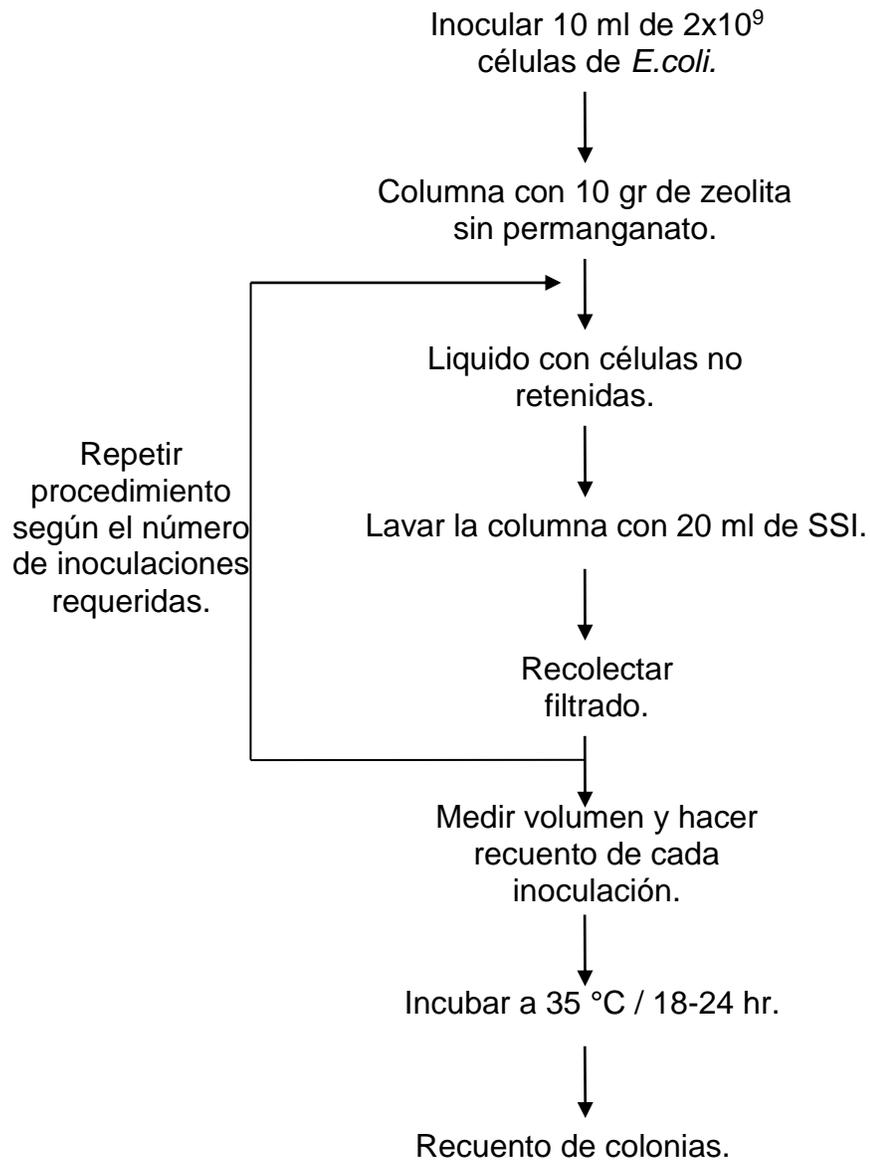


Figura 6. Retención máxima de microorganismos por zeolita sin permanganato.

5.7 Evaluación de la desorción de microorganismos del material filtrante.

5.7.1 Desorción a alta concentración de microorganismos.

Tratamiento de cultivo microbiano.

1. Se Incubó *E. coli* en caldo soya tripticasa (tubos con 10 ml) a 35 °C por 24 hr.
2. Se lavaron las cepas dos veces, centrifugándolas a 3000 rpm por 15 minutos
3. Se obtuvo la pastilla formada de microorganismos.
4. Se puso 10 ml de Solución Salina Isotónica (SSI) a la pastilla de microorganismos recuperada.
5. Se colocó el contenido de los tubos en un matraz estéril con el doble de SSI del volumen de los tubos de microorganismos; esto para tener la solución stock.
6. Se hizo recuento de la solución stock para conocer el número inicial de microorganismos.

Lavados sucesivos para efectuar la desorción.

7. Se tomó un tubo con 10 ml de la solución stock y se vació su contenido por la columna con 10 g de carbón de coco estéril, se recolectó el filtrado en una probeta estéril.
8. Se lavó la columna con 20 ml de SSI y se siguió recolectando el filtrado.
9. Se midió el volumen de lo que se recuperó y se hizo recuento de los microorganismos filtrados (Diluciones 2, 4 y 6).
10. Se repitió desde el paso 8 usando una nueva probeta estéril para cada lavado.
11. Se incubó las cajas del recuento a 35 °C por 18-24 hr. (figura 5).

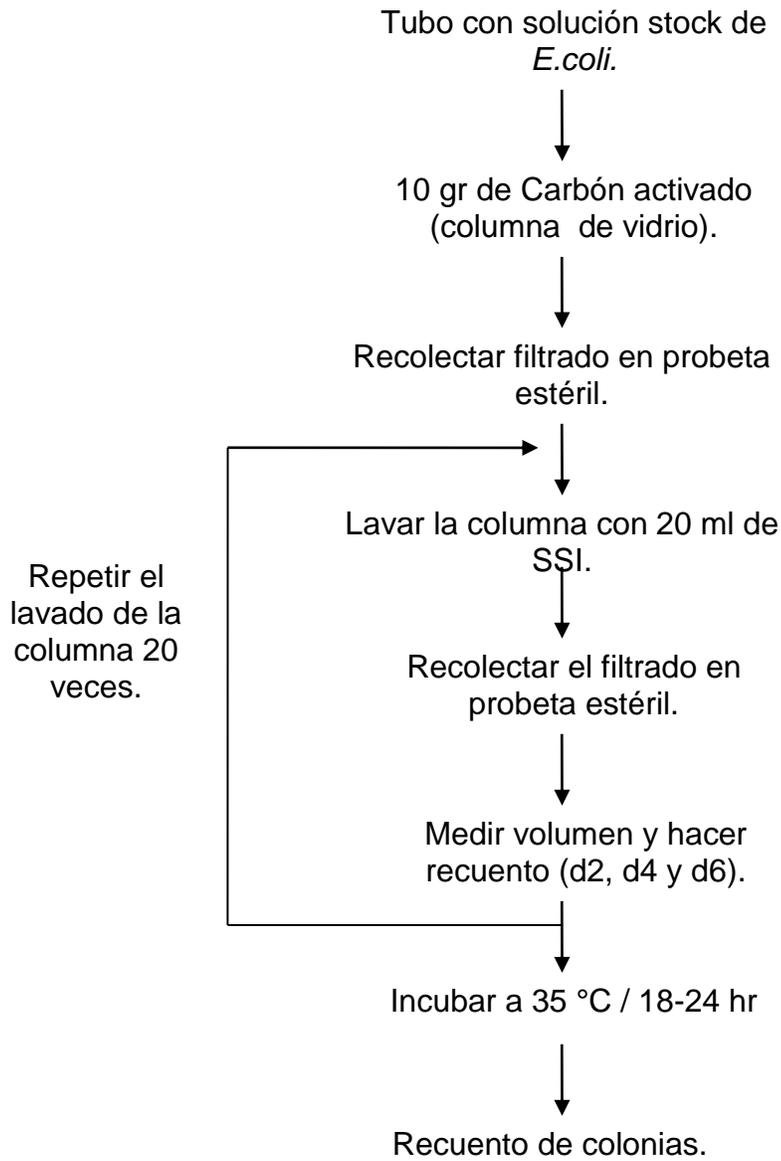


Figura 7. Evaluar la desorción de microorganismos.

5.7.2 Desorción a baja concentración de microorganismos.

Tratamiento de cultivo microbiano.

1. Se inoculo *E. coli* en caldo soya tripticasa a 35 °C por 24 hr.
2. Se lavaron las cepas dos veces, centrifugándolas a 3000 rpm por 15 minutos.
3. Se obtuvo la pastilla formada de microorganismos y se le puso 10 ml de solución salina isotónica.
4. Se realizaron cinco diluciones a dicho tubo para tener una concentración aproximada de 1×10^4 microorganismos y así se formó la solución stock.
5. Se hizo un recuento de la solución stock para conocer el número inicial de microorganismos.

Lavados sucesivos para efectuar la desorción.

6. Se tomó un tubo con 10 ml de la solución stock y se vació su contenido por la columna con 10 g de carbón de coco estéril, se recolectó el filtrado en una probeta estéril.
7. Se lavó la columna con 20 ml de SSI y se siguió recolectando el filtrado.
8. Se midió el volumen de lo que se recuperó y se hizo recuento de los microorganismos filtrados.
9. Se repitió desde el paso 7 usando una nueva probeta estéril para cada lavado.
10. Se incubaron las cajas del recuento a 35 °C por 18-24 hr.

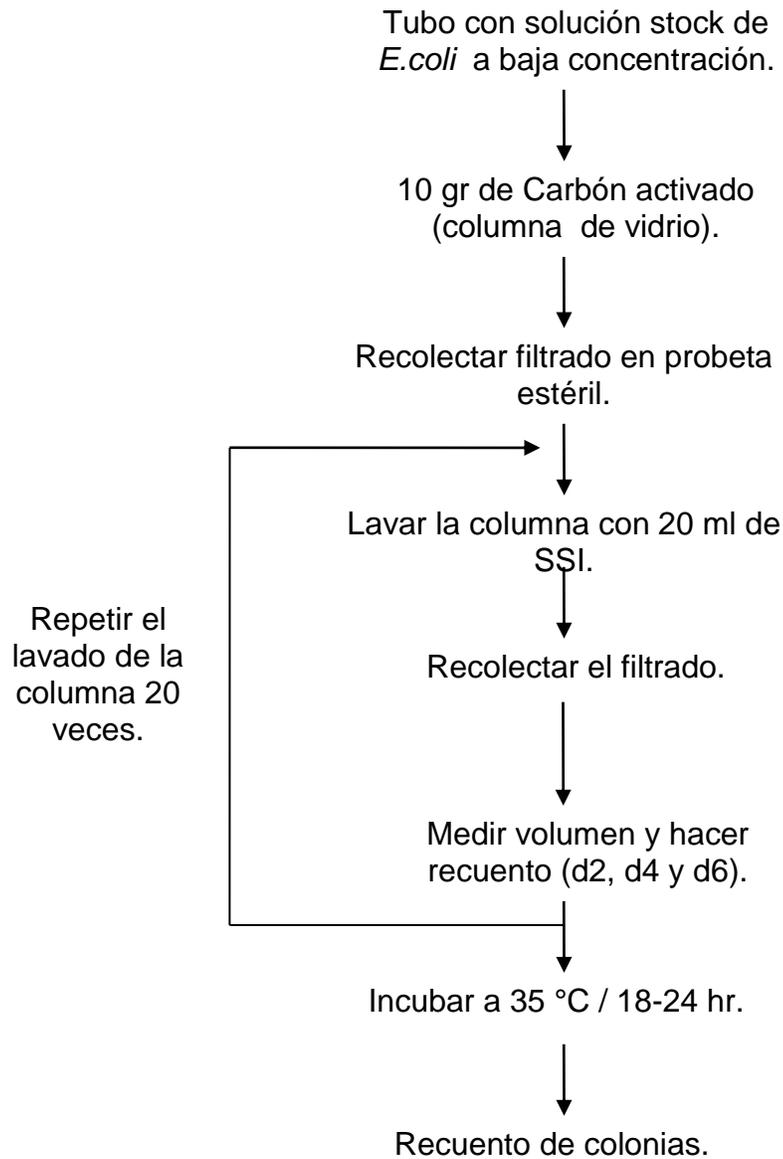


Figura 8. Desorción a baja concentración.

5.8 Establecer condiciones para suspender controladamente microorganismos dentro de los refrigeradores con un sistema de aerosoles.

5.8.1 Tratamiento del cultivo microbiano.

1. Se incubó *E.coli* en caldo soya tripticasa (tubos con 10 ml) a 35 °C por 18-24 hr., un total de 20 tubos.
2. Las cepas se lavaron dos veces, centrifugándolas a 3000 RPM por 15 minutos.
3. En el último lavado se adiciono solamente 1 ml de SSI a la pastilla formada de microorganismos en cada uno de los veinte tubos.
4. Se colocó el contenido de los tubos en un matraz kitasato estéril (Volumen final 20 ml de solución saturada de microorganismos), el matraz debe estar provisto de un tapón con un tubo de vidrio (burbujeador) que llegue hasta la solución de microorganismos (figura 7).

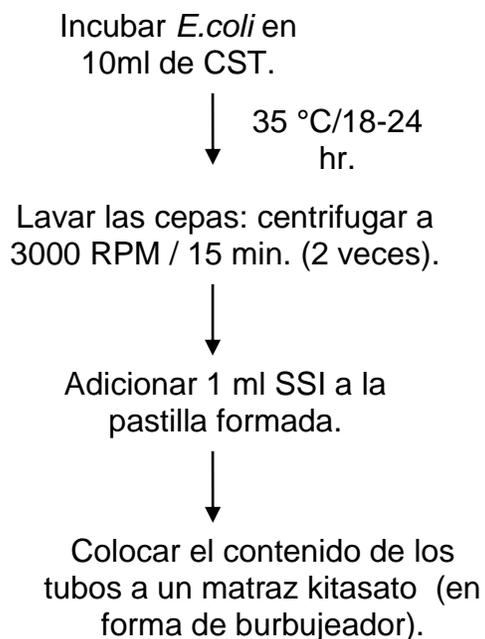


Figura 9. Tratamiento del cultivo microbiano.

5.8.2 Generación y recuento de microorganismos en aerosoles.

1. Por el tubo del matraz kitasato provisto como burbujeador se conectó el tanque de aire comprimido con un sistema regulador de flujo llamado riel de respiración.
2. Se generaron flujos de 500ml/min., 1 L/min., 2 L/min ó 5 L/min. por una hora, para generar aerosoles y conectarlos al matraz kitasato.
3. En la salida del matraz se conectó una manguera de 10 cm de largo, y al final un cartucho con 1.5 g de algodón o una membrana de filtro millipore, para hacer el recuento inicial de microorganismos.
4. Después de cada tiempo el algodón o la membrana se colocó en una bolsa con 100 ml de SSI estéril y se frotó (por afuera de la bolsa) por 5 min. para liberar los microorganismos retenidos, y posteriormente hacer el recuento de los microorganismos liberados por la técnica de vaciado en placa.
5. Las cajas del recuento se incubaron a 35 °C por 18 – 24 hr.
6. Se contó el número de colonias en cada una de ellas utilizando un cuenta colonias (Figura 8).

