

# Eficacia del agua oxidante electrolizada para inactivar *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* y *Listeria monocytogenes*

KUMAR S. VENKITANARAYANAN,<sup>1</sup> GABRIEL O. EZEIKE,<sup>2</sup> YEN-CON HUNG,<sup>2</sup> AND MICHAEL P. DOYLE<sup>2</sup> \* Departamento de

Ciencia Animal, Universidad de Connecticut, Storrs, Connecticut 06269,<sup>1</sup> y Centro para la Seguridad Alimentaria y Mejora de la Calidad, Facultad de Ciencias Agrícolas y Ambientales, Universidad de Georgia, Griffin, Georgia 30223-17972

Recibido el 14 de diciembre de 1998/Aceptado el 18 de junio de 1999

Se evaluó la eficacia del agua oxidante electrolizada para inactivar *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* y *Listeria monocytogenes*. Se inoculó una mezcla de cinco cepas de *E. coli* O157:H7, *S. enteritidis* o *L. monocytogenes* de aproximadamente 108 UFC/ml en 9 ml de agua oxidante electrolizada (tratamiento) o 9 ml de agua desionizada estéril (control) y se incubó a 4 o 23 °C durante 0, 5, 10 y 15 min; a 35°C durante 0, 2, 4 y 6 min; o a 45°C durante 0, 1, 3 y 5 min. La población superviviente de cada patógeno en cada momento de muestreo se determinó en agar de soja triptico. A 4 o 23 °C, un tiempo de exposición de 5 min redujo las poblaciones de los tres patógenos en las muestras de tratamiento en aproximadamente 7 log CFU/ml, con una inactivación completa a los 10 min de exposición. Se produjo una reducción de >7 log CFU/ml en los niveles de los tres patógenos en las muestras de tratamiento incubadas durante 1 min a 45 °C o durante 2 min a 35 °C. Los recuentos bacterianos de los tres patógenos en las muestras de control permanecieron iguales durante la incubación a las cuatro temperaturas. Los resultados indican que el agua oxidante electrolizada puede ser un desinfectante útil, pero es necesario validar las aplicaciones apropiadas.

*Escherichia coli* enterohemorrágica O157:H7, *Salmonella enteritidis* y *Listeria monocytogenes* son patógenos transmitidos por los alimentos de gran preocupación para la salud pública en los Estados Unidos. Una variedad de alimentos, incluyendo aves, huevos, carne, leche, frutas y vegetales, han sido implicados como vehículos de uno o más de estos patógenos en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (2, 4, 5). El programa de Reducción de Patógenos del Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria del Departamento de Agricultura de EE. UU. recomienda los tratamientos antimicrobianos como método para reducir o inactivar las bacterias patógenas en los alimentos (13). Los métodos efectivos para reducir o eliminar los patógenos en los alimentos son importantes para la implementación exitosa de los programas de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP) por parte de la industria alimentaria y para el establecimiento de puntos críticos de control en restaurantes, hogares y otras unidades de servicio de alimentos. En la industria se practica el lavado de productos agrícolas crudos con agua; sin embargo, el lavado por sí solo no hace que el producto esté completamente libre de patógenos. Aunque muchos productos químicos generalmente reconocidos como seguros (GRAS), incluidos los ácidos orgánicos, poseen actividad antimicrobiana contra los patógenos transmitidos por los alimentos, ninguno puede eliminar grandes poblaciones de patógenos cuando se usan individualmente en concentraciones aceptables en los alimentos. Los tratamientos de frutas y verduras con agua que contiene desinfectantes, incluido el cloro, pueden reducir pero no eliminar los patógenos en la superficie del producto (2, 14). Por lo tanto, existe la necesidad y el interés de desarrollar tratamientos antimicrobianos prácticos y efectivos para la inactivación de microorganismos patógenos en los alimentos.

El agua oxidante electrolizada (agua EO) es el producto de un nuevo concepto desarrollado en Japón. Investigaciones realizadas en Japón revelaron que la electrólisis del agua desionizada que contiene un

La baja concentración de cloruro de sodio (0,1 %) en una cámara de electrólisis donde los electrodos de ánodo y cátodo estaban separados por un diafragma impartió fuertes propiedades bactericidas y virucidas al agua recolectada del ánodo (agua EO).

