

**Evaluación de una nueva tecnología para la
generación de ozono en la reducción de
Escherichia coli productora de la toxina Shiga
(STEC) y *Salmonella* en canales de res**

Carolin Alondra Brito Santos

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2020

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Evaluación de una nueva tecnología para la
generación de ozono en la reducción de
Escherichia coli productora de la toxina Shiga
(STEC) y *Salmonella* en canales de res**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Carolin Alondra Brito Santos

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2020

Evaluación de una nueva tecnología para la generación de ozono en la reducción de *Escherichia coli* productora de la toxina Shiga (STEC) y *Salmonella* en canales de res

Carolin Alondra Brito Santos

Resumen. La industria cárnica continuamente busca alternativas para eliminar la presencia de patógenos en las canales de res. Los objetivos de este estudio fueron determinar la efectividad de una intervención basada en la generación de ozono en cortes de res, y el mejor tiempo y método de aplicación de ozono en muestras de carne de res para la reducción de *Escherichia coli* productora de las toxinas Shiga (STEC) y *Salmonella*. Se inocularon los trozos de carne con cocteles de STEC y *Salmonella*. Los tratamientos se aplicaron por dos métodos: Inmersión y Aspersión con cinco tiempos de aplicación (0, 5, 10, 15, 20 s), y con tiempos de exposición a las 0 y 24 horas. Se evidenció una reducción en STEC a las 24 h de 0.93 Log₁₀ UFC/cm² (aspersión) y 0.27 Log₁₀ UFC/cm² (inmersión). En *Salmonella* a las 24 h se redujo 0.84 Log₁₀ UFC/cm² (aspersión) y 0.19 Log₁₀ UFC/cm² (inmersión). El método de aspersión controló STEC disminuyendo 0.93 logaritmos y *Salmonella* disminuyendo 0.84 logaritmos en condiciones de almacenamiento de 4 - 7 °C durante 24 h. El mejor tiempo de aplicación fue a los 5 segundos, luego de este no se demostraron mejoras en los resultados. La aplicación tiene un mayor efecto a las 24 horas de exposición en ambiente de refrigeración. Se requiere evaluar sinergia entre una intervención con ozono utilizando agua caliente y ácido láctico que es comúnmente utilizada en la industria.

Palabras clave: Antimicrobiano, aspersión, inmersión, reducción de patógenos.

Abstract. The meat industry is continuously looking for alternatives to eliminate the presence of pathogens in beef carcasses. The aims of this study were to determine the effectiveness of a novel ozone-generation intervention in beef cuts, as well as the best time and method of application of ozone in beef samples for the reduction of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) and *Salmonella*. The pieces of meat were inoculated with STEC and *Salmonella* cocktails. There were two methods of application for the treatments: Immersion and Spray. Both treatments took place in five application times (0, 5, 10, 15, 20s), with exposure times at 0 and 24 hours. Reductions of STEC at 24 h of 0.93 Log₁₀ CFU/cm² (spray) and 0.27 Log₁₀ CFU/cm² (immersion) were observed. There was a reduction of *Salmonella* at 24 h of 0.84 Log₁₀ CFU/cm² (spray) and 0.19 Log₁₀ CFU/cm² (immersion). The spray method caused a decline in STEC of 0.93 logarithms, and a decline in *Salmonella* of 0.84 logarithms under storage conditions of 4 - 7 °C for 24 hours. The best application time was at 5 seconds, and beyond this time, the results indicated no further improvement. The application has a greater effect at 24 hours of exposure in a cooling environment. For future studies, consider an evaluation of the synergy between an intervention with ozone, while using hot water and lactic acid.

Key words: Antimicrobial, immersion, pathogen reduction, spray.

ÍNDICE GENERAL

Portadilla.....	i
Página de firmas	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros y Anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
4. CONCLUSIONES	11
5. RECOMENDACIONES.....	12
6. LITERATURA CITADA.....	13
7. ANEXOS.....	16

ÍNDICE DE CUADROS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Cepas de <i>Escherichia coli</i> (STEC) productoras de la toxina Shiga	3
2. Cepas de <i>Salmonella</i>	4
3. Conteos de <i>Escherichia coli</i> (STEC) antes y después de la intervención con ozono a las 0 horas (Log_{10} UFC/cm ²).....	6
4. Conteos de <i>Escherichia coli</i> (STEC) antes y después de la intervención con ozono en almacenamiento de 4-7 °C durante 24 h (Log_{10} UFC/cm ²).....	7
5. Conteos de <i>Salmonella</i> antes y después de la intervención con ozono a las 0 horas (Log_{10} UFC/cm ²)	8
6. Conteos de <i>Salmonella</i> antes y después de la intervención con ozono en almacenamiento de 4-7 ° C durante 24 h (Log_{10} UFC/cm ²).....	8

Anexos	Página
1. Gráfico de <i>Escherichia coli</i> (STEC) a las 0 horas (Log_{10} UFC/cm ²).....	16
2. Gráfico de <i>Escherichia coli</i> (STEC) a las 24 horas (Log_{10} UFC/cm ²).	16
3. Gráfico de <i>Salmonella</i> a las 0 horas (Log_{10} UFC/cm ²).....	16
4. Gráfico de <i>Salmonella</i> a las 24 horas (Log_{10} UFC/cm ²).....	17
5. Distribución de <i>Escherichia coli</i> (STEC) entre (Log_{10} UFC/cm ²).....	17
6. Distribución de <i>Salmonella</i> (Log_{10} UFC/cm ²)	18
7. Distribución de <i>Escherichia coli</i> (STEC) entre tiempos de aplicación (Log_{10} UFC/cm ²).	19
8. Distribución de <i>Salmonella</i> entre tiempos de aplicación (Log_{10} UFC/cm ²).	19

1. INTRODUCCIÓN

La industria alimentaria se ve afectada por las Enfermedades Transmitidas por los Alimentos (ETA) y su efecto en los consumidores. Es la razón por la cual, a través del tiempo ha estado buscando respuestas para reducir los riesgos de producir alimentos contaminados, busca garantizar la seguridad en sus productos y de igual manera ser eficiente en sus procesos haciendo un buen uso de sus recursos.

En los Estados Unidos, las enfermedades transmitidas por los alimentos causan alrededor de 3000 muertes cada año (CDC 2011). Existen distintas enfermedades asociadas a los alimentos cárnicos, entre las que son de interés para la industria y los reguladores incluyen las enfermedades causadas por la presencia de *Salmonella* y el grupo de *Escherichia coli* productores de la toxina siga (STEC, que incluyen O157: H7, O26, O103, O45, O111, O121 y O145).

El término *Escherichia coli*, productor de la toxina Shiga (STEC) abarca un grupo de patógenos alimentarios emergentes, que se han visto relacionados en numerosos brotes a nivel mundial. Siendo responsables de infecciones y enfermedades gastrointestinales graves tales como el síndrome urémico hemolítico (SUH) y la colitis hemorrágica (CH). Dentro de los alimentos que han sido vinculados a estos brotes, se pueden destacar las carnes y derivados cárnicos crudos o que no han sido cocidos lo suficiente al momento del consumo (Rípodas Navarro *et al.* 2017).