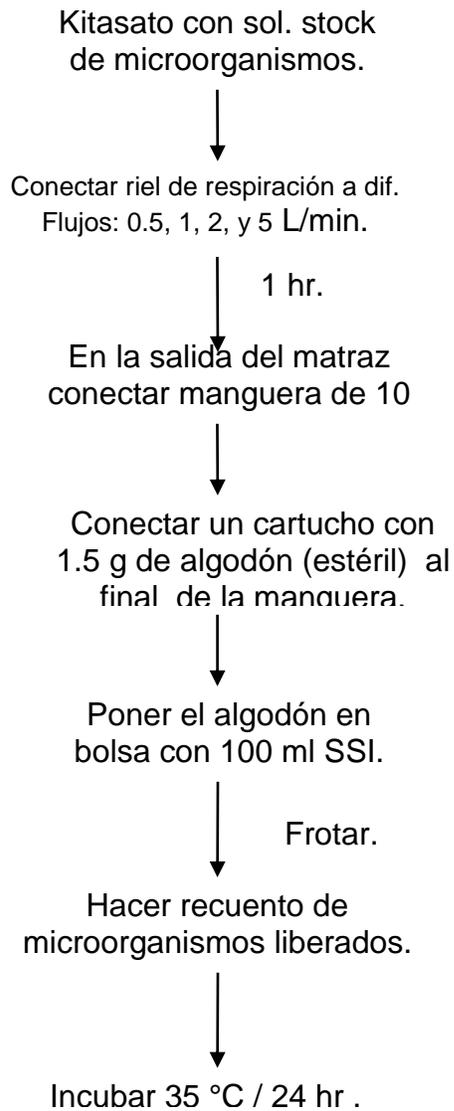


Figura 10 Generación y recuento de microorganismos en aerosoles.

5.9 Evaluación de la eficiencia de los materiales filtrantes dentro del refrigerador.

5.9.1 Comparación del crecimiento de *E. coli* en agar soya tripticasa y en agar bilis rojo violeta.

1. Se lavó y desinfectó el refrigerador a usar con solución de alcohol al 70 %.
2. Se dejó 3 hr. abierto y se conectó.
3. Se colocaron cajas petri en las paredes del refrigerador: 30 cajas con AST y 30 cajas con ABRV. Intercaladas y repartidas en todo el refrigerador
4. Una vez colocadas las cajas, se cerró el refrigerador.
5. Se Inoculó el refrigerador con los aerosoles de *E. coli* por 30 min. a 5 L/min.
6. Se dejó en reposo las cajas dentro del refrigerador por 6 hr.
7. Transcurrido el tiempo se retiraron las cajas y se incubaron a 35 °C por 24 hr (figura 11).

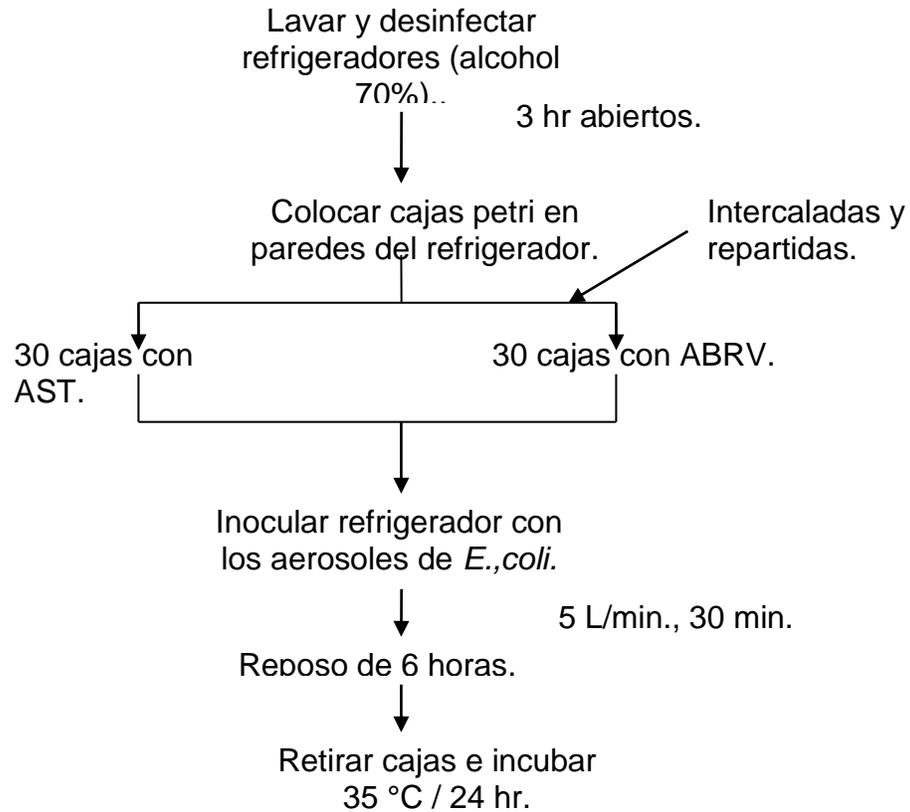


Figura 11. Comparación del crecimiento de *E. coli* en AST y en ABRV.

5.9.2 Evaluación de microorganismos suspendidos en el refrigerador por medio de cajas petri.

1. Se lavó y desinfectó el refrigerador a usar con solución de alcohol al 70 %.
2. Se dejó 3 hr abierto y se conectó.
3. Se colocaron cajas petri con AST en las paredes del refrigerador: 3 series de 3 cajas cada serie en cada pared como sigue:
 - ❖ *Pared Izquierda y derecha:* Se colocó 3 serie con 3 cajas cada serie, a una distancia aprox. de 8 cm. entre cada caja y 20 cm. entre cada serie.
 - ❖ *Pared del fondo:* Dos serie de 2 cajas con la separación del sistema del aire que esta en medio de esta pared y 20 cm. entre cada serie.

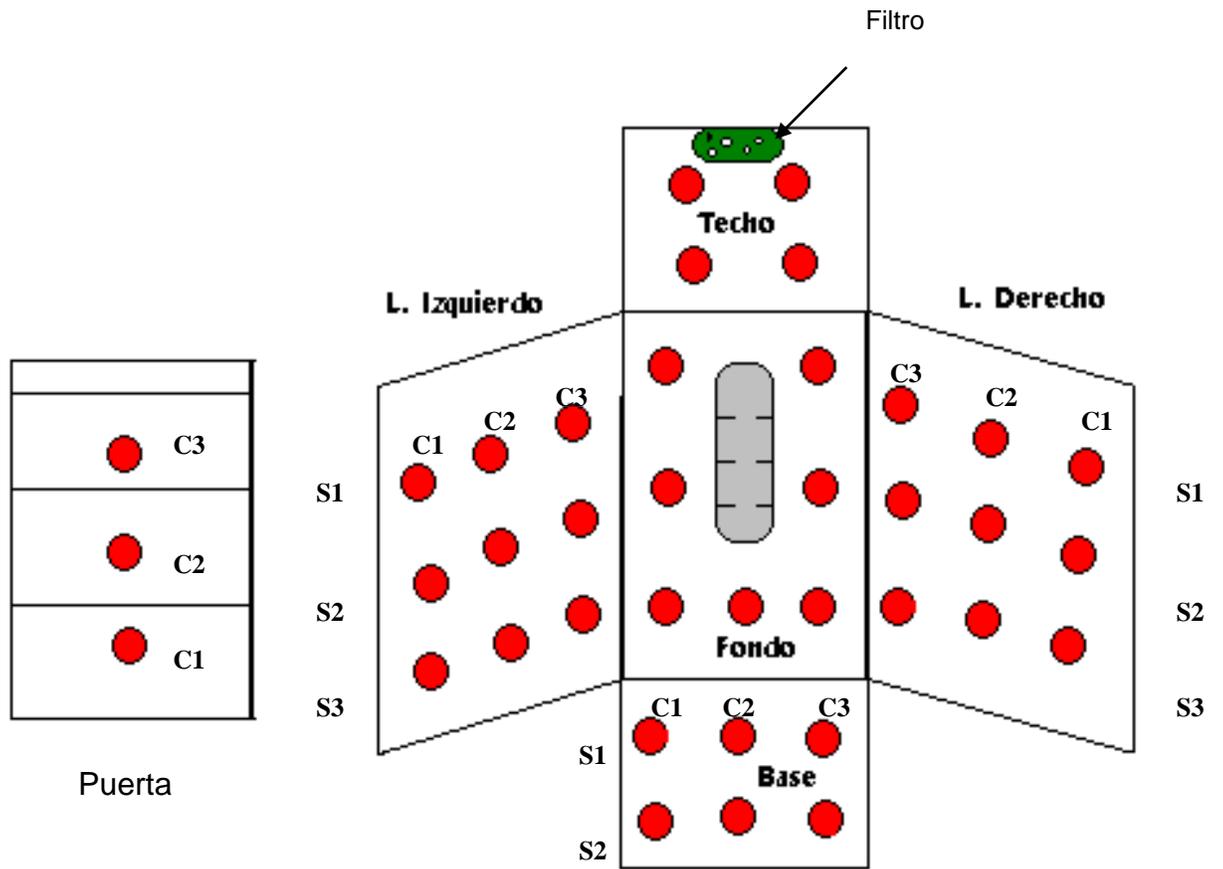
Otra serie de 3 cajas se colocó en la parte inferior, con una separación de 20 cm. de la serie 2 y de 8 cm. entre cada caja.

❖ *Base del refrigerador:* Dos series de 3 cajas cada serie con 18 cm. de separación entre cada caja y 15 cm. entre cada serie.

❖ *Techo del Refrigerador:* Dos series de 2 cajas cada serie con una distancia de 18 cm. entre cada caja y 15 cm. entre cada serie.

❖ *Puerta del refrigerador:* 3 cajas colocadas en el centro de la puerta en 3 niveles diferentes, de 20 cm. de separación cada nivel.

4. Una vez colocadas las cajas de AST se cerró el refrigerador y se dejaron ahí por seis horas.
5. Transcurrido el tiempo se retiraron las cajas y se incubaron por 24 hr a 35 ° C (figura 11).



Donde:
 C1, C2, C3 = Número de caja.
 S1, S2, S3 = Número de serie.

Figura 12. Diagrama de distribución de cajas petri en el refrigerador.

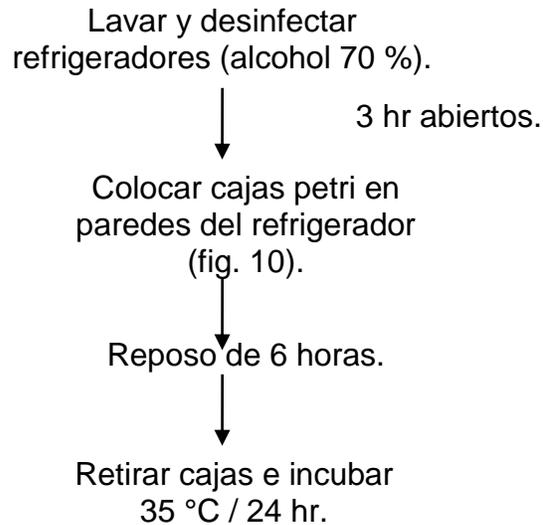


Figura 13. Recuento de microorganismos dentro del refrigerador.

5.9.3 Evaluación de la eficiencia del filtro por el método de muestreo con bomba de vacío.

1. Se lavó y desinfectó el refrigerador con solución de alcohol al 70%
2. Se dejó ligeramente abierto por 3 hr aprox. evitándose corrientes de aire. (Estos pasos se hicieron un día antes del experimento)
3. Se conectaron los refrigeradores y se dejaron funcionando toda la noche.
4. Se colocaron las membranas estériles en los orificios del congelador así como las mangueras de 10 cm. de largo en los hoyos del refrigerador (estos hoyos fueron realizado por la compañía para la evaluación).
5. Se colocaron los filtros con carbón y con zeolita en los refrigeradores correspondientes, un refrigerador es el control (aleatorios).
6. Se colocó el sistema de aerosoles por 30 min. directamente en un cartucho con algodón, para el recuento inicial. Se debe mantener el inóculo siempre a temperatura de refrigeración mediante una bañera de hielo a 4 °C aprox. (Ver experimento de estrés, 5.10)
7. El sistema de aerosoles se colocó por 30 min. a los refrigeradores, por la manguera 1, a 5 L/min. Se mantuvo el inóculo a temperatura de 4 °C aprox.

8. Se hicieron muestreos una vez transcurrido el tiempo de los aerosoles, por la manguera No. 2. Aquí se usó la bomba de vacío para extraer el aire del refrigerador conectado a un cartucho de algodón, con un flujo de 6 L/min. por un tiempo de 20 min., ver tabla 1 de muestreos.

Muestreo	Tiempo (hr)
M1	0
M2	1
M3	4
M4	24

Tabla 1. Tabla de muestreos para sistema de aerosoles.

9. Se hicieron recuentos de las diluciones: directa, dilución 1 y dilución 3 (de cada muestreo, y se incubaron a 35 °C por 24 hr.

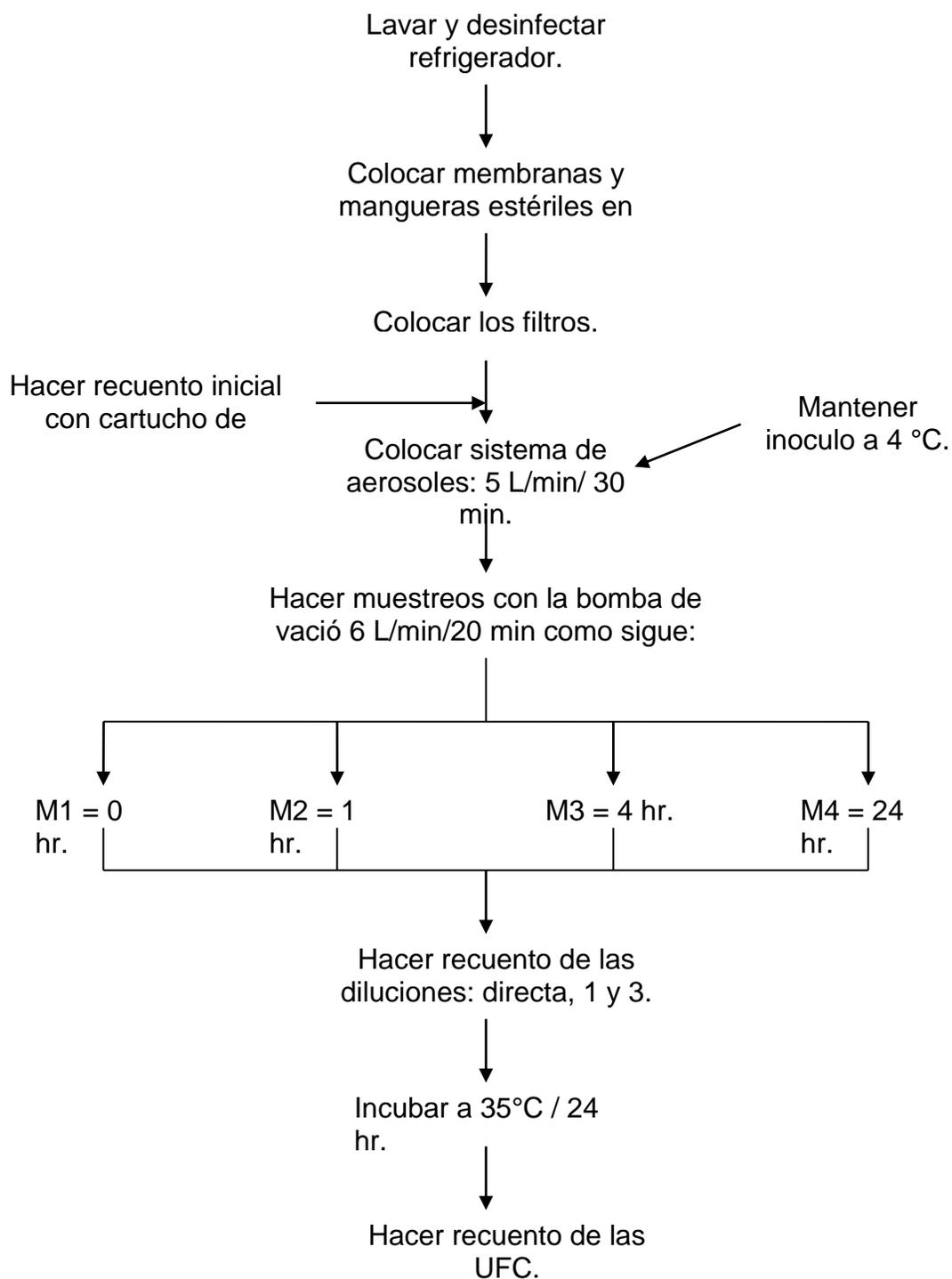


Figura 14. Evaluación de la eficiencia del filtro por el método de muestreo con bomba de vacío.