El agua del ánodo normalmente tiene un pH de 2,7 o inferior, un potencial de oxidación-reducción (ORP) superior a 1100 mV y una concentración de cloro libre de 10 a 80 ppm (10). El agua EO ha sido utilizada experimentalmente en Japón por profesionales médicos y dentales para tratar heridas o desinfectar equipos médicos. El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia del agua EO para eliminar *E. coli* O157:H7, *S. enteritidis* y *L. monocytogenes* con miras a su aplicación potencial en alimentos y superficies en contacto con alimentos como tratamiento antimicrobiano.

Medios y cultivos bacterianos. Para el estudio se utilizaron cinco cepas de *E. coli* O157:H7, *S. enteritidis* y *L. monocytogenes*. Las cinco cepas de *E. coli* O157:H7 (con orígenes entre paréntesis siguiendo las designaciones de las cepas) fueron E06 (leche), E08 (carne), E10 (carne), E16 (carne) y E22 (heces de ternera). Los aislados de *S. enteritidis* incluyeron SE180 (humano), SE457 (huevo), SE565 (ensalada), SE294 (huevo) y SE1697 (humano). Las cinco cepas de *L. monocytogenes* fueron LM ATCC 19117 (oveja), LM101 (sa lami), LM109 (pepperoni), LM116 (queso) y LM201 (leche). Las cepas de *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*, pero no ATCC 19117, fueron aisladas por uno de los autores, mientras que los aislamientos de *S. enteritidis* se obtuvieron de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Atlanta, Georgia. 37°C durante 24 h con agitación (150 rpm).

Después de la incubación, 10 ml de cada cultivo se sedimentaron por centrifugación (4000 g durante 20 min), se lavaron y se resuspendieron en 10 ml de agua peptonada al 0,1% (pH 7,1). Se determinó la densidad óptica de la suspensión y se ajustó con agua de peptona al 0,1% a 0,5 a 640 nm (lo que representa aproximadamente 109 CFU/ml). La población bacteriana en cada cultivo se confirmó colocando en placas porciones de 0,1 ml de

\* Autor correspondiente. Dirección postal: Center for Food Safety and Quality Enhancement, College of Agricultural and Environmental Sciences, University of Georgia, 1109 Experiment St., Griffin, GA 30223-1797. Teléfono: (770) 228-7284. Fax: (770) 229-3216. Correo electrónico: mdoyle@cfsge.griffin.peachnet.edu.

TABLA 1. Inactivación de E. coli O157:H7, S. enteritidis y L. monocytogenes con agua EO a 4 o 23 °C

Especies bacterianas	Temperatura (°C)	Población bacteriana superviviente (promedio de log CFU/ml) después de la exposición para:				propiedad del agua EO		
		0 minutos	5 minutos	10 minutos	15 minutos	pH	Redox (mV)	Cloro libre (ppm)
E.coli O157:H7	4	7,98 0,04	1.0a	0b	0b	2,36 0,03	1,153 3	86,3 5,4
Control		7,98 0,04	7,99 0,07	7,96 0,06	7,99 0,04			
S.enteritidis		7,74 0,08	1,06 0,15	0b	0b			
Control		7,74 0,08	7,68 0,09	7,61 0,11	7,60 0,12			
L. monocytogenes		7,91 0,05	1,34 0,37	0b	0b			
Control	23	7,91 0,05	7,88 0,06	7,87 0,06	7,91 0,03	2,63 0,03	1,160 4	43,0 4,6
E.coli O157:H7		8,04 0,07	1.0a	0b	0b			
Control		8,04 0,07	7,97 0,03	7,99 0,07	7,76 0,42			
S.enteritidis		7,76 0,08	1.0a	0b	0b			
Control		7,76 0,08	7,65 0,09	7,73 0,08	7,69 0,10			
L. monocytogenes		7,89 0,10	1,25 0,33	0b	0b	2,63 0,04	1,158 5	48,5 4,1
Control		7,89 0,10	7,83 0,06	7,85 0,04	7,85 0,07			

a Positivo por enriquecimiento.  
b Negativo por enriquecimiento y sin supervivientes detectables por un procedimiento directo de siembra.

cultivo luted en agar de soja tríptico (TSA) (Difco Laboratories) placas e incubando las placas a 37°C durante 48 h. Para cada patógeno, porciones iguales de cada una de las cinco cepas fueron combinados, y se usó 1 ml de la suspensión como inóculo (109 CFU).