La *Salmonella* es uno de los patógenos transmitidos por los alimentos más comunes en los Estados Unidos y a nivel global, y causa más de 1 millón de enfermedades por año (Scallan *et al.* 2011). En los últimos años los brotes de enfermedades producidas por *Salmonella* han sido vinculados a la contaminación de pepinos, pollo, huevos, pistachos, atún crudo, germinados, carne molida y muchos otros alimentos. Los síntomas de infección generalmente aparecen entre 6 horas y 6 días después de comer un alimento contaminado, pero pueden demorarse mucho más. Estos síntomas incluyen diarrea, fiebre y cólicos estomacales. En la mayoría de los casos, la enfermedad dura de 4 a 7 días y las personas se recuperan sin tratamiento con antibióticos (NCEZID 2020).

En la industria se han implementado una serie de programas de inocuidad y buenas prácticas para minimizar la contaminación de la carne durante la faena. Sin embargo, aun con buenas prácticas e higiene, se puede contaminar canales inadvertidamente y la presencia de patógenos puede hacer que el producto se declare adulterado, en el caso de las STECs en carne no intacta de res. Es por esto que la industria aplica una serie de intervenciones para reducir los microorganismos de las canales, entre tales tratamientos se incluyen: el recorte de las superficies contaminadas, aspiradora de vapor, lavado; enjuague con agua caliente, lavados con ácidos orgánicos y pasteurización al vapor. También se ha demostrado que el proceso de enfriamiento en seco y almacenamiento refrigerado de canales de carne de vacuno causa una disminución en el número de bacterias supervivientes (Ingham 2003).

El ozono (O₃) es una forma alotrópica de oxígeno (O₂), siendo un potente oxidante presente en la atmósfera y es producido comercialmente por máquinas ozonizadoras simples. Es un poderoso agente antimicrobiano en sus formas gaseosas y acuosas. El ozono se disuelve fácilmente en agua y conserva su propiedad antimicrobiana incluso en estado disuelto (Sadatullah *et al.* 2012).

El ozono tiene la capacidad de oxidar la materia orgánica y destruir componentes de membrana en ciertos microorganismos (bacterias, hongos, virus y parásitos) causando su inactivación y cambios en el ADN. Los resultados de una prueba de citotoxicidad revelaron que el tratamiento del ozono podría degradar la estructura del ADN; sin embargo, la degradación celular y los productos de toxicidad existían en diferentes tiempos de tratamiento del ozono.

El análisis metabólico indicó que los productos de degradación de los ADN tratados con ozono debilitaron el trastorno metabólico inducido por el ADN, como el metabolismo de los nucleótidos relacionados con la purina; el metabolismo de Krebs y la formación de energía relacionado con el ciclo; y el metabolismo de lípidos, alcaloides y aminoácidos (Xu *et al.* 2019). Lo anterior implica que el ozono tiene la capacidad de desnaturalizar proteínas y ADN. El ozono interfiere e interrumpe el metabolismo de las células bacterianas, a través de la inhibición y bloqueo del funcionamiento metabólico del sistema de control enzimático.

La mayoría de las empresas procesadoras de res que están considerando modificaciones en sus prácticas de saneamiento están evaluando la posibilidad de incluir el ozono; utilizando esta tecnología como un paso adicional/intervención final, o como parte del saneamiento de las superficies de contacto con los alimentos. Un reciente análisis de costos de un sistema móvil de saneamiento de la superficie de ozono realizado por una instalación de procesamiento de alimentos mostró que el procesador redujo el proceso de saneamiento de la superficie de cuatro a dos pasos, reduciendo así el uso diario de agua para el proceso de saneamiento de 15,000 a 6,000 galones.

Para contribuir con los esfuerzos de la industria cárnica en su búsqueda de nuevas alternativas para intervención en canales para eliminar la presencia de patógenos, se diseñó este proyecto para evaluar la aplicación de una intervención con ozono además de las intervenciones existentes como la aplicación de agua y ácido láctico. Los objetivos de este estudio fueron:

- Validar la efectividad de una intervención a base de ozono como agente antimicrobiano para la reducción de STECs y *Salmonella* spp. en cortes de canales de res.
- Determinar el mejor tiempo y método de aplicación de ozono en muestras de carne de res para la reducción de *Escherichia coli* productora de las toxinas Shiga (STEC) y *Salmonella*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del estudio

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de microbiología ubicado en el edificio de ciencias experimentales en “Texas Tech University”, el muestreo se realizó entre los meses de enero y febrero del 2020.

Selección de muestras

Las muestras de la canal fueron proporcionadas por una planta cárnica ubicada en Texas, Estados Unidos interesada en colaborar en el proyecto. Las muestras se seleccionaron aleatoriamente utilizando trozos de carne cortados a una dimensión de $2 \times 2 \times 2$ cm.

Preparación del inóculo

Los cultivos se seleccionaron de un congelador a -80 °C del banco de sepas del ICFIE donde se mantienen almacenados para preservar su viabilidad. Siete aislados de *Escherichia coli* (STEC) que producen la toxina Shiga y tres cepas de *Salmonella*, se utilizaron para validar la efectividad de la intervención. La información de los aislados y su descripción se muestran en los Cuadros 1 y 2.

Cuadro 1. Cepas de *Escherichia coli* (STEC) productoras de la toxina Shiga.

STEC Serogrupo	Código	Shiga toxina	Fuente	
O26	ECRC	0.1302	+	Bovino
O103	ECRC	97.1377	+	Bovino
O45	ECRC	2.1064	-	Bovino
O111	ECRC	3.1009	+	Bovino
O121	ECRC	3.1064	-	Humano
O145	ECRC	9.0538	+	Carne de res molida
O157:H7	ATCC	51657	+	Bovino

Cuadro 2. Cepas de *Salmonella*.

Patógeno	Serotipo	Código	Fuente
<i>Salmonella</i>	Typhimurium	BAA712	Humanos
<i>Salmonella</i>	Newport	ATCC 6962	Humanos
<i>Salmonella</i>	Enteritidis	ATCC 31194	Humanos

La siembra de las cepas de STEC se realizó en el medio de cultivo agar MacConkey, y la cuantificación de *Salmonella* se realizó en agar Xylosa Lisina Tergitol 4 (XLT4). Los aislados de STEC y *Salmonella* fueron sembrados por estría antes del inicio del estudio para confirmar el crecimiento típico en los medios MacConkey y XLT4. Se transfirió por separado una colonia aislada de cada cepa con un asa de inoculación a 3 mL de BHI (caldo de infusión de cerebro y corazón) y se incubó a 37 °C durante 24 horas. Al culminar las 24 horas, se transfirió 100 µL de cada cultivo enriquecido a tubos BHI de 3 mL y se incubó a 37 °C durante 24 h. El cóctel de *Salmonella* se hizo añadiendo 2 mL de cada cultivo enriquecido de *Salmonella* en un tubo estéril, el cóctel STEC se hizo añadiendo 1 mL de cada cultivo STEC enriquecido en un tubo estéril.

Inoculación del producto

Se diluyó el cóctel dos veces (10^{-2}) colocando 1 mL de cóctel en 9 mL de agua de peptona buferada (BPW), a continuación, se tomó 100 µL del coctel diluído (10^{-2}) y se inoculó un lado de una pieza de $2 \times 2 \times 2$ cm de carne de res repitiendo el proceso por triplicado por cada punto de muestreo. Luego de la inoculación, se permitió que los cubos de carne reposaran durante 5 minutos para asegurar la adherencia de las células. Se inocularon 122 trozos de carne en la primera repetición utilizando los 2 cócteles enriquecidos de *Salmonella* y STEC con distintos métodos de aplicación (Inmersión y Aspersión), 5 tratamientos basados en tiempos de exposición (0, 5, 10, 15, 20s), tres réplicas y 2 controles para observar el crecimiento de la bacteria en el coctel, siendo un total de 366 trozos de carne al final del experimento.