5.9.4 Evaluación de la eficiencia del filtro por el método simple de cajas petri.

1. Los refrigeradores se lavaron y luego se desinfectaron con una solución de alcohol al 70 %; una vez desinfectados se dejaron abiertos por tres hr. (en todo este procedimiento los refrigeradores se mantuvieron sin funcionar).
2. Transcurrido el tiempo, los refrigeradores se cerraron y se pusieron a trabajar por 8-12 hr. Para estabilizar la temperatura interna.
3. Una vez estabilizados se colocaron en las paredes internas del refrigerador cajas petri conteniendo Agar soya tripticasa (AST)) con la misma distribución del experimento 5.8.2, ver figura 10.
4. Una vez colocadas las cajas con AST, se cerró la puerta del refrigerador y todos los orificios excepto por donde se inocularon los aerosoles.
5. Se inoculo el refrigerador con los aerosoles a un flujo de 5 L/min. por 30 min.
6. Transcurrido el tiempo, se retiro el aerosol y se tapó el orificio donde se inoculo.
7. Se dejo cerrado el refrigerador por 6 horas.
8. Después de este tiempo se sacaron las cajas petri y se incubaron por 18-24 hr a 35 °C.
9. Se hizo recuento de las UFC en las cajas (figura 13).

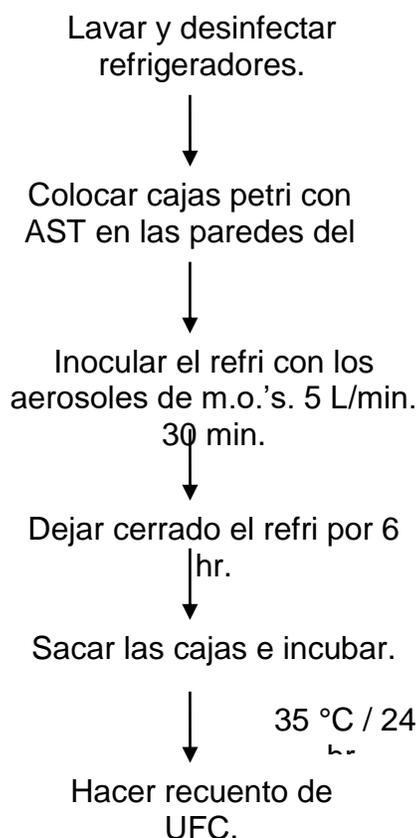


Figura 15. Evaluación de la eficiencia del filtro por el método de cajas petri.

5.10 Evaluación del estrés de *E. coli* causado por la temperatura.

5.10.1. Experimento en refrigeradores.

1. Se lavó y desinfectó los refrigeradores con solución de alcohol al 70%
2. Se Dejaron ligeramente abiertos por 3 h aprox. evitándose corrientes de aire.
3. Se colocaron cajas petri con AST en las paredes de los refrigeradores de la siguiente forma:
 - ❖ Pared Izquierda y derecha: Colocar 3 serie con 3 cajas cada serie, a una distancia aprox. de 8 cm. entre cada caja y 20 cm. entre cada serie.

- ❖ Pared del fondo: Dos serie de 2 cajas con la separación del sistema del aire que esta en medio de esta pared y 20 cm. entre cada serie. Y una última serie de 3 cajas hasta abajo, con una separación de 20 cm. de la serie 2 y de 8 cm. entre cada caja.
 - ❖ Base del refrigerador: Tres series de 4 cajas cada serie con 18 cm. de separación entre cada cajas y 10 cm. entre cada serie.
 - ❖ Techo del Refrigerador: Dos cajas con una distancia de 18 cm. entre cada caja
 - ❖ Puerta del refrigerador: 2 cajas posicionadas en el centro de la puerta en 3 niveles diferentes, de 20 cm. de separación cada nivel.
4. En uno de los refrigeradores se inoculo con el aerosol de *E. coli* a 5 L/min. por 30 minutos. Este inoculo se mantuvo a Temperatura ambiente por 24 hr.
 5. En otro refrigerador se inoculo con el aerosol de *E. coli* a 5 L/min. por 30 min. Pero este inoculo se mantuvo a Temperatura de refrigeración por 24 hr anteriores al experimento y también durante los 30 min. de aerosoles al refrigerador (esto se hizo con un baño de hielo a 4 °C aprox.)
 6. Transcurrido el tiempo de inoculación se dejó reposar el refrigerador por 6 horas.
 7. Una vez que paso este tiempo de reposo se retiraron las cajas y se incubaron a 35°C por 18-24 hr.
 8. Hacer recuento de UFC (figura 14)

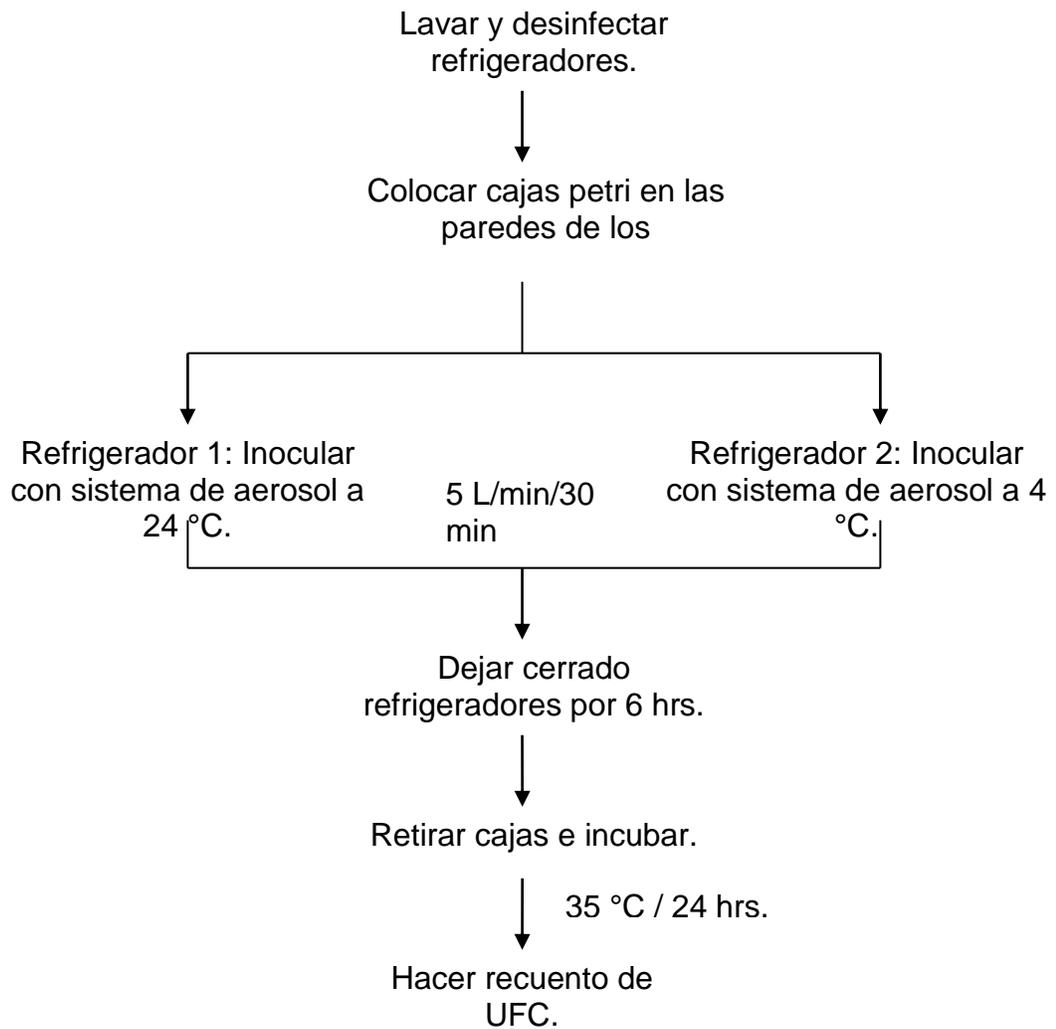


Figura 16. Evaluación del estrés de *E. coli* causado por la temperatura.

5.10.2 Experimento de evaluación de estrés por temperatura en tubos.

Cultivo microbiano

1. Se inocularon 3 tubos de CST con *E.coli*.
2. Se lavaron las cepas 2 veces centrifugándolas a 3000 rpm por 15 min.
3. En el último lavado se agregaron 10 ml de SSI a la pastilla de microorganismos.
4. Se colocó el contenido de los tubos en un matraz erlenmeyer de 50 ml estéril para tener una solución stock de microorganismos de 30 ml.
5. Se repartió esta solución stock en 6 tubos estériles con 5 ml cada uno.

Comparación de temperaturas

6. Tres de los tubos se colocaron en refrigeración y los otros tres a temperatura ambiente esto por 24 horas.
7. Transcurridas las 24 horas se hizo un recuento inicial de los tubos que estaban tanto a temperatura ambiente y en refrigeración.
8. A continuación los tubos que se encontraban a temperatura ambiente se colocaron en el refrigerador y se hizo dos recuentos a diferentes tiempos, a los 30 min. y a las 2 horas, tanto en AST como ABRV, y lo mismo se hizo con los que se encontraban desde un inicio en refrigeración, de acuerdo a la tabla 2.
9. Se incubaron las cajas a 35 °C por 24 hr.
10. Se efectuó el conteo de colonias en un cuenta colonias (UFC) (figura 15).

No. tubo	Temperatura inicial	Tiempo de muestreo *
1	Ambiente	30 min.
2	Ambiente	30 min.
3	Ambiente	30 min.
1	Ambiente	2 hr.
2	Ambiente	2 hr.
3	Ambiente	2 hr.
1	Refrigeración	30 min.
2	Refrigeración	30 min.
3	Refrigeración	30 min.
1	Refrigeración	2 hr.
2	Refrigeración	2 hr.
3	Refrigeración	2 hr.

Tabla 2. Tabla de muestreos para evaluar estrés de *E. coli*.

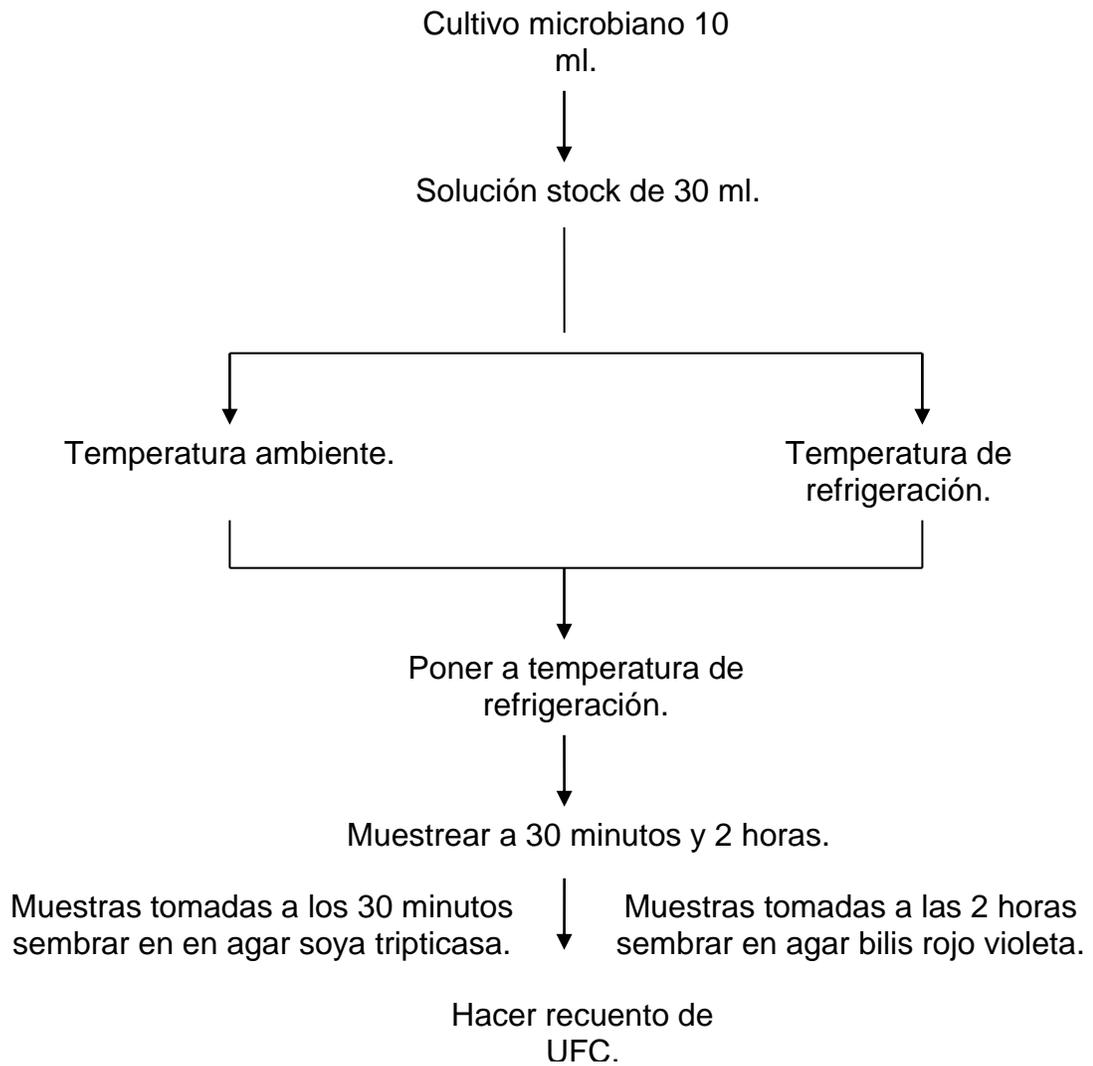


Figura 17. Evaluación del estrés de *E. coli* causado por la temperatura.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

La industria de los alimentos enfrenta el reto de generar alimentos de calidad comercial, con vida de anaquel prolongada, y con alto grado de inocuidad. Sin embargo, para que los alimentos generados de esta forma mantengan tales características una vez que salen de la empresa, deben aplicarse una serie de medidas durante el transporte, almacenamiento, comercialización e incluso en el hogar. Uno de las medidas universalmente utilizada para preservar o mantener las características mencionadas, es la refrigeración. A nivel casero, no basta con introducir un alimento en el refrigerador para lograr nuestro objetivo; se debe tener certeza por ejemplo de que se esta alcanzando la temperatura adecuada dentro del refrigerador, que el alimento se introduce en porciones pequeñas de tal forma que en corto tiempo se alcanza la temperatura deseada, y, no menos importante, se debe tener higiene dentro del refrigerador para no generar contaminaciones cruzadas. Es recomendable por tanto, limpiar periódicamente y de forma adecuada el refrigerador. No obstante, a pesar de observar estas medidas los mismos alimentos (frescos o no) son fuente potencial de microorganismos. En un refrigerador cerrado, el principal vehículo de dispersión de microorganismos de los propios alimentos es el aire. A través del aire pueden pasar microorganismos de un alimento a otro, afectando con ellos la carga microbiana de los alimentos de esta forma contaminándolos y probablemente disminuyendo su vida de anaquel, acelerando su deterioro o afectando su inocuidad. Por ello, la industria ha optado por generar filtros de aire para ser incluidos en los refrigeradores domésticos y de esta manera disminuir el riesgo de contaminación microbiana. Sin embargo, la eficiencia y vida media de muchos de los diferentes tipos de filtros o materiales filtrantes disponibles en el comercio para ser incluidos en los refrigeradores, no ha sido evaluada.