agua EO. El agua EO se generó con un generador de agua EO modelo ROX 20TA (Hoshizaki Electric Company Ltd., Toyooka, Aichi, Japón). La corriente que pasa por el EO generador de agua y el voltaje entre los electrodos fueron fijado en 19,8 A y 10 V, respectivamente. Una solución al 12% de sodio cloruro (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) y desionizado el agua de la línea de suministro del laboratorio se bombeado en el equipo. El indicador de la pantalla se activó y se observó hasta que la máquina se estabilizó en una lectura de 19.8 A. El agua EO se recolectó de la apropiada salida en recipientes estériles y se utilizó dentro de los 5 min para el estudio microbiano. Muestras para la determinación del pH, ORP, y la concentración de cloro libre también se recogieron simultáneamente.

Inoculación de muestras y tratamientos. Un volumen de 9 ml de EO agua (tratamiento) o agua desionizada estéril (control) fue transferido a tubos separados, estériles con tapón de rosca, y los tapones estaban bien cerrados. Los tubos se colocaron en un baño de agua en para precalentar las muestras de agua a la temperatura deseada. A cada tubo conteniendo 9 ml de agua EO o desionizada agua, 1 ml (equivalente a 109 CFU) de la mezcla de cinco cepas de E. coli O157:H7, S. enteritidis o L. monocytogenes fue se agregaron y las muestras se incubaron en un baño de agua (Farmacia LKB, Piscataway, NJ) a 4 °C durante 0, 5, 10 y 15 min; en 23°C durante 0, 5, 10 y 15 min; a 35°C durante 0, 2, 4 y 6 min; y a 45°C durante 0, 1, 3 y 5 min. Después de cada incubación, el El número de células viables en cada muestra se determinó colocando en placas porciones de 0,1 ml directamente o después de diluciones en serie (1:10) en Agua peptonada al 0,1 % en placas TSA duplicadas. colonias de la patógeno inoculado se enumeraron en placas TSA después

incubación a 37°C durante 48 h. Un volumen de 1 ml del inoculado solución (tratamiento o control) después de la exposición a cada combinación de temperatura-tiempo también se transfirió a 250-ml matraces Erlenmeyer que contienen 100 ml de TSB estéril y se incubaron a 37°C durante 24 h. Tras el enriquecimiento en TSB, el el cultivo se sembró en agar sorbitol MacConkey no. 3 (División Oxoid, Unipath Co., Ogdensburg, NY) (para E. coli O157:H7), agar xilosa lisina desoxicolato (Gene-Trak, Framingham, MA) (para S. enteritidis) o agar Oxford (Gene Trak) (para L. monocytogenes), y las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Colonias representativas de E. coli O157:H7 y S. enteritidis de las respectivas placas fueron confirmados por el Ensayo de aglutinación de látex E. coli O157:H7 (Remel Microbiology Products, Lenexa, Kansas) y la prueba de látex Salmonella (Oxoid), respectivamente. Las colonias de L. monocytogenes en agar Oxford fueron confirmados por el kit de prueba de diagnóstico API-20E (Biome rieux, Hazelwood, Mo.). Se analizaron al menos muestras duplicadas de tratamientos y controles en cada momento de muestreo, y todo el estudio con cada patógeno se replicó tres veces.

El pH y el ORP del agua con EO se midieron en muestras por duplicado inmediatamente después del muestreo utilizando pH y ORP. electrodos (modelo 50, medidor ACCUMET; Denver Instrument Company, Denver, Colorado). La concentración de cloro libre se determinó mediante un método yodométrico utilizando un valorador digital (modelo 16900; Hach Company, Loveland, Colo.). el ensayo fue verificado periódicamente usando un 100 0.05 ppm de cloro solución estándar (Orion Research Inc., Beverly, MA).

Análisis estadístico. Para cada tratamiento, los datos de la Se agruparon los ensayos replicados independientes y el valor medio y se determinaron la desviación estándar (11).

El pH medio, el ORP y la concentración de cloro libre de EO agua a las diferentes temperaturas utilizadas para el tratamiento son presentados en las Tablas 1 a 3. El pH medio y el ORP de agua desionizada estéril fueron 7.1 0.15 y 355 7.0 mV, respectivamente. No se detectó cloro libre en agua desionizada.