Para la generación de ozono se utilizó la tecnología Biosafe® por “BioSecurity technology”, esta tecnología patentada está aprobada por la FDA, USDA y EPA para la aplicación directa en alimentos y puede ayudar a crear una nueva estrategia de limpieza reduciendo el consumo de productos químicos agresivos. Los medidores ORP “Oxidation Reduction Potential”, en español potencial de reducción de oxidación, van ubicados al lado de los sistemas para asegurar el rendimiento del sistema de 650 mV.

Antes de aplicar el tratamiento con ozono se midió la concentración de ozono en la solución y el ORP en el agua ozonada obteniendo 2.1 ppm como concentración de ozono y 880 mV como potencial de reducción oxidativo (valores mayores a 650 mV se consideran más efectivos). Los tratamientos se aplicaron por dos métodos: Inmersión y Aspersión y cinco tiempos de exposición (0, 5, 10, 15, 20s).

El tratamiento de aspersión se realizó a una distancia de 10.16 cm con un ángulo de 45 grados desde la superficie de la carne con presión de la boquilla de 3.785 L/min abarcando toda la superficie. En el tratamiento para el método de inmersión se aplicó por 5 segundos, se mantuvo un

flujo constante evitando la volatilización del ozono. Se utilizó un vaso de precipitación de boca ancha con capacidad de 1000 mL en dónde se introdujeron los trozos de carne inoculados, siempre se mantuvo las medidas asépticas, haciendo cambio de pinzas y del agua ozonada en cada tratamiento. Los recuentos microbiológicos se realizaron a las 0 y 24 h después de la aplicación de los tratamientos. Los trozos de carne inoculados y tratados que fueron analizados a las 24 h se almacenaron en refrigeración con una temperatura entre 3 - 7 °C.

Análisis microbiológico

Al final de los tratamientos, los trozos de carne tratados se colocaron en una bolsa de 710 mL. Se añadieron un total de 25 mL de BPW a las bolsas y se homogeneizaron en un Stomacher a 230 RPM durante 1 minuto. La muestra homogenizada se diluyó en serie y se plateó siguiendo el método de dilución por gota. Se realizaron y sembraron distintas diluciones: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} para los tratamientos y los controles con diluciones de: 10^{-7} , 10^{-8} , y 10^{-9} . Se realizaron triplicados de cada dilución, resultando 9 gotas en cada plato con una micropipeta de 10 μ L. Esta técnica es una mezcla de componentes microbiológicos y componentes de diseño, el DP tiene una versión en miniatura del método del método de propagación (SP). En las placas se colocaron 14 mL de agar de soja tríptico (TSA) antes del plateado para evitar tener células dañadas pero viables, las colonias fueron contadas y las cuentas transformadas para registrar UFC/cm². Se utilizó un rango contable de 2 - 25 colonias, se tomó un promedio de las nueve observaciones dentro de cada tratamiento, tres repeticiones técnicas y tres repeticiones biológicas. Se obtuvieron las UFC/mL al multiplicar el promedio por la dilución, luego se multiplica por los 25 mL agregados a la bolsa donde se sumergieron los trozos de carne y dividido entre cuatro porque solo se inoculó la superficie de la carne obteniendo UFC/cm² que luego sería reportado en Log₁₀. (Promedio \times dilución= UFC/mL), (UFC/mL \times 25 = UFC/4cm²), (UFC/4cm² \div 4= UFC/cm²), (Log₁₀ UFC/cm²).

Diseño experimental

Se usó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial de dos factores con dos y cinco niveles respectivamente, método de aplicación (aspersión e inmersión) y tiempo de exposición (0, 5, 10, 15, 20 segundos) con medidas repetidas en el tiempo (0, 24 h). El experimento se repitió tres veces y se utilizó el paquete estadístico R v3.3.4 para realizar un ANOVA comparando los diferentes tratamientos. Se consideraron diferencias significativas en un nivel alfa de $P < 0.05$. Las diferencias significativas encontradas, se evaluaron con pruebas T por pares con ajuste de Bonferroni. Los resultados fueron expresados en logaritmo de unidades formadores de colonias (Log₁₀ UFC/mL) antes de analizarlos como una mejor escala para presentar los datos y graficarlos (Saini *et al.* 2011).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se inició con un inóculo de $\sim 5.58 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$ aproximadamente. En el cuadro 3 se muestran los recuentos después de los tratamientos aspersión e inmersión. A las 0 horas de aplicación, con el método de aspersión desde 0 segundos o ausencia de tratamiento hasta 20 segundos se observó una reducción de los niveles de bacterias de STEC de aproximadamente $0.64 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$ mientras que con método de inmersión se redujo $0.24 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$. Después del tratamiento con 5 segundos no se observó reducciones subsecuentes en el resultado. Kalchayanand y colaboradores en el 2019 al realizar una aplicación con ozono acuoso como intervención de enfriamiento por pulverización contra *Escherichia coli* O157: H7 sobre superficies de carne fresca obtuvieron una reducción de aproximadamente $0.5 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$. Se comparó entre tiempos de aplicación y se observaron diferencias significativas ($P = 2.499 \times 10^{-05}$) entre los métodos de aplicación no se observaron diferencias significativas ($P = 0.08342$) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Conteos del coctel de *Escherichia coli* (STEC) antes y después de la intervención con ozono a las 0 horas ($\text{Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$).

Tratamiento	0-horas ($\text{Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2 \pm \text{DE}$)	
	Aspersión	Inmersión
0 segundos	5.61 ± 0.06^{Ax}	5.56 ± 0.04^{Ax}
5 segundos	4.84 ± 0.16^{Bx}	5.29 ± 0.08^{Ax}
10 segundos	4.85 ± 0.10^{Bx}	5.30 ± 0.08^{Ax}
15 segundos	4.98 ± 0.10^{ABx}	5.21 ± 0.07^{Ax}
20 segundos	4.97 ± 0.16^{Bx}	5.32 ± 0.08^{Ax}

^{AB} letras diferentes dentro de la misma columna representan diferencia estadística ($P < 0.05$) entre los tiempos de cada tratamiento

^x letras iguales dentro de la misma fila no representan diferencia estadística ($P > 0.05$) entre los métodos de tratamiento

¹D.E. Desviación Estándar

En el Cuadro 4 se puede observar el efecto de la temperatura de almacenamiento, entre $4 - 7^\circ \text{C}$ aproximadamente. A las 24 horas de aplicación, el inóculo fue aproximadamente de $5.33 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$ con el método de aspersión desde 0 segundos o ausencia de tratamiento hasta 20 segundos se observó una reducción de los niveles de bacterias de STEC aplicadas de aproximadamente $0.93 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$, mientras que con método de inmersión se redujo $0.27 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$. Recuentos similares a los obtenidos se observaron en otros estudios donde se evaluó la aplicación de ozono en canales de res donde los niveles de bacterias luego del almacenaje en enfriamiento fueron de $0.99 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$ (Kalchayanand *et al.* 2019). Al comparar entre los tiempos de aplicación se observaron diferencias significativas (3.868×10^{-14}) entre los 0 segundos, comparados con los 5, 10, 15 y 20 segundos de aplicación. Entre métodos de aplicación se observaron diferencias significativas ($P = 0.0002082$) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Conteos de *Escherichia coli* (STEC) antes y después de la intervención con ozono en almacenamiento de 4-7 ° C durante 24 h (Log_{10} UFC/cm²).