En consecuencia, el objetivo del presente estudio fue el evaluar la capacidad de materiales filtrantes para la retención de microorganismos en el aire de refrigeradores domésticos. En este estudio se utilizó una cepa de *Escherichia coli* no patógena.

Este microorganismo es nativo del intestino humano y de todos los animales de sangre caliente. Es una bacteria no patógena que es ampliamente utilizada para evaluar una diversidad de condiciones fisiológicas y bioquímicas de los microorganismos. Además, es un microorganismo que se utiliza para evaluar la eficiencia de procesos de desinfección y una diversidad de tratamientos encaminados a eliminar, reducir o evitar la presencia de microorganismos patógenos en los alimentos.

Debido a la escasa información metodológica para cuantificar la retención de microorganismos suspendidos en el aire, antes de iniciar los estudios con microorganismos suspendidos en el aire se trabajó primero con suspensiones acuosas del microorganismo. Para ello se hizo pasar un medio acuoso con un número definido de células a través de los materiales filtrantes contenidos en una columna de vidrio cromatográfica.

La capacidad de saturación máxima de los filtros para retener los microorganismos, definida como el número de microorganismos que saturan los sitios de adsorción de una gramo de material filtrante, se estimó haciendo pasar varias ocasiones volúmenes preestablecidos de la solución stock del microorganismo a través de una cantidad conocida del material; en cada ocasión se contó el número de células que no eran retenidas después de haber pasado por el material filtrante.

Así en un primer estudio se trabajo con carbón de coco y carbón mineral proporcionado por la empresa participante; se inocularòn 10 mL de una suspensión conteniendo 4, 000, 000,000 de células de *E. coli* a 10 g de carbón contenido en una columna cromatográfica.

Tanto el carbón mineral como el orgánico retuvieron alrededor del 99.8% de los microorganismos inoculados (figura 16). Esto nos indica la gran capacidad del carbón para retener microorganismos.

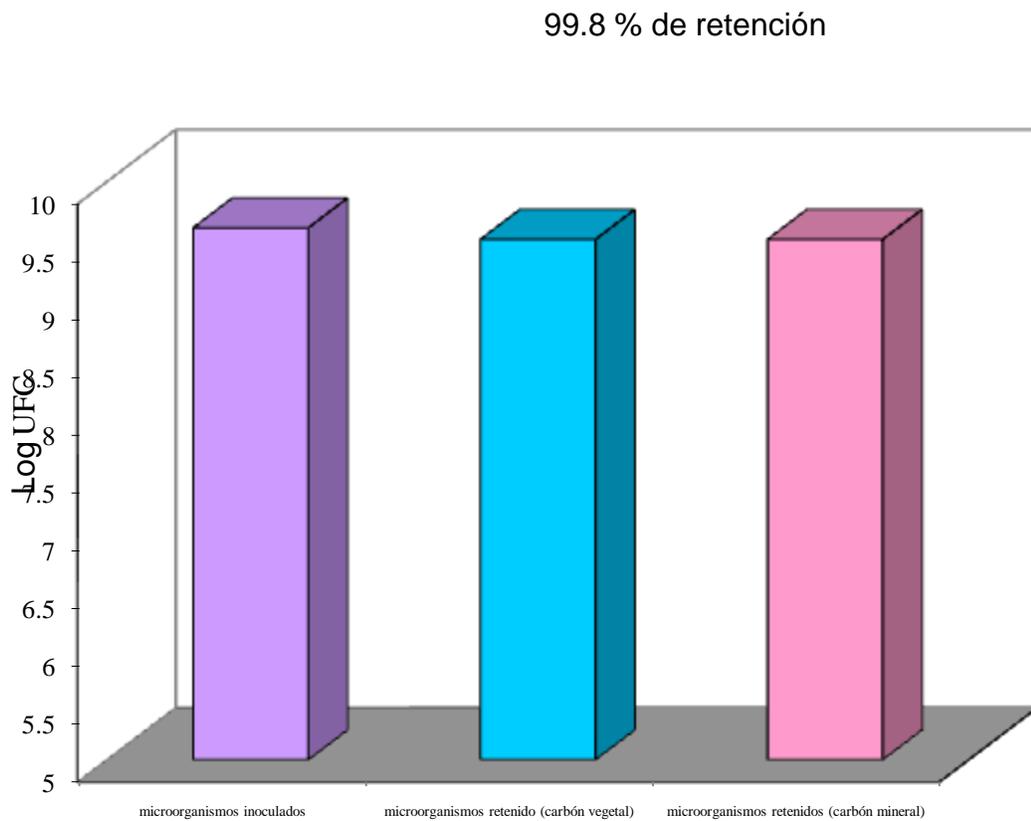


Figura 18. Microorganismos retenidos por el carbón.

En estudios posteriores para estimar el límite de saturación del carbón activado, se realizaron inoculaciones sucesivas sobre la columna que contenía el carbón activado, con una cantidad aprox. de 1.5×10^9 a 2×10^9 células de *E.coli* por cada inoculación.

Con la finalidad de conocer el nivel de saturación máxima del componente filtrante, se incremento el número de inoculaciones de la columna.

En los primeros estudios se inoculó 10 veces la columna; se observó que al inició la retención de microorganismos por el carbón fue alta (alrededor de 99.9%), (figuras 17 y 18).

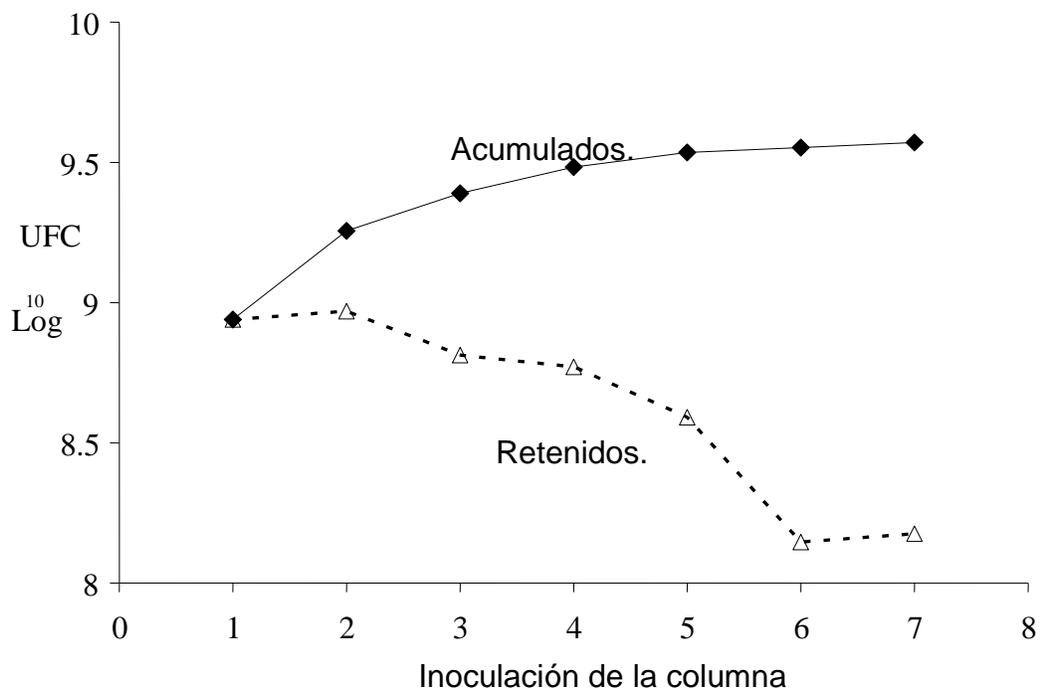


Figura 19. Retención y acumulación de microorganismos por carbón vegetal.

No obstante, se encontró que conforme se incrementaba el número de inoculaciones en la columna, la capacidad de retención de microorganismos por el carbón disminuía. Con el carbón vegetal a partir de la sexta inoculación se observó una ligera meseta (retenidos) (figura 17).

Independientemente del tipo de carbón, ambos muestran una alta capacidad de retención; se observó que aun después de retener 4000 millones de células, el material continuaba reteniendo microorganismos.

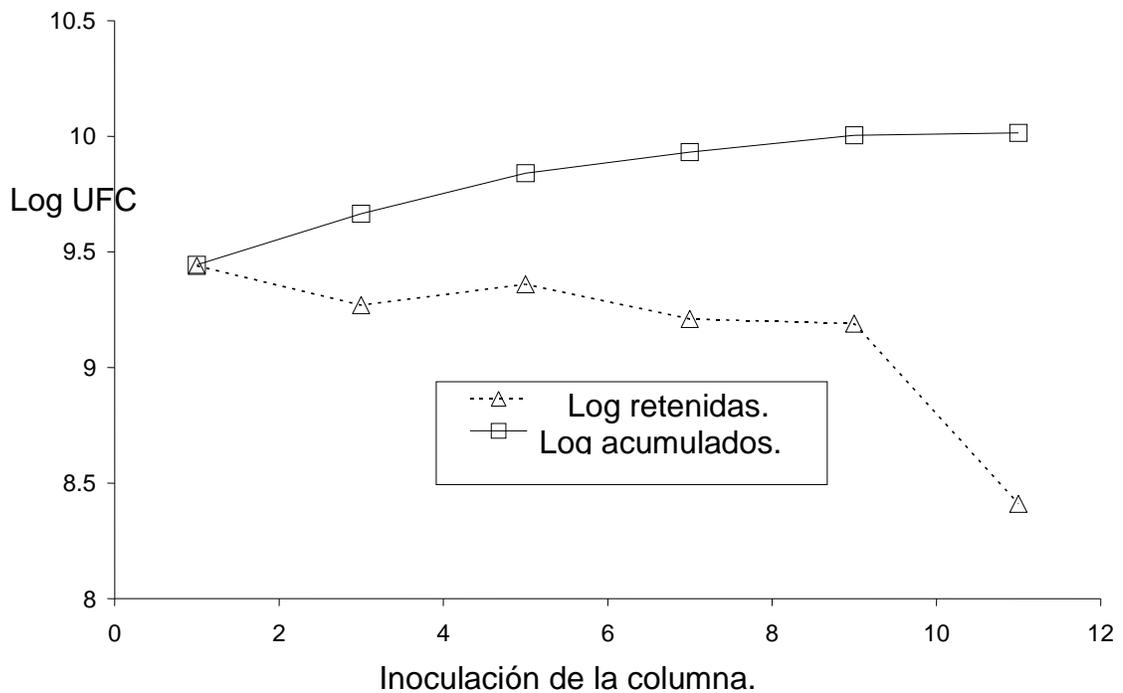


Figura 20. Acumulación de microorganismos por carbón mineral.

Es importante señalar que en los estudios anteriores se empleo carbón que estuvo en contacto con la zeolita o que fue muy manipulado. Este manejo previo pudo contaminar el carbono disminuyendo su capacidad de retención. En consecuencia, llevamos a cabo estudios con carbón no manipulado o que no había estado en contacto con zeolita.

Se utilizó carbón mineral. El carbón no manipulado presento una capacidad de retención 10 veces mayor que la mostrada por el carbón que había sido manipulado (gráficas 19, 21 y 23). Se realizaron varias replicas de este experimento y en todos se encontraron resultados semejantes.

En estos experimentos se observó que entre la onceava y la vigésima inoculación de la columna, se satura por completo el carbón mineral (gráficas 19, 21 y 23). Estos resultados sugieren que la saturación de la columna depende de la cantidad de inóculo inicial.

En los estudios mostrados en las figuras 19 y 21, la cantidad de inóculo en cada ocasión fue de 2,500 millones de bacterias, mientras que en el caso de la figura 24 este fue de 1,500 millones, o sea que se inocularon 1,000 millones menos en cada ocasión. Esto podría explicar el porqué en este estudio la saturación de la columna se presentó hasta la vigésima inoculación de la columna.

Algo que llamó fuertemente la atención fue que una vez que se había saturado el carbón con los microorganismos, después los comenzó a liberar (figuras 20 y 22).

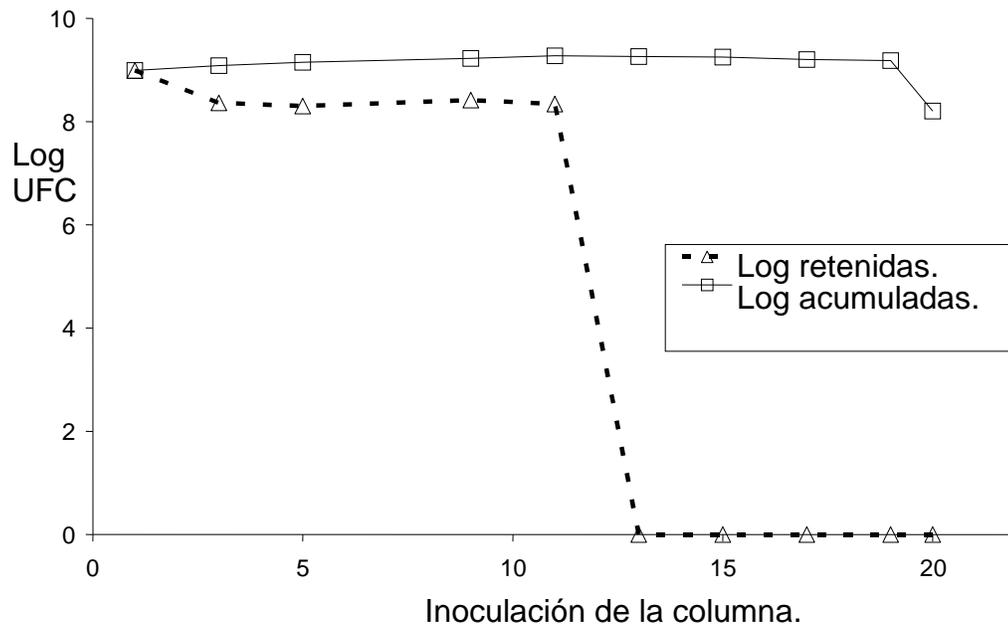


Figura 21. Retención y acumulación de microorganismos por carbón mineral.