TABLA 2. Inactivación de E. coli O157:H7, S. enteritidis y L. monocytogenes por agua EO a 35°C

Especies bacterianas	Población bacteriana superviviente (promedio de log CFU/ml) después de la exposición para:				propiedad del agua EO		
	0 minutos	2 minutos	4 minutos	6 minutos	pH	Redox (mV)	Cloro libre (ppm)
E.coli O157:H7	7,97 0,03	0b	0b	0b	2,38 0,00	1,154 1	84,3 4,6
Control	7,97 0,03	7,94 0,04	7,96 0,03	7,94 0,04			
S.enteritidis	7,68 0,14	1.0a	0b	0b	2,44 0,04	1,153 1	79,8 3,3
Control	7,68 0,14	7,63 0,06	7,59 0,11	7,64 0,11			
L. monocytogenes	7,91 0,10	0b	0b	0b	2,48 0,05	1,159 4	73,3 1,8
Control	7,91 0,10	7,88 0,11	7,86 0,08	7,81 0,12			

a Positivo por enriquecimiento.  
b Negativo por enriquecimiento y sin supervivientes detectables por un procedimiento directo de siembra.

El agua EO tuvo mayor actividad antibacteriana a 4 y 23°C en las mezclas de cinco cepas de E. coli O157:H7, S. enteritidis y L. monocytogenes (Cuadro 1). En el momento cero, tanto el tratamiento como las muestras de control para los tres patógenos tenían una media aproximada recuentos bacterianos de 8,0 log CFU/ml. A los 5 min de exposición a 4 °C, el recuento de E. coli O157:H7 en las muestras de tratamiento fue reducido a menos de 1,0 log CFU/ml (detectado solo por enriquecimiento en TSB durante 24 h), mientras que las poblaciones de S. enteritidis y L. monocytogenes fueron ligeramente superiores a 1,0 log CFU/ mililitros Los tres patógenos disminuyeron a niveles indetectables (como determinado por los procedimientos de siembra y enriquecimiento) después 10 min de exposición a agua EO a 4°C. Sin embargo, no se observaron diferencias en los recuentos bacterianos en las muestras de control. a lo largo del estudio. A los 5 min de exposición a 23°C, las poblaciones de E. coli O157:H7 y S. enteritidis en el tratamiento muestras disminuyó a menos de 1,0 log CFU/ml, mientras que el El recuento de L. monocytogenes se redujo a 1,25 log CFU/ml. En concordancia con los resultados obtenidos a 4°C, los tres patógenos fueron indetectables después de 10 min de contacto con agua EO a 23°C.

E. coli O157:H7, S. enteritidis y L. monocytogenes fueron inactivado más rápidamente por agua EO a 35 o 45°C (Tablas 2 y 3) que a 4 o 23°C. A 35°C, las poblaciones de E. coli O157:H7 y L. monocytogenes en las muestras tratadas se redujeron a niveles indetectables dentro de los 2 minutos posteriores a la exposición a EO agua, mientras que S. enteritidis se detectó sólo por enriquecimiento de la muestra tratada en TSB. Después de 1 min de exposición a EO

agua a 45 °C, E. coli O157:H7 se eliminó por completo (una reducción de aproximadamente 8,0 log CFU/ml), mientras que las poblaciones de S. enteritidis y L. monocytogenes se redujeron en aproximadamente 7,0 log CFU/ml. Los recuentos bacterianos de todos tres patógenos en las muestras de control permanecieron iguales durante todo el estudio a 35 y 45 °C.

La secuencia teórica de reacciones químicas involucradas en la producción de agua EO se puede resumir de la siguiente manera (1). Durante la electrólisis, el cloruro de sodio disuelto en agua desionizada el agua en la cámara de electrólisis se disocia en forma negativa iones de cloruro (Cl) e hidroxí (OH) cargados y positivamente iones cargados de sodio (Na) e hidrógeno (H). el cloruro y los iones hidroxí se adsorben en el ánodo, con cada ion liberando un electrón (e) para convertirse en un radical. El clórico y Los radicales hidroxí se combinan, formando ácido hipocloroso (HOCl), que se separa del ánodo. Dos radicales clóricos también pueden se combinan para producir cloro gaseoso. En la sección del cátodo, cada El ion de sodio cargado positivamente recibe un electrón y se convierte en sodio metálico. El sodio metálico se combina con moléculas de agua, formando hidróxido de sodio e hidrógeno gaseoso. Una membrana bipolar que separa los electrodos mejora la electrólisis del agua para producir aguas ácidas y alcalinas fuertes del ánodo y del cátodo, respectivamente.