Tratamiento	24-horas (Log_{10} UFC/cm ² ± DE)	
	Aspersión	Inmersión
0 segundos	5.33 ± 0.06 ^{Ax}	5.31 ± 0.10 ^{Ax}
5 segundos	4.47 ± 0.22 ^{By}	5.18 ± 0.04 ^{Ax}
10 segundos	4.34 ± 0.09 ^{By}	5.23 ± 0.06 ^{Ax}
15 segundos	4.60 ± 0.07 ^{By}	5.21 ± 0.03 ^{Ax}
20 segundos	4.39 ± 0.12 ^{By}	5.14 ± 0.06 ^{Ax}

^{AB} letras diferentes dentro de la misma columna representan diferencia estadística ($P < 0.05$) entre los tiempos de cada tratamiento

^{xy} letras diferentes dentro de la misma fila representan diferencia estadística ($P < 0.05$) entre los métodos de tratamiento

¹D.E. Desviación Estándar

Al realizar dichos experimentos se observó una mayor reducción de los niveles de las bacterias de STEC inoculadas a las 24 horas, éste sería el tiempo que tardan las canales en refrigeración, el proceso de refrigeración tiene un efecto de reducción adicional. Al comparar los 0 segundos de aplicación en ambos tiempos de aplicación, a las 0 horas se reportó $5.61 \pm 0.06 \text{Log}_{10}$ UFC/cm² mientras que a las 24 horas se reportó $5.33 \pm 0.06 \text{Log}_{10}$ UFC/cm² teniendo una reducción de aproximadamente 0.28Log_{10} UFC/cm² con el método de aspersión. Con el método de inmersión a los 0 segundos de aplicación se reportó $5.56 \pm 0.04 \text{Log}_{10}$ UFC/cm² a las 0 horas mientras que a las 24 horas se reportó $5.31 \pm 0.10 \text{Log}_{10}$ UFC/cm² demostrando una reducción de 0.19Log_{10} UFC/cm² esto significa que, aunque el período de refrigeración influyó en que existiera una mayor reducción, la aplicación de ozono también fue responsable de dicha disminución.

Según los resultados obtenidos a los 5 segundos se tuvo una mayor disminución con respecto a 0 segundos de tratamientos. En otros estudios similares en canales de res a las 24 horas de exposición se produjo una disminución de 0.7 y 2.0 ciclos Log_{10} en *E. coli*, con tiempos de exposición más cortos (3 h) la concentración de ozono probada en temperaturas (0 – 4 °C) fue de 0.6–1.0 Log_{10} ciclos los recuentos de *E. coli* (Coll *et al.* 2011).

En el cuadro 5 se muestran los recuentos después de los tratamientos aspersión e inmersión. Se inició con un inóculo de 5.39Log_{10} UFC/cm² aproximadamente. A las 0 horas de aplicación, con el método de inmersión desde 0 segundos hasta 20 segundos los niveles de *Salmonella* se redujeron unos 0.32Log_{10} UFC/cm² mientras que con el método de aspersión se observó una reducción de aproximadamente 0.48Log_{10} UFC/cm². Castillo y colaboradores en el 2003 demostraron que una aplicación de ozono para reducir *Salmonella* Typhimurium redujo 0.7Log_{10} UFC/cm² siendo mayor la reducción de los niveles de la bacteria con agua ozonada que aplicando agua sin ozono. Al comparar entre tiempos y métodos de aplicación no se observaron diferencias significativas ($P = 0.6833$) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Conteos de *Salmonella* antes y después de la intervención con ozono a las 0 horas (Log_{10} UFC/cm²).

Tratamiento	0-hora (Log_{10} UFC/cm ² ± DE)	
	Aspersión	Inmersión
0 segundos	5.18 ± 0.12 ^{Ax}	5.34 ± 0.15 ^{Ax}
5 segundos	4.46 ± 0.22 ^{Ax}	5.09 ± 0.15 ^{Ax}
10 segundos	4.63 ± 0.15 ^{Ax}	5.06 ± 0.15 ^{Ax}
15 segundos	4.66 ± 0.20 ^{Ax}	5.04 ± 0.13 ^{Ax}
20 segundos	4.68 ± 0.15 ^{Ax}	5.03 ± 0.14 ^{Ax}

^{AB} letras diferentes dentro de la misma columna representan diferencia estadística ($P < 0.05$) entre los tiempos de cada tratamiento

^x letras iguales dentro de la misma fila no representan diferencia estadística ($P > 0.05$) entre los métodos de tratamiento

¹D.E. Desviación Estándar

En el Cuadro 6 se podrá observar el efecto del combinado con temperatura de almacenamiento, se almacenó entre 4 - 7 °C aproximadamente. A las 24 horas de aplicación, el inóculo fue aproximadamente de 5.26 Log_{10} UFC/cm². Al comparar el método de aspersión se observó una reducción de los niveles de *Salmonella* aplicadas de aproximadamente 0.84 Log_{10} UFC/cm² mientras que con el método de inmersión se redujo 0.19 Log_{10} UFC/cm². En otros estudios, se ha determinado que un tratamiento con concentraciones de 0.3 - 2.3 ppm de ozono en el agua redujo los niveles de bacteria en la superficie de la canal en 1.30 Log_{10} UFC/cm² (Reagan *et al.* 1996). Al comparar entre métodos de aplicación y entre los tiempos de aplicación se observaron diferencias significativas ($P = 0.0008247$) entre tiempos de aplicación se observaron diferencias significativas ($P = 2.485 \times 10^{-12}$) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Conteos de *Salmonella* antes y después de la intervención con ozono en almacenamiento de 4-7 °C durante 24 h (Log_{10} UFC/cm²).

Tratamiento	24-hora (Log_{10} UFC/cm ² ± DE)	
	Aspersión	Inmersión
0 segundos	5.15 ± 0.09 ^{Ax}	5.13 ± 0.15 ^{Ax}
5 segundos	4.37 ± 0.14 ^{By}	4.92 ± 0.17 ^{Ax}
10 segundos	4.30 ± 0.11 ^{By}	4.93 ± 0.20 ^{Ax}
15 segundos	4.23 ± 0.17 ^{By}	4.98 ± 0.16 ^{Ax}
20 segundos	4.23 ± 0.17 ^{By}	5.11 ± 0.18 ^{Ax}

^{AB} letras diferentes dentro de la misma columna representan diferencia estadística ($P < 0.05$) entre los tiempos de cada tratamiento

^{xy} letras diferentes dentro de la misma fila representan diferencia estadística ($P < 0.05$) entre los métodos de tratamiento

¹D.E. Desviación Estándar

Para un mayor efecto del ozono en la superficie de las canales de res se recomienda realizar la aplicación con el método de aspersión, debido a que aparenta tener un efecto físico que aumenta la

reducción de la bacteria objetivo. En este estudio se observó una mayor reducción con el método de aspersión a las 24 horas de exposición, se observó en todas las aplicaciones cuando se compara con los 10 segundos de aplicación no se presentaban mejoras en los resultados.

Según Arayan y colaboradores en el 2017, la eficiencia del ozono como antimicrobiano en superficies ha sido documentada en distintos patógenos, entre ellos: *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium*, *Enterococcus hirae*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* con un criterio de reducción de $\geq 5 \text{ Log}_{10}$. Comparándolo con los resultados obtenidos en esta intervención se notó un criterio de reducción de aproximadamente 1 Log_{10} , el cual puede haber sido afectado por la reacción del ozono con la materia orgánica. Se logró esa reducción de $\geq 5 \text{ Log}_{10}$ con 3 ppm de ozono después de 30 segundos de contacto en superficies (Arayan *et al.* 2017). Se han reportado reducciones logarítmicas más bajas, de 2.5 en tejido de carne a un nivel de ozono de 0.5% siendo diferentes magnitudes de tasa de reducción que van desde 3.0 a 4.0 Log_{10} (Baskaran *et al.* 2012).