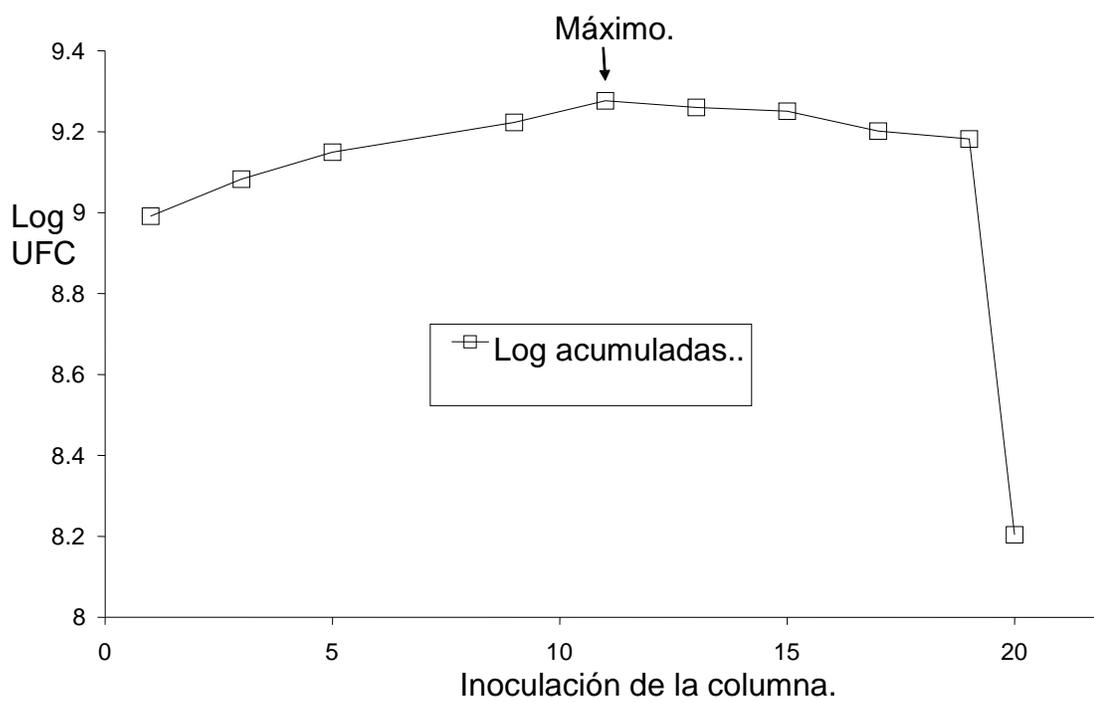


Figura 22. Microorganismos acumulados en la columna de carbón mineral (a).

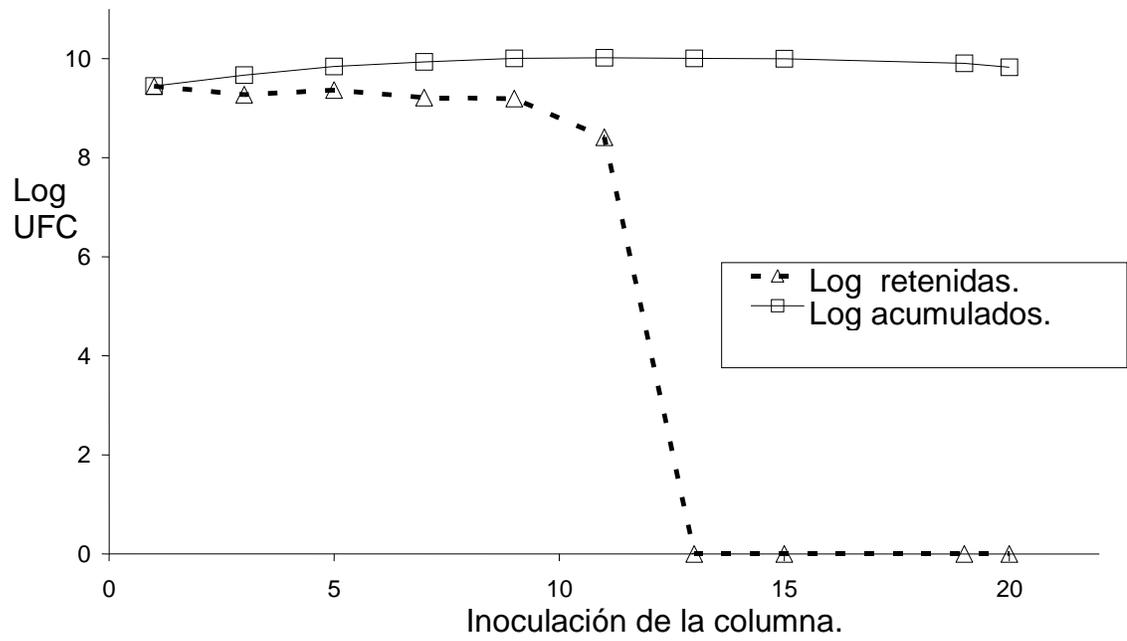


Figura 23. Retención y acumulación de microorganismos por carbón mineral (b).

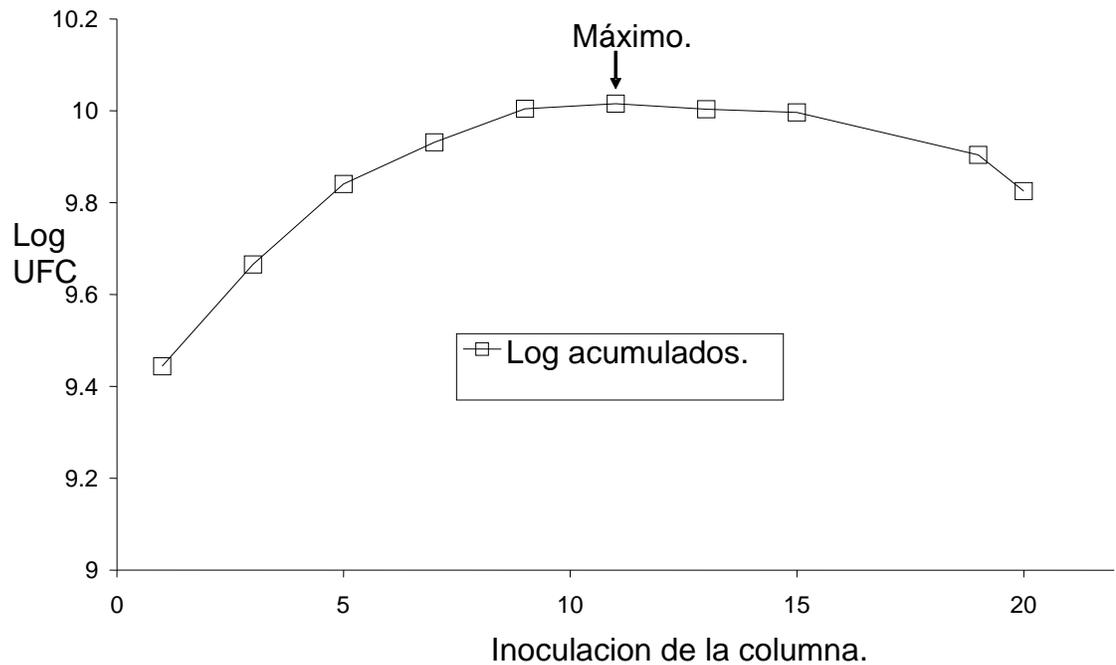


Figura 24. Microorganismos acumulados en la columna de carbón mineral (b).

Con la finalidad de homogenizar resultados, realizamos un estudio en donde inoculamos al mismo tiempo tres columnas con carbón mineral y un número de células 4 veces mayor (10,000 millones de bacterias por cada inoculación) al empleado en los estudios anteriores. Bajo estas condiciones de inoculación, se observó nuevamente que después de alcanzar el máximo de retención de microorganismos el carbón libera parte de los microorganismos retenidos (figura 25). Este fenómeno de saturación del carbón mineral y la posterior liberación de microorganismos se aprecia mejor ampliando la escala en la gráfica (figura 26).

Es posible observar que el carbón ya saturado de microorganismos no libera la totalidad de microorganismos retenidos; y que también llega a un límite de liberación a partir del cual nuevamente comienza a retener microorganismos de nuevas inoculaciones de la columna.

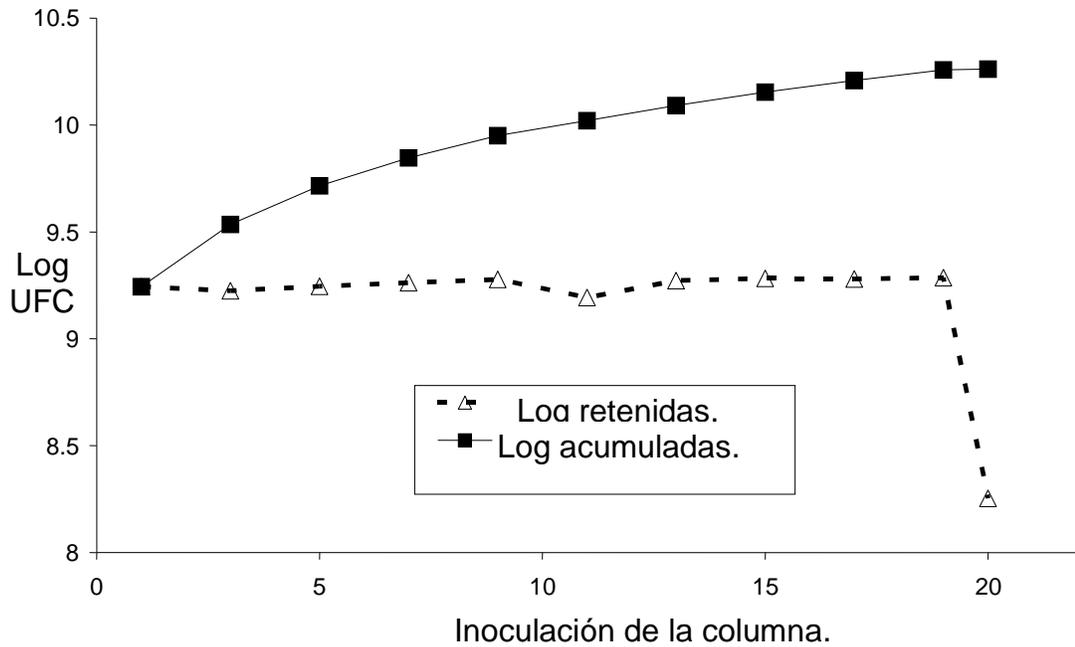


Figura 25. Retención de microorganismo por carbón mineral (triplicado).

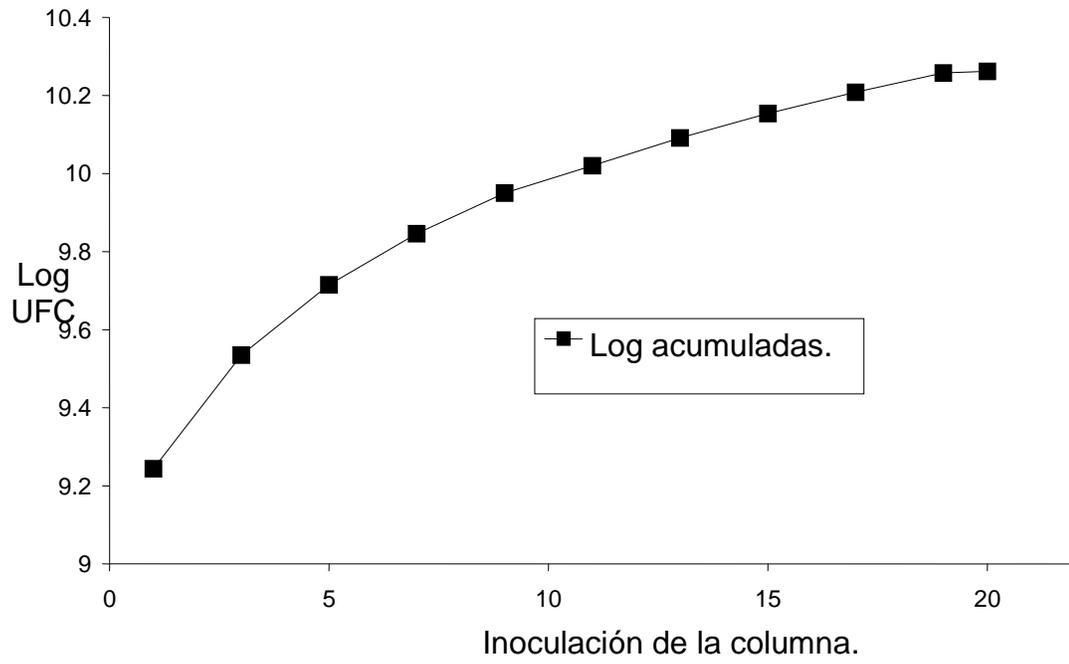


Figura 26. Microorganismos acumulados en la columna de carbón mineral.

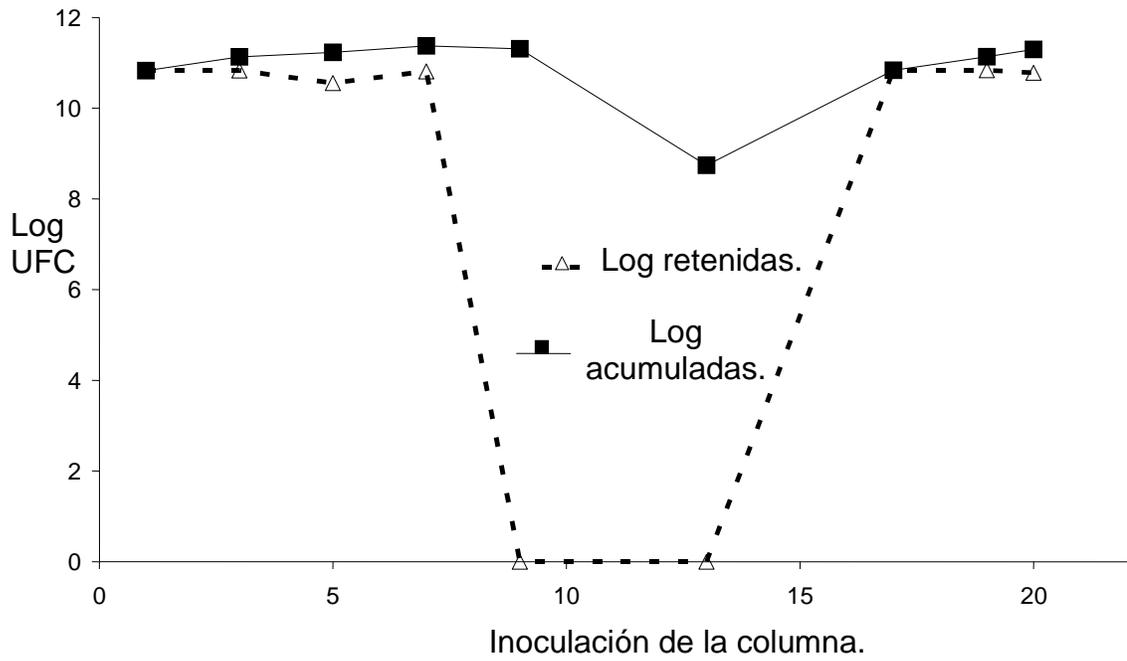


Figura 27. Retención de microorganismo por carbón mineral (triplicado).