Los efectos antagónicos del cloro y el bajo pH sobre los microorganismos están bien documentados. Aunque los ácidos orgánicos (con bajo pH) y solución de hipoclorito (con cloro libre) tienen Se ha utilizado ampliamente en tratamientos para matar bacterias transmitidas por los alimentos.

TABLA 3. Inactivación de E. coli O157:H7, S. enteritidis y L. monocytogenes por agua EO a 45°C

Especies bacterianas	Población bacteriana superviviente (promedio de log CFU/ml) después de la exposición para:				propiedad del agua EO		
	0 minutos	1 minuto	3 minutos	5 minutos	pH	Redox (mV)	Cloro libre (ppm)
E.coli O157:H7	7,96 0,03	0b	0b	0b	2,39 0,02	1,153 4	85,8 2,7
Control	7,96 0,03	7,89 0,03	7,87 0,03	7,86 0,11			
S.enteritidis	7,70 0,12	1,13 0,33	0b	0b	2,44 0,03	1,155 1	79,33 3,0
Control	7,70 0,12	7,63 0,12	7,67 0,15	7,61 0,14			
L. monocytogenes	7,91 0,10	1.0a	0b	0b	2,48 0,05	1,159 4	73,3 1,8
Control	7,91 0,10	7,88 0,10	7,88 0,08	7,83 0,12			

a Positivo por enriquecimiento.  
b Negativo por enriquecimiento y sin supervivientes detectables por un procedimiento directo de siembra.

en la industria alimentaria no se han utilizado normalmente sistemas que impliquen valores de ORP elevados, superiores a 1.000 mV. El ORP de una solución es un indicador de su capacidad para oxidarse o reducirse, con valores de ORP positivos y más altos correlacionados con una mayor fuerza oxidante (6, 8, 9). Un ORP de 200 a 800 mV es óptimo para el crecimiento de microorganismos aeróbicos, mientras que un rango óptimo de 200 a 400 mV se favorece para el crecimiento de microorganismos anaeróbicos (6). Dado que el ORP del agua EO en este estudio fue superior a 1100 mV, es probable que el ORP desempeñó un papel influyente, en combinación con un pH bajo y cloro libre, en la destrucción de microorganismos. Una posible explicación del alto ORP del agua EO es el oxígeno liberado por la ruptura del enlace débil e inestable entre los radicales hidroxilo y clorhídrico (1). Se plantea la hipótesis de que el bajo pH del agua EO sensibiliza las membranas externas de las células bacterianas, lo que permite que el ácido hipocloroso ingrese a las células bacterianas de manera más eficiente.

Se informó que las células de *Salmonella typhimurium* adaptadas al ácido son más sensibles a la inactivación por el ácido hipocloroso que las células no adaptadas, debido a una mayor sensibilidad de la membrana externa al ácido hipocloroso en las células adaptadas al ácido (7). En nuestro laboratorio se están realizando experimentos para identificar las contribuciones de los diferentes componentes del agua EO a su actividad antimicrobiana.

Los efectos del agua EO sobre los tres patógenos se evaluaron a temperaturas bajas y moderadas con el interés de desarrollar posibles tratamientos antibacterianos por inmersión para alimentos agrícolas no procesados. No se observaron diferencias en las tasas de inactivación de los tres patógenos entre el tratamiento a 4 °C y el tratamiento a 23 °C. Sin embargo, a 35 y 45 °C, se observaron tasas de inactivación mucho más altas para los tres patógenos.