La pureza y el pH del agua afectan en gran medida la tasa de solubilización del ozono, el gas ozono se disuelve más rápidamente en agua desionizada y destilada que en agua del grifo. La materia orgánica contenida en el agua del grifo consume ozono y los minerales catalizan la descomposición del ozono. Si aumenta la pureza del agua, aumenta la solubilidad del ozono. La gran solubilidad del ozono en agua permite su reacción inmediata con los compuestos solubles y biomoléculas presentes en los fluidos biológicos. Un estudio realizado demostró que el tratamiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas con una mezcla de O_2 y O_3 puede matar las bacterias sin generar resistencia a los antimicrobianos (Giuliani *et al.* 2018).

El ozono es inestable en soluciones acuosas, se degrada continuamente a oxígeno. El pH afecta en gran medida la estabilidad del ozono en soluciones acuosas, se demostró que la estabilidad del ozono en solución era máxima cuando el pH era 5.0. La estabilidad del ozono disminuyó a medida que aumentaba el pH, indicando que el pH alto y la presencia de materiales que demandan ozono mejoran la descomposición del ozono y pueden afectar su capacidad antimicrobiana (Kim *et al.* 1999).

La tasa de destrucción de microorganismos por un desinfectante generalmente aumenta con el aumento de la temperatura. En el caso del ozono, sin embargo, a medida que aumenta la temperatura, el ozono se vuelve menos soluble y menos estable, pero la velocidad de reacción del ozono con el sustrato aumenta. A medida que la temperatura aumentó de 0 a 30 °C, aumentó la tasa de inactivación de los quistes de *Giardia*. Sin embargo, se informó que cuando las bacterias se trataron con ozono a una temperatura de 0 a 30 °C, la temperatura del tratamiento no tuvo prácticamente ningún efecto sobre la tasa de desinfección. Giuliani y colaboradores en el 2018 relacionaron esta observación con la disminución de la solubilidad y el aumento de la descomposición y reactividad del ozono a medida que aumenta la temperatura. La presencia de sustancias orgánicas como la superficie del músculo, con alta demanda de ozono puede competir con los microorganismos por el ozono. A medida que las moléculas de ozono entran en contacto con la pared celular, se produce una reacción llamada explosión oxidativa que literalmente crea un pequeño agujero en la pared celular. La bacteria comienza a perder su forma mientras las moléculas de ozono continúan creando agujeros en la pared celular. Después de miles de colisiones de ozono durante solo unos segundos, la pared bacteriana ya no puede mantener su forma y la célula muere (Giuliani *et al.* 2018).

Se ha demostrado que la concentración de ozono para su aplicación en alimentos, en este caso espinaca, no es significativa al momento de evaluar el efecto antimicrobiano. Un estudio preliminar *in vivo* mostró una reducción de 1 Log₁₀ en seis cepas de *E. coli* y dos especies de *Listeria* spp. en espinacas expuestas a 1 ppm de ozono durante 10 min. Mientras que una mayor concentración de ozono con menor duración (10 ppm por 2 min) redujo significativamente *E. coli* y *Listeria* spp. (1 Log₁₀). Los impactos de los tratamientos de ozono de 1 y 10 ppm no fueron significativamente diferentes (Wani *et al.* 2015).

En otro estudio, los tratamientos con agua ozonizada mejoran la calidad y extienden la vida útil tanto en reses como en la carne de pollo. Se demostró que al poner un filete de pollo en contacto con agua ozonizada a 0.38 mg /L de concentración de ozono durante 120 minutos a 3 °C, reduce las bacterias mesófilas aerobias en 1 unidad de Log₁₀ UFC/g. Concentraciones de ozono de 0.21 y 0.38 fueron capaces de desinfectar bacterias mesofílicas aerobias totales en 0.42 y 0.89 Log₁₀ UFC /g respectivamente (Fathul y Wajdi 2018).

Un estudio realizado por Karamah y colaboradores en el 2019 con atún demuestra que al ponerlo en contacto con agua ozonizada durante 120 minutos y con una dosis 0.3 mg/L de ozono a una temperatura de 25 °C se reduce 1.06 Log₁₀ UFC/g de bacterias mesófilas aeróbicas, logrando eliminar bacterias hasta 66.7%, en carne tratada con 2.3 mg/L de ozono acuoso se observaron reducciones de solo 1.3 Log₁₀ μ/g (Reagan *et al.* 1996). Al aplicar agua ozonizada sobre carne de mejillón tratada con 1 mg/L de ozono acuoso a 90 minutos de proceso de tratamiento de ozonización, la reducción en el recuento total fue de 0.7 Log₁₀ UFC/g se logró mediante ozonización (día 0 de almacenamiento) (Manousaridis *et al.* 2005).

El efecto combinado de tratamientos de ozono y calor en jugo de manzana para la inactivación de *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes* redujo en 1.50 y 1.60 Log₁₀ UFC/mL, respectivamente, con una concentración de 2.0-3.0 g/m³ durante 1 minuto, a 25 y 45 °C, y por debajo del límite de detección (1 Log₁₀ UFC/mL) a 50 y 55 °C. Se encontró un efecto sinérgico en la inactivación de patógenos en el jugo de manzana tratado con ozono y calentado a 50 °C (Sung *et al.* 2014).

Hay muchos estudios que indican que el efecto de una sola intervención no es suficiente para poder mitigar el riesgo de manera adecuada y asegurar la inocuidad de alimentos de nuestro producto, en este caso, la canal de res. El efecto físico del método utilizado con mejores resultados (aspersión) colaboró en la reducción de los patógenos evaluados. El agua caliente, ácido láctico entre 2-5%, ácido peroxiacético, ozono, agua, cambios de temperatura y recorte de canal son intervenciones específicas a las áreas de mayores riesgos con alta concentración de bacterias, se hace desinfección en las patas con agua hirviendo y al cuello con ácido láctico. El ozono también está aprobado para su uso en los EU en productos cárnicos y avícolas de acuerdo con los estándares actuales de buenas prácticas de fabricación de la industria (21 CFR 173.368; FDA, 2013).

4. CONCLUSIONES

- La intervención química con Ozono (O_3) en cortes de canales de res redujo aproximadamente 1 Log_{10} , y tiene un mayor efecto a las 24 horas de exposición en ambiente de refrigeración, pero su efectividad parece estar limitada debido a la rápida reacción con la materia orgánica de la superficie de las muestras de carne.
- El método de aspersión presentó los mejores resultados, controlando *Escherichia coli* (STEC) disminuyéndola 0.93 logaritmos y a *Salmonella* 0.84 logaritmos en condiciones de almacenamiento de 4 - 7 °C durante 24 h, pero puede haber sido influenciada por la posibilidad de remoción física de las bacterias de la superficie. Después de 5 segundos luego de la aplicación, no se demostraron mejoras adicionales en la reducción de patógenos.

5. RECOMENDACIONES

- Evaluar sinergia entre una intervención con ozono utilizando agua caliente y ácido láctico antes, y haciendo muestreos en la planta.
- Evaluar un tratamiento con ozono versus un tratamiento con agua utilizando el método de aspersión.
- Cuantificación bacteriana para observar la dinámica de muerte y población de *Salmonella* y STEC bajo una solución de agua ozonizada.
- Evaluar tratamientos de ozono en diferentes etapas a lo largo de toda la línea de producción.
- Evaluar el efecto del ozono sobre superficies: evaluando en diferentes materiales como acero inoxidable o baldosas.
- Determinar la efectividad ante diferentes niveles de materia orgánica.