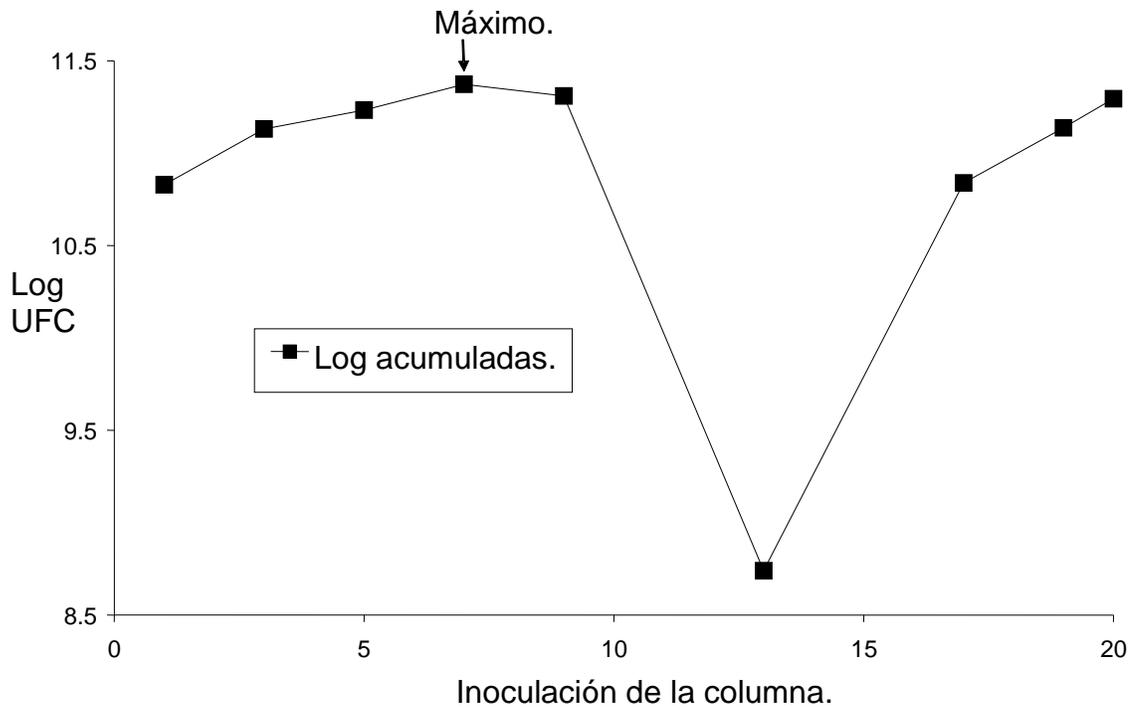


Figura 28. Acumulación de microorganismos por carbón mineral.

El carbón mostró un comportamiento hasta ahora aparentemente no reportado en la literatura. Llama la atención el proceso de adsorción-desorción tan particular que manifiesta este material.

A pesar de tal comportamiento, encontramos que el nivel máximo de retención de 10 g de carbón fue de alrededor de 10, 000 millones de bacterias. Esta cifra de microorganismos es muy poco probable que se encuentre en el aire de un refrigerador domestico aún si no se aplicaran buenas prácticas higiénicas.

Normalmente la concentración de microorganismos en el aire de un refrigerador es baja. De tal forma que es muy probable que bajo condiciones normales trascorra mucho tiempo antes de que el material se sature con microorganismos.

Realizamos una serie de experimentos para conocer más sobre el proceso de desorción del carbón. Para este efecto, se realizaron dos experimentos semejantes, en uno se utilizó un inóculo muy alto de microorganismos (800, millones) y en el otro uno bajo (10, 000). Las columnas se inocularon con estas concentraciones por separado y posteriormente se realizaron 20 lavados de cada una de las columnas inoculadas (carbón inoculado). Cada lavado consistió en hacer pasar 20 mL de solución salina estéril por la columna. El líquido de lavado se recuperó y se contaron los microorganismos liberados en cada ocasión. Para el caso del inóculo alto, se observó que en el primer lavado el material filtrante liberó el 3 % de los microorganismos retenidos al inicio (Figura 30 y 31); la liberación de microorganismos disminuyó conforme se hacían los lavados progresivos.

A pesar de la liberación, el número de células que permanecieron en el carbón después de 20 lavados fue muy alto (Figura 31). Inicialmente el carbón contenía aproximadamente 822 millones de células de *E. coli*, luego de 20 lavados descendió a 776 millones (Figura 31).

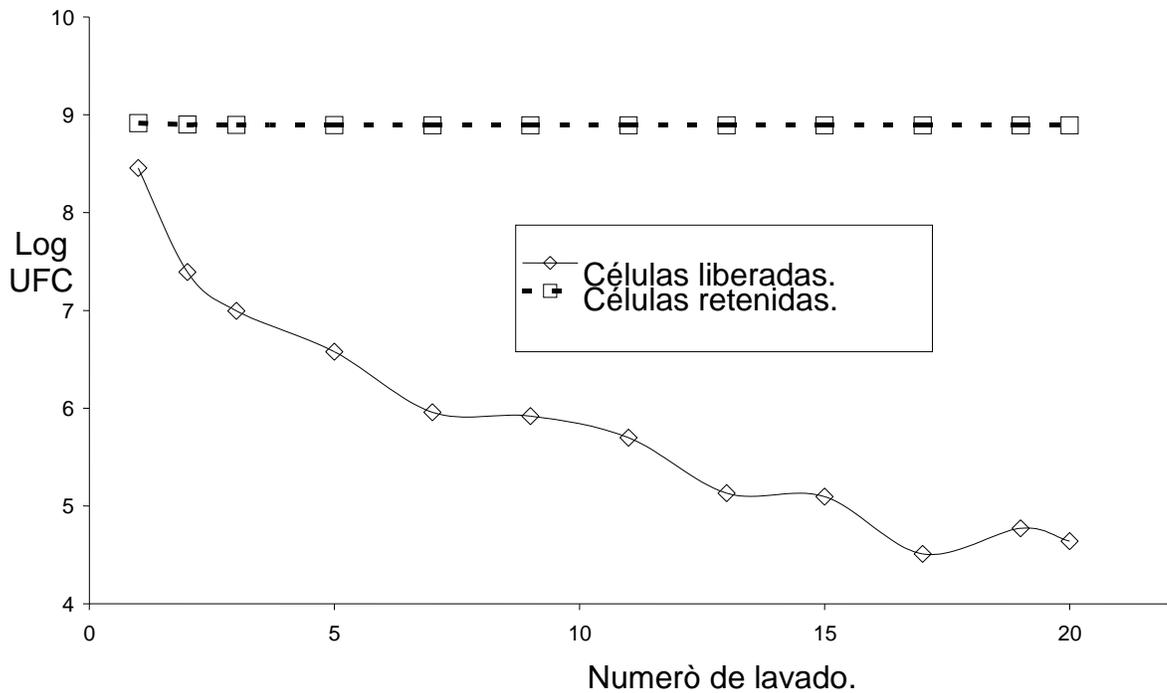


Figura 29. Liberación y retención de células por carbón partiendo de una concentración inicial de microorganismos alta.

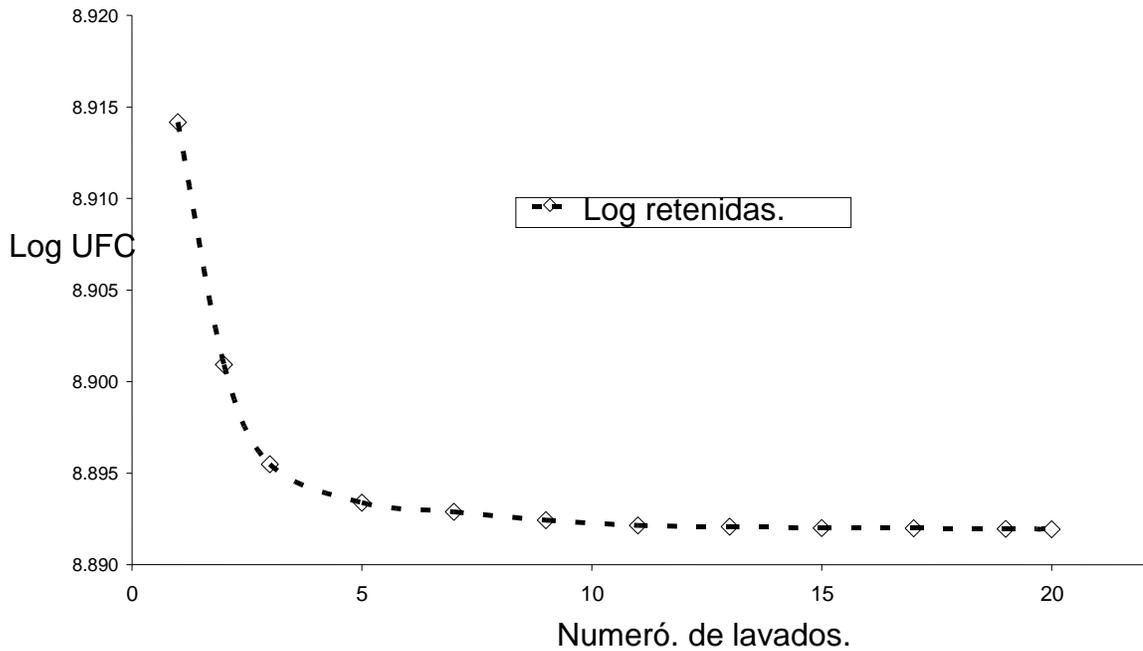


Figura 30. Concentración de microorganismos en el carbón después de los lavados.

Quando trabajamos con el inculo bajó se observó un comportamiento semejante al estudio anterior; con el inculo bajo, en el primer lavado de la columna sólo se liberó el 1 % de los microorganismos retenidos (Figura 32). En la tabla 3 se muestra un resumen de los porcentajes de liberación y retención de las dos concentraciones realizadas.

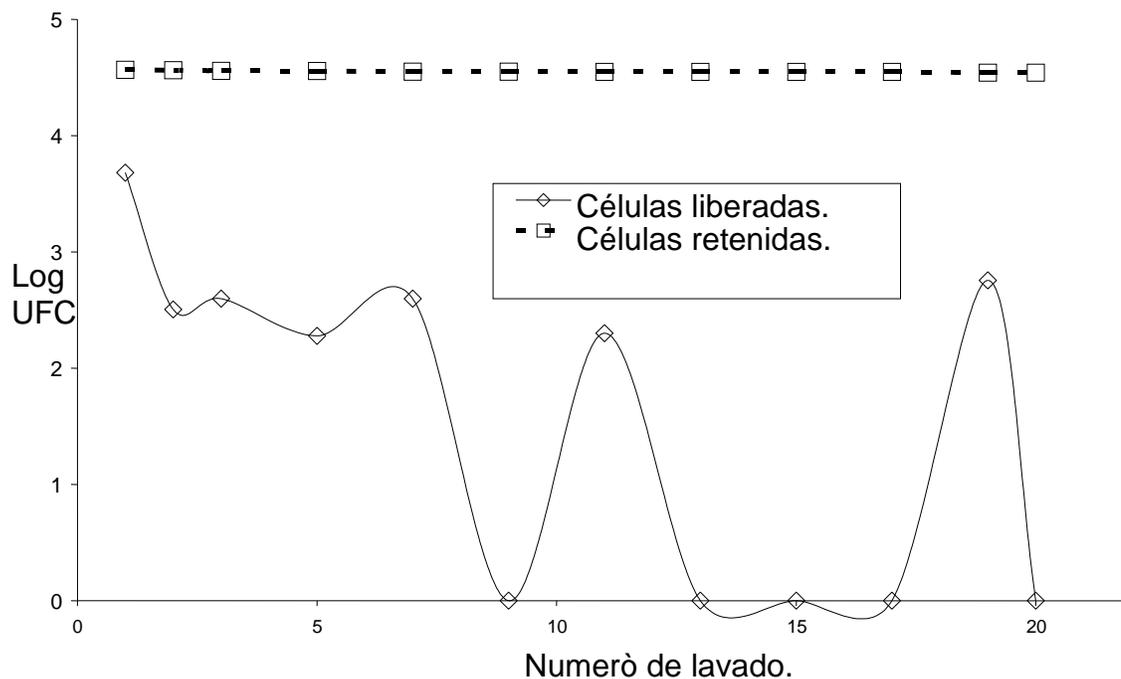


Figura 31. Desorción y retención de células partiendo de una concentración de microorganismos inicial alta.

CONCENTRACION INICIAL ALTA			CONCENTRACION INICIAL BAJA		
No. lavado	% Células retenidas	% Células liberadas	No. lavado	% Células Retenidas	% Células Liberadas
1	97.00	3.00	1	99.13	0.87
2	98.76	1.24	2	98.92	1.08
3	99.52	0.48	3	99.47	0.53
5	99.88	0.12	5	98.90	1.10
7	99.89	0.11	7	100.00	-
9	99.94	0.06	9	99.44	0.56
11	99.98	0.02	11	100.00	-
13	99.98	0.02	13	100.00	-
15	100.00	0.00	15	100.00	-
17	99.99	0.01	17	98.39	1.61
19	99.99	0.01	19	100.00	-

Tabla 3. Tabla de comparación de porcentajes de retención y liberación.

Para el caso de la zeolita, se trabajó primero con este material conteniendo permanganato de potasio. Se realizaron estudios semejantes a los de carbón, sin embargo, a diferencia de las perlas de carbón activado las perlas de zeolita se desintegraron al contacto con el medio acuoso donde se suspendieron las bacterias. A pesar de ello, era posible llevar a cabo la evaluación ya que mediante una membrana se podían retener las partículas de zeolita. Sin embargo, se presentó otro inconveniente con este tipo de zeolita; el permanganato. Este es un material altamente oxidante y con un alto poder antimicrobiano por lo que no iba a ser posible evaluar la capacidad de retención de la zeolita si estaba presente el permanganato. Para comprobar, se determinó la acción germicida del permanganato liberado al medio acuoso por las perlas a diferentes tiempos de contacto. Se observó que en tan solo 1 minuto la concentración de permanganato (no determinada) liberado por 10 g de zeolita inactivaba a 4,000 millones de células de *E. coli*. Esto demuestra que el permanganato contenido en las perlas de zeolita tiene una gran actividad antimicrobiana.