Dado que el cloro es uno de los componentes antimicrobianos del agua EO, evaluamos la supervivencia de *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* en agua desionizada estéril que contenía una concentración de cloro libre de 70 a 80 ppm, que era similar a la presente en el agua EO. Los resultados revelaron reducciones en los recuentos bacterianos de ambos patógenos similares a las observadas con el agua EO, lo que indica que la concentración de cloro libre presente en el agua EO es suficiente para provocar las reducciones en los recuentos bacterianos logradas por el agua EO. Aunque el cloro es muy eficaz para matar microorganismos patógenos en sistemas acuosos simples, su efecto antibacteriano sobre los microorganismos de los alimentos es mínimo, especialmente en presencia de materiales orgánicos que convierten el cloro en formas inactivas (3). Por ejemplo, el tratamiento de productos frescos con 200 ppm de cloro

da como resultado una reducción en el recuento de *L. monocytogenes* de menos de 2 log CFU/g (15). En nuestro laboratorio se están realizando estudios que comparan las eficacias del agua clorada y el agua EO para inactivar *E. coli* O157:H7 en manzanas.

Los resultados revelaron que el agua EO es muy eficaz para matar *E. coli* O157:H7, *S. enteritidis* y *L. monocytogenes*, lo que indica su aplicación potencial para la descontaminación de alimentos y superficies en contacto con alimentos. Una ventaja del agua EO es que se puede producir con agua del grifo, sin productos químicos añadidos aparte del cloruro de sodio.

#### REFERENCIAS

1. Anónimo. 1997. Principio de formación de agua electrolítica. Hoshizaki Electric Co. Ltd., Sakae, Toyoake, Aichi, Japón.
2. Beuchat, LR 1995. Microorganismos patógenos asociados con productos frescos. *J. Alimentos Prot.* 59:204–216.
3. Beuchat, LR, BV Nail, BB Adler y MRS Clavero. 1998. Eficacia de la aplicación por aspersión de agua clorada para matar bacterias patógenas en manzanas, tomates y lechuga crudos. *J. Alimentos Prot.* 61:1305–1311.
4. D'Aoust, J. 1997. Especies de *Salmonella*, p. 135–137. En MP Doyle, LR Beuchat y TJ Montville (ed.), *Microbiología de los alimentos: fundamentos y fronteras*. Sociedad Estadounidense de Microbiología, Washington, DC.
5. Doyle, MP, T. Zhao, J. Meng y S. Zhao. 1997. *Escherichia coli* O157:H7, pág. 175–178. En MP Doyle, LR Beuchat y TJ Montville (ed.), *Microbiología alimentaria: fundamentos y fronteras*. Sociedad Estadounidense de Microbiología, Washington, DC.
6. Jay, JM 1996. *Modern food microbiology*, 5ª ed., pág. 48–49. Pub de álamo temblón lishers, Gaithersburg, Maryland.
7. Leyer, GJ y EA Johnson. 1997. La adaptación ácida sensibiliza a *Salmonella typhimurium* al ácido hipocloroso. *aplicación Reinar. Microbiol.* 63:461–467.
8. McPherson, LL 1993. Comprensión de los ORP en el proceso de desinfección. *Ing. Agua Gestión* 140(11):29–31.
9. Robbs, PG, JA Bartz, JK Brecht y SA Sargent. 1995. Potencial de reducción de oxidación de soluciones de cloro y su toxicidad para *Erwinia caratovora* subsp. *caratovora* y *Geotrichum candidum*. *Planta Dis.* 79:158–162.
10. Shimizu, Y. y T. Hurusawa. 1992. Acciones antivirales, antibacterianas y antifúngicas del agua oxidante electrolizada a través de la electrólisis. *Dental J.* 37: 1055–1062.
11. Acero, RGD y JH Torrie. 1980. Principios y procedimientos de estadística. McGraw-Hill, Nueva York, NY.
12. Tryland, I., M. Pommeupuy y L. Fiksdal. 1998. Efecto de la cloración sobre la actividad -D- galactosidasa de bacterias de aguas residuales y *Escherichia coli*. *Aplicación J. Bacteriol.* 85:51–60.
13. Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria del Departamento de Agricultura de EE. UU. 1995. Reducción de patógenos: Sistemas de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP). Código de facturación de la propuesta 3410-DM-P. Expediente no. 93-016P. Departamento de Agricultura de EE. UU., Beltsville, Md.
14. Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos. 1997. Guía para minimizar los peligros microbianos para la inocuidad de los alimentos en frutas y verduras frescas. Centro de Seguridad Alimentaria y Nutrición Aplicada, Administración de Drogas y Alimentos de EE. UU., Washington, DC.
15. Zhang, S. y JM Farber. 1996. Los efectos de varios desinfectantes contra *Listeria monocytogenes* en vegetales recién cortados. *Microbiol. alimentario.* 13:311–321.