6. LITERATURA CITADA

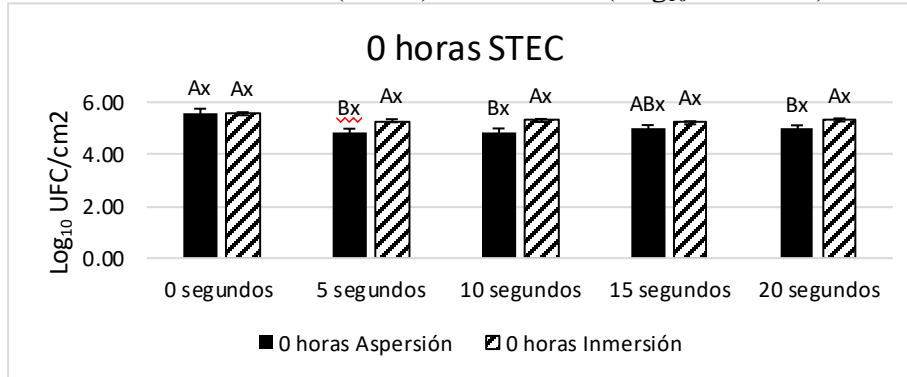
- Arayan LT, Reyes AWB, Hop HT, Xuan HT, Baek EJ, Yang HS, Chang HH, Kim S. 2017. Antimicrobial effect of different concentrations of ozonated water in the sanitation of water experimentally inoculated with *Escherichia coli*. *J Prev Vet Med*. 41(2):84-87. doi:10.13041/jpvm.2017.41.2.84.
- Baskaran SA, Upadhyaya A, Upadhyaya I, Venkitanarayanan K. 2012. Efficacy of octenidine hydrochloride for reducing *E.coli* O157:H7, *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* on cattle hides. *Appl Environ Microbiol*. 78:4538-4541.
- BioSecurity Technology. 2020. Bio-Safe cleaning solution. Bio-Safe cleaning solution. EE. UU. [Sin editorial] [consultado el 6 de jun. de 2020]. <https://biosecuritytechnology.com/biosafe-solution>.
- Brodowska AJ, Nowak A, Śmigielski K. 2017. Ozone in the food industry: Principles of ozone treatment, mechanisms of action, and applications: An overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 58(13):2176-2201. doi:10.1080/10408398.2017.1308313.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. 2011. Datos y estadísticas destacados. Estimaciones sobre enfermedades transmitidas por alimentos en los EE. UU. en el 2011. [consultado el 14 de may. de 2020]. <https://www.cdc.gov/spanish/Datos/EnfermedadesAlimentos/>.
- Coll Cárdenas F, Andrés S, Giannuzzi L, Zaritzky N. 2011. Antimicrobial action and effects on beef quality attributes of a gaseous ozone treatment at refrigeration temperatures. *Food Control*. 22(8):1442-1447. doi:10.1016/j.foodcont.2011.03.006.
- FDA, Food and Drug Administration. 2013. Code of federal regulations Title 21, Government Printing Office: Food and Drug Administration; [actualizado el 22 de Mar. de 2018; consultado el 12 de abr. de 2020]. <https://www.fda.gov/medical-devices/medical-device-databases/code-federal-regulations-title-21-food-and-drugs>.
- Giuliani G, Ricevuti G, Galoforo A, Franzini M. 2018. Microbiological aspects of ozone: bactericidal activity and antibiotic/antimicrobial resistance in bacterial strains treated with ozone. *Ozone Ther*. 3(3). doi:10.4081/ozone.2018.7971.
- Hardin MD, Acuff LM, Lucia J S, Oman and J W Savell. 1995. Comparison of methods for decontamination from beef carcass surfaces. *J. Food Prot*. 58:368-374. DOI: 10.4315/0362-028X-58.4.368.
- Ingham SC, Buege DR. 2001. Evaluation of small-scale intervention treatments for improvement of beef carcass hygiene. University of Wisconsin Research Report. [consultado el 12 de abr. de 2020]. http://icomst-proceedings.helsinki.fi/papers/2013_06_31.pdf.

- Ingham SC, Buege DR. 2003. Validation of dry aging as an effective intervention step against *E. coli* O157:H7 on beef carcasses. University of Wisconsin Research Report. [consultado el 12 de abril de 2020]. http://icomst-proceedings.helsinki.fi/papers/2013_06_31.pdf.
- Kalchayanand N, Worlie D, Wheeler T. 2019. A novel aqueous ozone treatment as a spray chill intervention against *Escherichia coli* O157:H7 on surfaces of fresh beef. *Journal of Food Protection*. 82 (11):1874-1878. doi:10.4315/0362-028x.jfp-19-093.
- Karamah EF, Ilmiyah AP, Ismaningtyas N. 2019. The application of ozonated water to maintain the quality of tuna meat: the effect of contact time, contact temperature and ozone dosage. *IOP Conf Ser: Mater Sci Eng*. 509:012004. doi:10.1088/1757-899x/509/1/012004.
- Karamah EF, Wajdi N. 2018. Application of ozonated water to maintain the quality of chicken meat: effect of exposure time, temperature, and ozone concentration. Kusrini E, Juwono FH, Yatim A, Setiawan EA, editores. *E3S Web Conf*. 67:04044. doi:10.1051/e3sconf/20186704044.
- Kim J-G, Yousef AE, Dave SA. 1999. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: A review. *J Food Prot*, 62: 1071-87. DOI: 10.4315/0362-028x-62.9.1071.
- Liao Y-T, Sun X, Quintela IA, Bridges DF, Liu F, Zhang Y, Salvador A, Wu VCH. 2019. Discovery of Shiga Toxin producing *Escherichia coli* (STEC) specific Bacteriophages from non-fecal composts using genomic characterization. *Frontiers in Microbiology*. 10. doi:10.3389/fmicb.2019.00627.
- Manousaridis G, Nerantzaki A, Paleologos E, Tsiotsias A, Savvaidis I, Kontominas M. 2005. Effect of ozone on microbial, chemical and sensory attributes of shucked mussels *Food Microbiol*. 22 1 1-9. DOI:10.1016/j.fm.2004.06.003.
- NCEZID, Centro Nacional de Enfermedades Infecciosas Emergentes y Zoonóticas, traducido por CDC, Center for Disease Control and Prevention. 2020. *La Salmonella y los alimentos*. Estados Unidos. [Sin editorial] [consultado el 15 de Mar. de 2020]. <https://www.cdc.gov/spanish/especialescdc/salmonella/index.html>.
- Ozono 21, Efecto del ozono en las Bacterias. 2012. *Ozono21.com*. [Sin lugar]. [Sin editorial]. [consultado el 2 de mar. de 2020]. <https://www.ozono21.com/actualidad-interna/efecto-del-ozono-bacterias/373/>.
- Prasai, R.K, R K Phebus, C M Garcia Zepeda, C L Kastner, A E Boyle, and D Y C Fung. 1995. Effectiveness of trimming and/or washing on microbiological quality of beef carcasses. *J. Food Prot*. 58:1114-1117. DOI: 10.4315/0362-028X-58.10.1114.
- Reagan JO, Morgan JB, Marsden JL, Smith GC, Nickelson R II, Kastner CL, Buege DR, Acuff GR, Dickson JS, Buyck MJ. 1996. Trimming and washing of beef carcasses as a method of improving the microbiological quality of meat. *J Food Protect*. 59(7): 751–756. doi: 10.4315/0362-028X-59.7.751.