Se trabajó en un inicio con zeolita conteniendo permanganato de potasio, debido a que era una opción de materiales que tenía la empresa participante, sin embargo después de estos estudios se desechó por su peligrosidad ya que es un material altamente oxidante. Además, que fácilmente se desprende de la zeolita ya sea por el aire o agua de condensación en consecuencia los alimentos podrían terminar contaminados con permanganato.

La capacidad de retención máxima de microorganismos por zeolita la determinamos utilizando este material que no contenía permanganato. En los primeros experimentos observamos que en las cinco primeras inoculaciones prácticamente no hubo retención de microorganismos si no hasta la séptima (Figura 30).

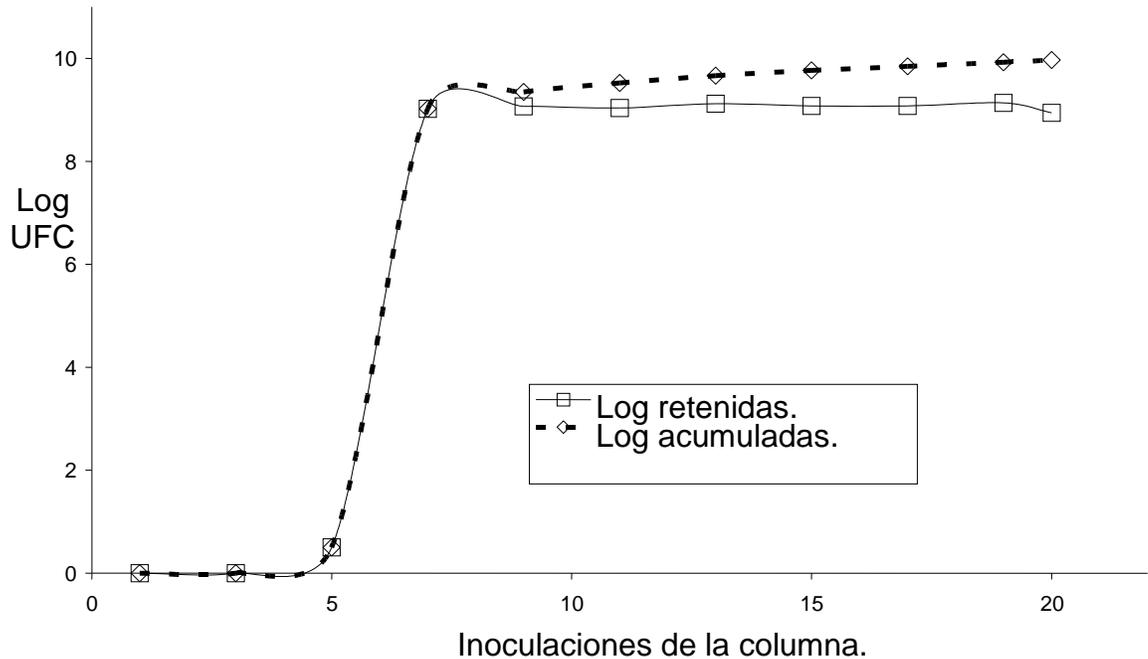


Figura 32. Retención de microorganismos por la zeolita.

En estudios posteriores nos encontramos resultados muy diferentes por lo que concluimos que la zeolita no es uniforme en su estructura. Algunas de estas diferencias en cuanto al potencial de retención de microorganismos por la zeolita se aprecian en las figuras 31 y 32. En las gráficas, la línea punteada expresa el número de células de *E. coli* que se retenían cada ocasión que se hacía pasar una suspensión con una concentración constante del microorganismo. Se aprecia en la Figura 31 que después de la quinta inoculación el material no retuvo prácticamente ninguna célula, no obstante, a partir de la décima comienza nuevamente a retener células. Algo semejante observamos en la gráfica 32; si bien en este experimento en todo momento la zeolita sigue reteniendo, no en todas las inoculaciones de la columna se retuvo la misma concentración de microorganismos. Existe una gran variación en la retención.

Sin embargo, aun con estas variaciones se observa que la zeolita tiene gran capacidad de retención de microorganismos, por lo que es un material que podría emplearse en los filtros para refrigeradores.

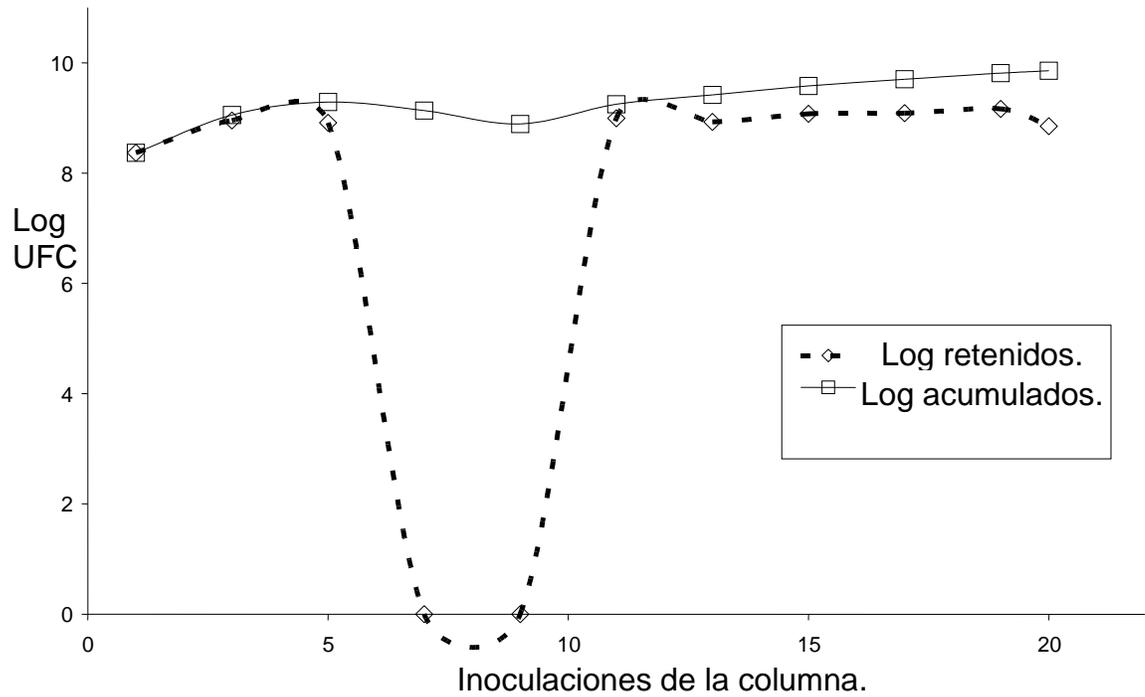


Figura 33. Retención y acumulación de zeolita sin permanganato, Exp. 2.

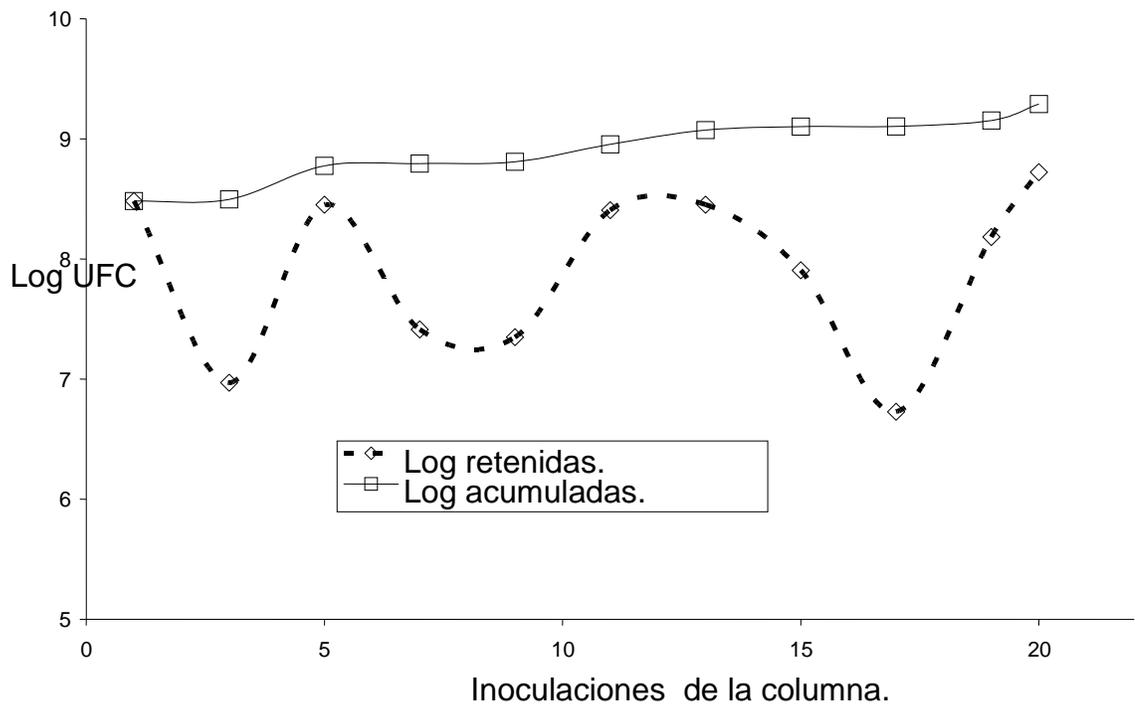


Figura 34. Retención y acumulación de microorganismos por zeolita.

Con la información de la capacidad de retención del carbón y zeolita que obtuvimos, se procedió a llevar a cabo los estudios para determinar su eficiencia ahora dentro de los refrigeradores. El primero problema a resolver consistió en hallar un sistema que permitiera suspender una concentración conocida de microorganismos en el aire del refrigerador. Se estableció un sistema en el cual una suspensión de células lavadas y concentradas se hizo burbujear con una corriente de aire (con un flujo conocido), de tal manera que se generaran aerosoles que serían arrastrados por el aire que se inyectaba al sistema. Y de esa manera determinar las condiciones adecuadas para generar una concentración conocida de células suspendidas en el aire así como también identificar la forma para hacer los recuentos de los microorganismos suspendidos en el aire, se realizarán una serie de experimentos preliminares.

Se llevarón a cabo diferentes ensayos con flujos de aire de 0.5, 1, 2 y 5 litros por minuto durante una hora, con el fin de encontrar las condiciones que permitieran suspender en el aire un alto número de microorganismos.

Se observó que con un flujo de aire de 0.5 L/min, no se logró suspender al microorganismo. Con un flujo 1L/min la máxima concentración de microorganismos que se lograrón suspender fue de 4,700 bacterias. En este estudio para el conteo de microorganismos se emplearón filtros con membranas de acetato de celulosa o con algodón; con los filtros empacados con algodón se obtuvieron mayores recuentos de microorganismos. En los siguientes estudios empleamós filtros empacados con algodón para el recuento de los microorganismos. Aunque se logró suspender microorganismos con este flujo no fue suficiente para lograr una alta concentración de microorganismos en el aire. Con flujos de aire de 2 y 5 L/min se lograron suspender 2, 700,000 y 125 millones de bacterias. Por lo tanto, se eligió un flujo de aire de 5 L/min para realizar los experimentos en los refrigeradores.

Primero se realizó una evaluación para seleccionar el medio de cultivo más adecuado para el recuento de los microorganismos suspendidos dentro de los refrigeradores. Se comparó el crecimiento de *E. coli* en agar soya tripticasa (AST) y agar bilis rojo violeta (ABRV). Para esto, se suspendieron células de *E. coli* en el aire interno de un refrigerador. Se contarón las células que tuvieron contacto con las cajas de cultivo expuestas (sin tapa) dentro del refrigerador inoculado. Las cajas petri con el medio de cultivo se distribuyerón dentro del refrigerador como se describió en la metodología. Se observarón mayores recuentos con el AST (Tabla 4). Dado lo anterior los experimentos siguientes se realizaron en AST.

Debido que para el conteo de *E. coli* suspendido en el aire se utilizaría un medio no selectivo (AST), existía la posibilidad de subestimar el número real de células de *E. coli* ya que los microorganismos nativos del aire interno del refrigerador o de las superficies podrían también depositarse en las cajas de cultivo confundiendo con las de *E. coli*, por tal razón, se investigó la concentración de microorganismos dentro del ambiente del refrigerador. La concentración encontrada fue baja: 12 UFC. Este número de microorganismos prácticamente no interfiere en nuestras evaluaciones.

Parte del refrigerador donde se colocaron las cajas de cultivo	AST	ABRV
Lado izquierdo	43	11
Lado derecho	27	11
Base	214	79
Fondo	49	7
Puerta	12	2
Techo	0	0
TOTAL	345	110

Tabla 4. Comparación de crecimiento de *E.coli* en AST y ABRV.

Definidas las condiciones a utilizar, se realizaron los estudios para evaluar los materiales filtrantes dentro de los refrigeradores. En todos los casos se partió con una concentración de microorganismos en forma de aerosoles dentro del refrigerador de aproximadamente 6000 células de *E. coli* dispersas en todo el volumen de aire. No encontramos diferencia en los niveles de microorganismos recuperados en las cajas de cultivo colocadas en los refrigeradores con o sin los materiales filtrantes (Tablas 5-7).

Los resultados que encontramos sugieren que los filtros aparentemente no contribuyen a disminuir los niveles de microorganismos suspendidos en el aire interno de los refrigeradores. Esto puede ser debido a la posición destinada a la colocación de los filtros por la empresa fabricante de los refrigeradores. Aunque los refrigeradores cuentan con un sistema de ventilación y recirculación de aire, observamos que el aire tiene muy poco contacto con los filtros debido a su posición dentro del refrigerador. Además observamos también que el dispositivo donde se debe colocar el material filtrante, según el fabricante, ofrece cierta resistencia al desplazamiento del aire a través de él. En consecuencia, debido a estos dos posibles efectos, el material filtrante tiene poco contacto con los microorganismos suspendidos. Es recomendable diseñar un sistema global (recirculación de aire, posición del filtro, material del filtro, etc) dentro del refrigerador que permita que una mayor cantidad de aire pasé por el filtro de tal manera que el material filtrante tenga contacto con los microorganismos y los retenga.

Pared del refrigerador	Promedio de m.o.'s./caja
Techo	0
Izquierdo	4
Derecho	12
Fondo	26
Puerta	8
Base	154

Tabla 5. Promedio de microorganismos por caja de cultivo recuperados según posición dentro del refrigerador sin filtro (control).

Pared del refrigerador	Promedio de microorganismos/caja
Techo	3
Izquierdo	12
Derecho	16
Fondo	6
Puerta	9
Base	140

Tabla 6. Promedio de microorganismos por caja de cultivo recuperados según posición dentro del refrigerador con filtro de carbón.

Pared del refrigerador	Promedio de microorganismos/caja
Techo	3
Izquierdo	23
Derecho	40
Fondo	35
Puerta	1
Base	226

Tabla 7. Promedio de microorganismos por caja de cultivo recuperados según posición dentro del refrigerador con filtro de zeolita.

Al realizar los estudios dentro de los refrigeradores, nos llamo la atención el hecho de que a pesar de partir de concentraciones altas de microorganismos para generar aerosoles e inocularlos dentro del refrigerador, había una recuperación muy pequeña en las cajas de cultivo colocadas dentro de los refrigeradores.

Esto no ocurría cuando trabajábamos fuera del refrigerador; en este caso bajo las mismas condiciones de formación de aerosoles se recuperaba una concentración del microorganismo hasta 100 veces mayor. Se pensó entonces en un posible estrés que sufrían los microorganismos al someterse a la temperatura de refrigeración súbitamente. De hecho, se sabe que el enfriamiento súbito de las células de algunas especies que se hallan en crecimiento (*E. coli*, *Pseudomonas*), causa una muerte muy importante en la población (>90%) y que este fenómeno, curioso e inexplicado, no se observa con el enfriamiento gradual o con pases progresivos a distintas temperaturas (Davis, 1978). Así que se evaluó esta posibilidad. Para este experimento la solución stock, se dividió en dos volúmenes iguales, uno se almacenó en refrigeración y otro se dejó a temperatura ambiente, en ambos casos se almacenó por 24 horas. Trascurrido el tiempo, en refrigeradores independientes y por separado se generaron aerosoles con las diferentes suspensiones. Se encontró que efectivamente *E. coli*, sufría un estrés (shock por enfriamiento) al someterse al aerosol generado a una temperatura de refrigeración súbita (Tabla 9). Cuando se generaron aerosoles con la suspensión previamente almacenada en refrigeración, se recuperó un mayor número de células de *E. coli* en las cajas de cultivo (Figura 33).

Realizamos un último estudio sobre el estrés provocado en *E. coli* debido al enfriamiento súbito. Este experimento se realizó con suspensiones del microorganismo contenidas en tubos de ensaye. Nuevamente observamos que el microorganismo sufre un estrés por frío (Tabla 10).

Se observa que los tubos mantenidos 24 hrs a temperatura ambiente y sometidos a temperatura de refrigeración súbita presentan mayor número de células estresadas que las siempre mantenidas a temperatura de refrigeración. Estos estudios se realizaron por triplicado.

TEMPERATURA AMBIENTE		TEMPERATURA DE REFRIGERACIÓN	
UBICACIÓN	UFC AST	UBICACIÓN	UFC AST
Lado izquierdo	16	Lado izquierdo	208
Lado derecho	64	Lado derecho	284
Base	824	Base	4902
Fondo	68	Fondo	155
Puerta	7	Puerta	34
Techo	1	Techo	3
Total	980	Total	5586

Tabla 8. Evaluación del estrés de *E. coli* causado por la temperatura.

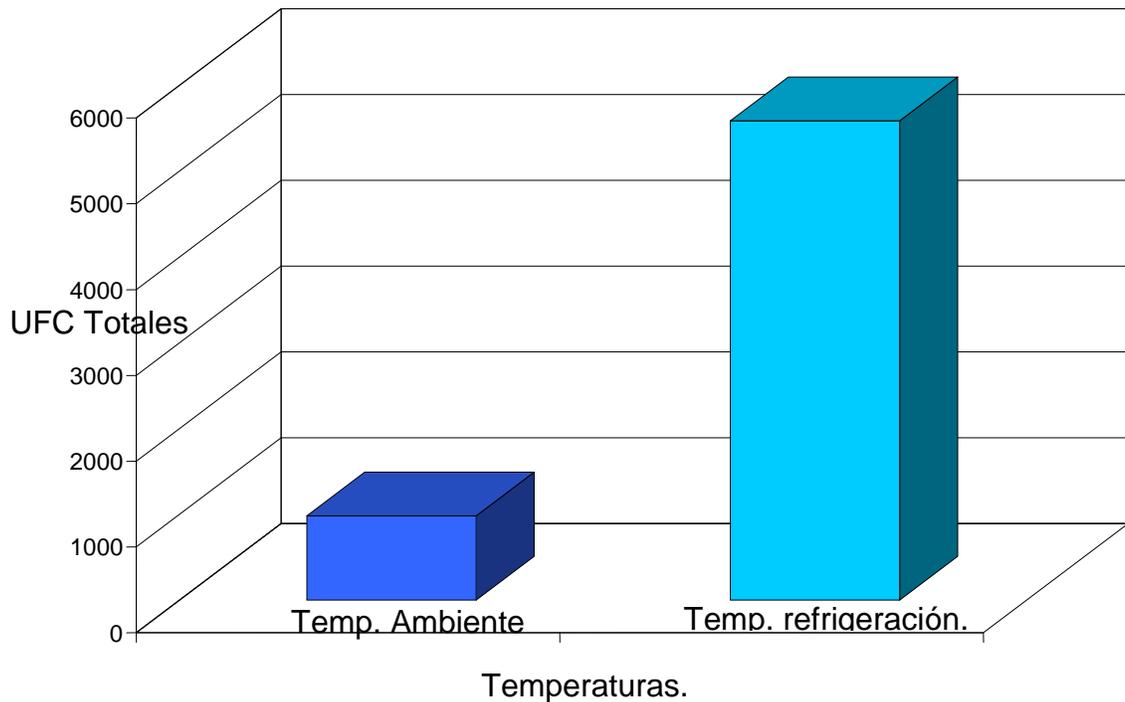


Figura 35. Comparación de recuperación de *E.coli* de aerosoles generados a partir de suspensiones almacenadas previamente a temperatura ambiente o de refrigeración.

Tiempo (h)	Almacenamiento previo a temperatura ambiente.	Almacenamiento previo en refrigeración.
0	20 ^a ±0.9 ^b	18 ±3
0.5	62 ±6.2	25 ±1.2
2	51 ±11	30 ±5.5

^a Por ciento de células estresadas

^b Desviación estándar

Tabla 9. Efecto de la temperatura de almacenamiento previa, de suspensiones de *E. coli*, sobre el estrés provocado a las células de estas suspensiones debido a un enfriamiento súbito.

Los datos de estos dos estudios revelan que *E. coli* sufre estrés debido al enfriamiento repentino. Este hecho debe de tomarse en cuenta cuando se investigue el comportamiento del microorganismo en cualquier tipo de material, como los alimentos, ya que el número de células puede estar subestimando. La posible disminución, en los primeros minutos, en el número de células o el estrés que se observe al inocular un material a partir de suspensiones de *E. coli* mantenidas a temperatura ambiente y posteriormente someter este material inoculado a refrigeración, puede ser atribuible al efecto de la refrigeración repentina y no a que el material esta provocando tal efecto sobre los microorganismos. Al realizar estudios con microorganismos a bajas temperaturas (como los que efectuamos dentro de los refrigeradores) sería adecuado almacenar previamente (entre 12 a 24 h) la población al mismo nivel temperatura con la que se trabajará.

VII. CONCLUSIONES

1. Tanto el carbón mineral como el vegetal presentan una gran capacidad de retención de microorganismos en medio acuoso.
2. La capacidad de retención del carbón va disminuyendo conforme se incrementa la cantidad de microorganismos que entran en contacto con el.
3. El carbón que no estuvo en contacto con las perlas de zeolita y que no fue manipulado, presentó 10 veces más capacidad de retención de microorganismos.
4. El nivel de saturación de un gramo de carbón de coco o mineral fue de 400 millones o 1000 millones de bacterias, respectivamente.
5. El permanganato contenido en las perlas de zeolita presentó una gran actividad antimicrobiana; el permanganato liberado por 1 g de zeolita fue suficiente para inactivar 1,000 millones de células de *E. coli* en un minuto.
6. La capacidad de retención máxima de microorganismos en suspensiones acuosas por 1 g de zeolita fue de 6 000 millones de bacterias.
7. Una vez alcanzado el máximo de retención de microorganismos, el material filtrante libera un porcentaje bajo (1-3 %) de los microorganismos retenidos inicialmente.
8. La mejor condición de flujo de aire para crear un aerosol con una concentración de microorganismos adecuada para trabajar dentro de los refrigeradores fue de 5 L/min.

- 9.** La cuantificación de microorganismos dentro del refrigerador fue posible mediante el uso de cajas expuestas con medio de cultivo.

- 10.** Durante toda la fase experimental pudimos comprobar la gran eficiencia del carbón y de la zeolita para la retención de microorganismos. Sin embargo, la disposición de los filtros dentro de los refrigeradores no permite aprovechar toda su capacidad para retener microorganismos.

- 11.** La cantidad de microorganismos utilizada en estos estudios para saturar el carbón o la zeolita con suspensiones acuosas de microorganismos, es un número que difícilmente se encontraría suspendido en el aire limpio o en el ambiente de un refrigerador, por lo que es posible que la vida del filtro sea muy larga

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Anmadpour, A. and Do, D.D., "The preparation of active carbons from coal by chemical and physical activation", Carbon, vol. 34, No.4, p.471, 1996.
2. Arthur Holmes."Geología Física". Ediciones omega; 1980 p 59-70.
3. Bansal, R.C. Donnet, J.B. and Stoeckli, F., "Active Carbon", Inc., New York, Dekker Marcel (Ed), 1988.
4. Bautista-Toledo, I. y col. "El carbón activado como adsorbente de compuestos húmicos y microorganismos en disolución acuosa", IV Reunión del Grupo Español del Carbón, p.25, 1997.
5. Blom, J.Y., Madsen, E.B., Krogh, H.V., and Wolstrup, J. 1984. Numbers of airborne bacteria and fungi in calf houses. Nord. Vet. Med. 36:215-220.
6. Chang, J.C., Ossoff, S.F., Lobe, D.C., Dorfman, M.H., Dumais, C.M., Qualls, R.G. and Johnson, J.D. 1985. UV inactivation of pathogenic and indicator microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 1985. 49: 1361-1365.
7. Chen-Guo-Tian and R. I. L. Guuthrie."Direct simulation of initial filtration phenomena within highly porous media". Metallurgical and materials transactions. Vol 26-B. June 1995.
8. Cornelius Klein, Cornelius S.Hurbert Jr.; Manual de mineralogía; Ed reverté; 4ª ed. pp.495 – 616, 1998.
9. D. Barnes (University of New South Wales, Australia) and F. Wilson (University of Canterbury, New Zealand), Chemistry and unit operations in water treatment. Applied Science. Publishers. Ltd 1984.
10. Davis, B., 1978. Tratado de Microbiología. 2ª. ed. España: Salvat editores:95.
11. De Lima, A y Gadelha, M.- 1983. Contaminación de hongos del aire atmosférico de la Ciudad de Recife (Pernambuco,Brasil). Rev. Lat. Microbiología. 25: 243-251.

12. Dubinin, M.M., "Fundamentals of the theory of adsorption in micropores of carbon adsorbents: characteristics of their adsorption properties and microporous structures", Carbon, vol.27, No.3, p.457-461, 1989.
13. Epstein W, Naono S, Gros F. 1996. Synthesis of enzymes of the lactose operon during diaux growth of *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 24:588-591.
14. Frobisher, M., 1969. Microbiología. 4ª. ed. España: Salvat editores: 658-663.
15. Hawker, L. y col., 1964. Elementos de Microbiología General. Introducción a la biología de los microorganismos. Ed. España, Acribia, 311-318.
16. Heidleberg, J.F., Shahamat, M., Levin, M., Rahman, I., Stelma, G., Grim, C, and Colwell, R.R. 1997. Effect of aerosolization on the culturability and viability of Gram Negative bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 63:3585-3588.
17. Herson, A.C. y Hulland, E.D., 1974. Conservas Alimenticias. Fundamentos Técnico-Microbiológicos. 6ª. ed. España, Acribia, 38-43.
18. Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., and Williams, S.T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th ed. W. Williams and W. ed. Wilkins, Baltimore, Md. USA.
19. Horacio C. Quiroz. Redes de aire comprimido. Compendio de información para asignatura de Mantenimiento I. Universidad Eafilt, 2003.
20. <http://www.ingenieroambiental.com/newinformes/zeolitas.pdf>. Márquez, E. y col. 2002, XXVII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria e Ambienta.
21. <http://lectura.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/55/htm/zeolita.htm>. BOSCH, P. y SCHIFTER, I., 1997. La ciencia para Todos.
22. http://www.acsmedioambiente.com/equipos/.filtros_de_carbon_activado.htm. Tecnología Delta, S.A. de C.V., 2001

23. <http://www.epa.gov/ttn/catc/dir2/zeolits2.pdf>. Clean Air Technology Center, CATC. 1999.
24. http://www.clarimex.com/misterio_car_activ.htm. Grupo Clarimex, 2001.
25. Ingraham, J. L. 1958 Growth of psychrophilic bacteria. J. bacteriol, 1977.
26. Irving, F., McMurry, T. and Herbold, J. Non-medical dispersed biological weapons countermeasures. Armstrong Lab. Occupational Environmental Health Director, Brooks Air Force Base, Texas. Technical Report AL/oe-tr 1997-0081.
27. J. A. García Rodríguez y otros. "Microbiología Clínica". Ed. Haurcourt Brace. Barcelona. 1999.
28. J.M. J.A.Y. 1973. "Microbiología Moderna de los Alimentos" Pág. 301-306.
29. Jagtoyen, M. and Derbyshire, F., "Some considerations of the origins of porosity in carbons from chemically activated wood", Carbon, vol.31, No.7, p.1185-1191, 1993.
30. Lee JH, Dobrogosz W. 1983. Effects of aerobics and anaerobics shock on catabolite repression in cyclic AMP suppressor mutants of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 154: 992-992 Magasanik B. 1961. Catabolite repression. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 26: 249-256 Meighen E. 1988. Enzymes and genes from the lux operons of bioluminescent bacteria. Ann. Rev.
31. LLabre, G. "Efecto tamiz y molecular en zeolitas naturales" Trabajo de conferencia. T. bilisi 1988 e informaciones del CIQ. 1989.
32. Marthi, B., Fieland, V.P., Walter, M, and Seidkler, R.J. 1990. Survival of bacteria during aerosolization. Appl. Environ. Microbiol. 56: 3463-3467.
33. McCleskey y Christopher. 2008 "The Effect of cold on microorganisms in relation to food" Volume 14 Issue 2, Pages 243–260.

34. McDonald, K. Curry, R. Clevenger, T. Brazos, B. Unklesbay, K. Elisenstark, A. Baker, Golden, J, and Morgan, R. 2000. The development of photosensitized pulsed and continuous ultraviolet decontamination techniques for surfaces and solutions. IIEE. Trans. Plasma Science. 28:89-96.
35. Riesenman, P.J. and Nicholson, W.L. 2000. Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide artificial and solar UV radiation. Appl. Environ. Microbiol. 66:620-626.
36. Robert P. Straka and J L. Stokes. 1960. "Psychrophilic bacteria from Antarctica."
37. Royer Stanier y otros. "Microbiología" Ed. Reverté. Barcelona. 1996.
38. St. Germain, G., and Summerbell, R. 1996. Identifying filamentous fungi. A. clinical laboratory handbook. Star. Belmon. Ed. Ca. USA.
39. Sutton, D.A., Fothergill, M.A, and Rinald, M.G. 1998. A guide to clinically significant fungi. W. Williams and W. Wilkins, Baltimore, U.S.A.
40. Winkelman J, Clark D. 1986. Anaerobically induced genes of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 167: 362-367.
41. Zinsser. 1971. Microbiología De Zinsser. 4ª. Ed, México: Hispano-Americana: 226-227, 769-776.