- Rípodas Navarro, Fernández Moreira D, Macho Martínez, M. 2017. Investigación de *Escherichia coli* productor de toxinas Shiga (STEC) en carnes y derivados cárnicos. *Sanidad Militar*, 73. 3. 147-152. <https://dx.doi.org/10.4321/s1887-85712017000300002>.
- Sadatullah S, Mohamed NH, Razak FA. 2012. The antimicrobial effect of 0.1 -ppm ozonated water on 24-hour plaque microorganisms in situ. *Brazilian Oral Research*. 26(2):126-131. doi:10.1590/s1806-83242012000200007.
- Saini PK, Marks HM, Dreyfuss MS, Evans P, Cook LV, Dessai U. 2011. Indicator organisms in meat and poultry slaughter operations: their potential use in process control and the role of emerging technologies. *J Food Prot*. 74(8):1387–1394. eng. doi:10.4315/0362-028X.JFP-10-433.
- Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M-A, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. 2011. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg Infect Dis*. 17(1):7-15. doi:10.3201/eid1701.p11101.
- Sung H-J, Song W-J, Kim K-P, Ryu S, Kang D-H. 2014. Combination effect of ozone and heat treatments for the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* in apple juice. *International Journal of Food Microbiology*. 171:147-153. <http://dx.doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.001>.
- Wani S, Maker J, Thompson J, Barnes J, Singleton I. 2015. Effect of ozone treatment on inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria sp.* on Spinach. *Agriculture*. 5(2):155-169. doi: 10.3390/agriculture5020155.
- Xu Y, Ji J, Wu H, Pi F, Blaženović I, Zhang Y, Sun X. 2019. Untargeted GC-TOFMS-based cellular metabolism analysis to evaluate ozone degradation effect of deoxynivalenol. *Toxicon*. 168:49-57. doi:10.1016/j.toxicon.2019.06.022.
- Zhao Y-M, de Alba M, Sun D-W, Tiwari B. 2018. Principles and recent applications of novel non-thermal processing technologies for the fish industry a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 59(5):728-742. doi:10.1080/10408398.2018.149561.

7. ANEXOS

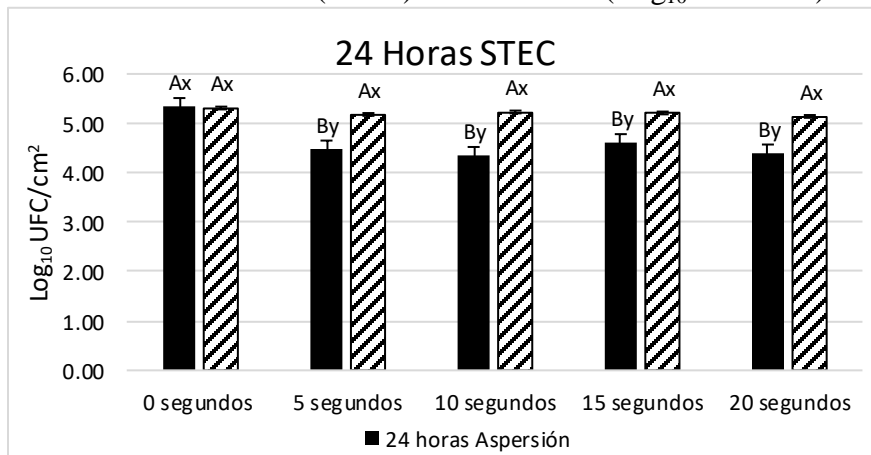
Anexo 1. Gráfico de *Escherichia coli* (STEC) a las 0 horas (Log_{10} UFC/cm²).



^{AB} letras diferentes representan diferencia estadística ($P < 0.05$) entre los tiempos de cada tratamiento.

^x letras iguales no representan diferencia estadística ($P < 0.05$) entre los métodos de tratamiento.

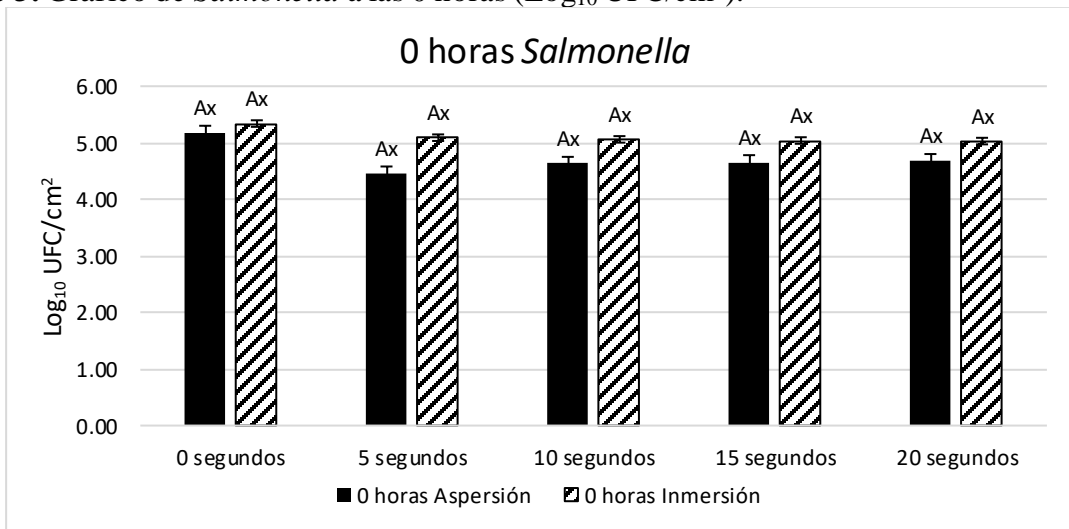
Anexo 2. Gráfico de *Escherichia coli* (STEC) a las 24 horas (Log_{10} UFC/cm²).



^{AB} letras diferentes representan diferencia estadística ($P < 0.05$) entre los tiempos de cada tratamiento.

^{xy} letras diferentes representan diferencia estadística ($P < 0.05$) entre los métodos de tratamiento.

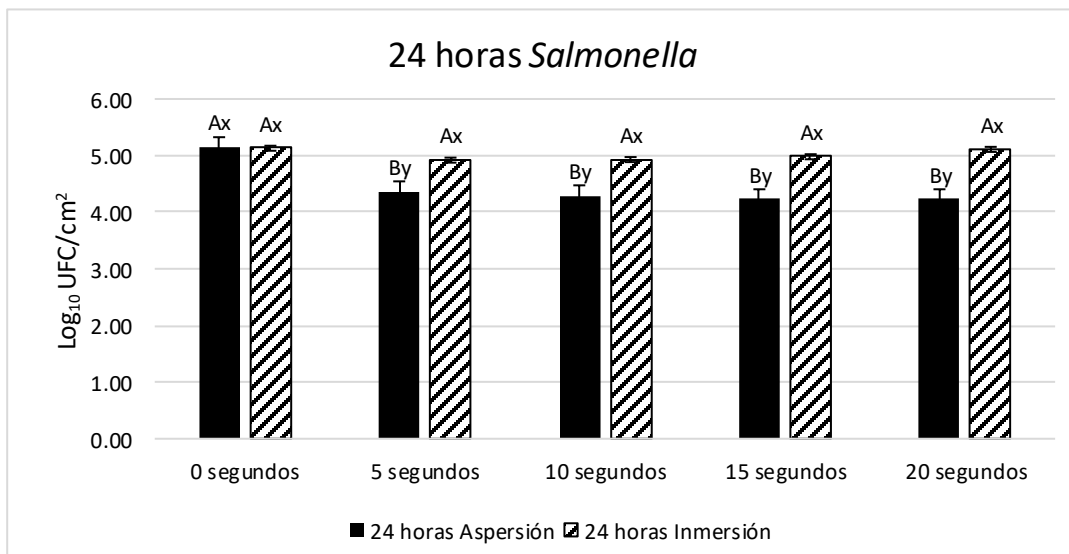
Anexo 3. Gráfico de *Salmonella* a las 0 horas (Log_{10} UFC/cm²).



^A letras iguales no representan diferencia estadística ($P < 0.05$) entre los tiempos de cada tratamiento.

^x letras iguales no representan diferencia estadística ($P < 0.05$) entre los métodos de tratamiento.

Anexo 4. Gráfico de *Salmonella* a las 24 horas (Log_{10} UFC/cm²).

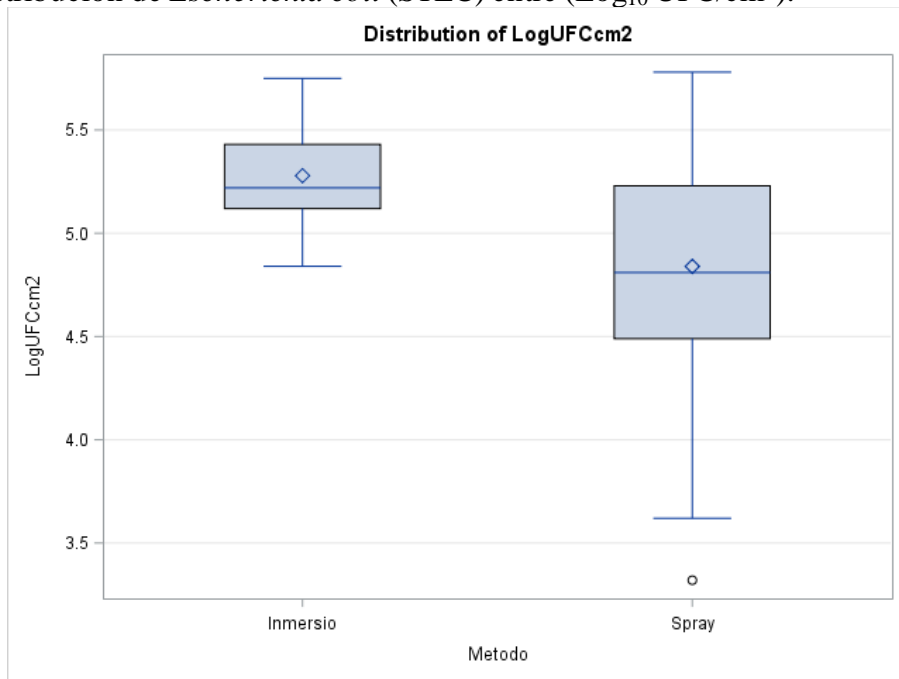


AB

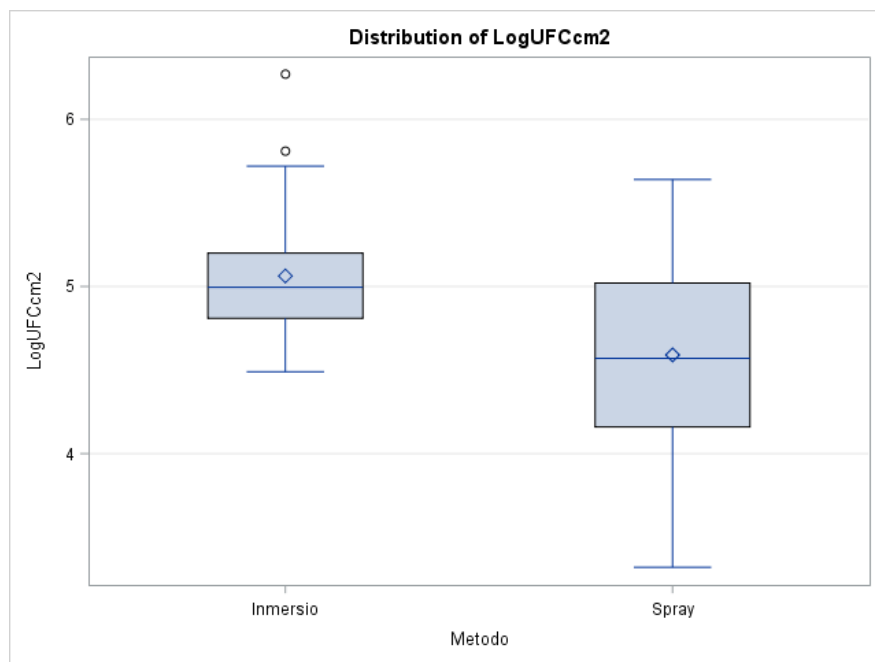
letras diferentes representan diferencia estadística ($P < 0.05$) entre los tiempos de cada tratamiento.

^{xy} letras diferentes representan diferencia estadística ($P < 0.05$) entre los métodos de tratamiento.

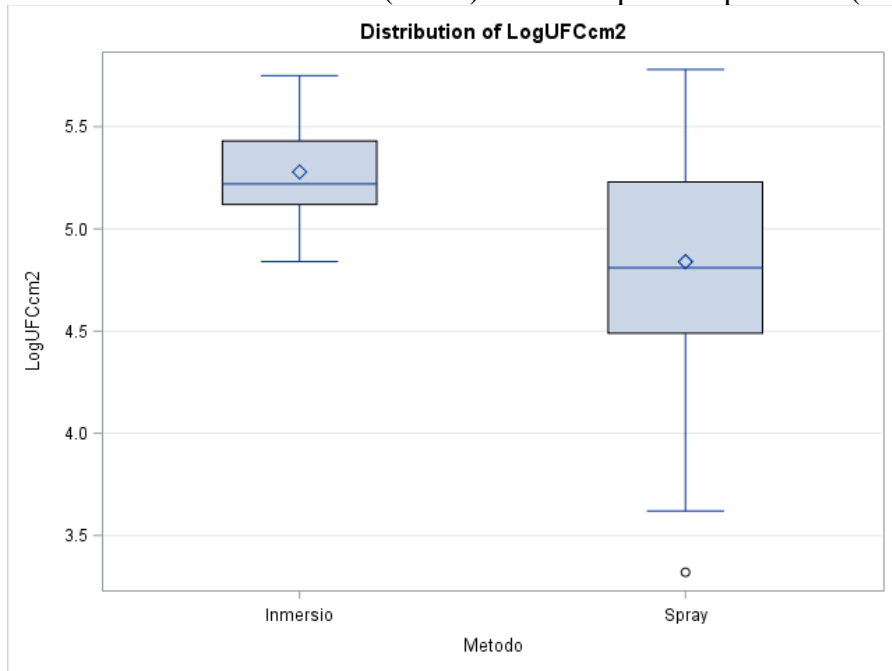
Anexo 5. Distribución de *Escherichia coli* (STEC) entre (Log_{10} UFC/cm²).



Anexo 6. Distribución de *Salmonella* (Log_{10} UFC/cm²).



Anexo 7. Distribución de *Escherichia coli* (STEC) entre tiempos de aplicación (Log_{10} UFC/cm²).



Anexo 8. Distribución de *Salmonella* entre tiempos de aplicación (Log_{10} UFC/cm²).

