



Interciencia

ISSN: 0378-1844

interciencia@ivic.ve

Asociación Interciencia

Venezuela

Zapata M., José E.; Martínez, Olga L.; Salazar, Blanca C.; Moreno, Germán; Gallego, Fernando
Inhibición del crecimiento de escherichia coli por aplicación de campos eléctricos pulsados de alta
intensidad

Interciencia, vol. 25, núm. 8, noviembre, 2000, pp. 391-397

Asociación Interciencia

Caracas, Venezuela

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33905006>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE *Escherichia coli*

POR APLICACIÓN DE CAMPOS ELÉCTRICOS PULSADOS

DE ALTA INTENSIDAD

José E. Zapata M., Olga L. Martínez, Blanca C. Salazar, Germán Moreno y Fernando Gallego

RESUMEN

Se inactivaron células de *Escherichia coli* ATCC 95922 por aplicación de campos eléctricos pulsados de alta intensidad (CEAI). Para el tratamiento con CAEI, las células fueron inoculadas en diferentes medios: glicerol al 5%, jugos de frutas y caldo nutritivo. La cepa fue llevada hasta la fase de crecimiento logarítmico antes de aplicarle cada tratamiento. Los resultados mostraron la posibilidad de inactivación de hasta el 99% de la concentración inicial de microorganismos, por aplicación de dos pulsos de 15 kV/cm sobre el medio de crecimiento, con intervalos de 1,5 min.

Se utilizó un diseño factorial 2^3 , para estudiar el efecto de la intensidad de campo, del pH y de los grados Brix, sobre la fracción letal obtenida por aplicación de los CAEI; se observó un efecto estadísticamente significativo de la intensidad de campo y los grados Brix, sobre el valor de la fracción letal obtenida; el pH no fue estadísticamente significativo como efecto principal pero la interacción entre pH y grados Brix sí lo fue.

SUMMARY

Cells of *Escherichia coli* ATCC 95922 inoculated in different media (5% glycerol, fruit juice and nutritive broth) were inactivated by applying high intensity pulsed electric fields (HIPEF). The cultures were led to their logarithmic growing stage before applying each treatment. Results showed the possibility of elimination of up to 99% of the initial concentration of microorganisms, by applying two 15 kV/cm pulses with 1.5 min

intervals. A factorial design 2^3 was used to study the effects of field intensity, pH and Brix degrees on the lethal fraction obtained by HIPEF. A statistically significant effect of the HIPEF intensity and Brix degrees on the resulting lethal fraction was observed. No significance of pH as main effect was observed, but pH and °Brix interaction was significant.

Introducción

Desde el descubrimiento del fuego, el hombre ha utilizado el calor como medio para preparar y conservar los alimentos, por su capacidad para eliminar los microorganismos saprofitos y patógenos. A medida que el conocimiento ha avanzado, se han perfeccionado las técnicas para la utilización del calor y se han desarrollado diferentes

métodos de conservación de alimentos. Es así como el frío, la deshidratación y los aditivos químicos, se cuentan entre los métodos tradicionalmente utilizados desde siglos pasados. Con el refinamiento y la aplicación de nuevas técnicas para análisis bromatológicos se han encontrado algunos efectos indeseables en los alimentos conservados por métodos tradicionales, observándose pérdida de nutrientes,

desnaturalización de proteínas de importancia y cambios en propiedades sensoriales, entre otros. A partir del conocimiento de dichos efectos, se han generado tendencias en los consumidores a preferir los alimentos conservados por métodos que no alteren las características del alimento en su proceso de conservación (Dallas, 1997; Gould, 1995; Martin *et al.*, 1994; Quin *et al.*, 1995). Se han investigado

nuevas tecnologías donde se minimiza la utilización del calor, por lo que se denominan métodos no térmicos de conservación de alimentos, entre las que se cuentan la utilización de pulsos de luz intensa, campos magnéticos, deshidratación osmótica, atmósferas modificadas, irradiación, campos eléctricos pulsados de alto voltaje, altas presiones hidrostáticas y bacteriocinas (Mertens y Knorr,

PALABRAS CLAVES / Campos Eléctricos Pulsados / Fracción Letal / Potencial de Membrana / Ruptura Dieléctrica / Diseño Factorial / Grados Brix /

José Edgar Zapata Montoya. Ingeniero Químico. Especialista en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Dirección: Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, A.A. 1226, Medellín, Colombia, e-mail: jezapata@muisca.udea.edu.co
Olga Lucía Martínez Álvarez.

Tecnóloga de Alimentos. Especialista en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia. e-mail: omart@muisca.udea.edu.co
Blanca Cecilia Salazar Alzate. Química Farmacéutica. Especialista en Ciencia y Tecnología

de Alimentos. Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia. e-mail: bsalazar@muisca.udea.edu.co
Germán Moreno Ospina. Ingeniero Electricista. Maestría en Ciencias en Ingeniería Eléctrica. Doctorado en Alta Tensión. Departamento de Ingeniería

Eléctrica, Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia. e-mail: gmoreno@jaibana.udea.edu.co
Fernando Gallego Buriticá. Ingeniero Electricista. Postgrado en Potencia Eléctrica. Departamento de Ingeniería Eléctrica, Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia. e-mail: lgallego@jaibana.udea.edu.co

RESUMO

Serão inativas as células de *Escherichia coli* ATCC 95922 por aplicação de campos elétricos pulsados de alta intensidade (CEAI). Para o tratamento com CEAI, as células foram inoculadas em diferentes meios: glicerol ao 5%, sucos de frutas e caldo nutritivo. A cepa foi levada até a fase de crescimento logarítmico antes de aplicar cada tratamento. Os resultados mostraram a possibilidade de inativação de até o 99% da concentração inicial de microorganismos, por aplicação de dois

pulsos de 15 kV/cm sobre o meio de crescimento, com intervalos de 1,5 min. Foi utilizado um desenho fatorial 2^3 , para estudar o efeito da intensidade de campo, do pH e dos graus Brix, sobre a fração letal obtida por aplicação dos CEAI; foi observado efeito estatisticamente significativo da intensidade de campo e os graus Brix, sobre o valor da fração letal obtida; o pH não foi estatisticamente significativo como efeito principal mas a interação entre pH e grau Brix foi significativa.

1992; Dun, 1995; Barbosa *et al.*, 1998; Pagán *et al.*, 1998; Rosell *et al.*, 1998; Zapata *et al.*, 1999).

Una de las tecnologías más prometedoras para inactivar microorganismos es la utilización de pulsos de campos eléctricos de alta intensidad (CEAI), que por ser un método no térmico, conserva las características sensoriales y nutricionales más importantes de los alimentos. Además requiere cortos tiempos de aplicación y presenta alto rendimiento energético (Rosell *et al.*, 1998). La investigación en este tema ha tomado un gran impulso en los últimos diez años con la aplicación a productos fluidos, en pasterización principalmente, siendo muy efectiva para inactivar células vegetativas (Martin *et al.*, 1994, 1997; Quin *et al.*, 1995; Pagán *et al.*, 1998; Rosell *et al.*, 1998; Zapata *et al.*, 1999).

La utilización de CEAI para inactivar microorganismos se basa en que las membranas plasmáticas, tanto las de células vegetales y animales como las de microorganismos, presentan ruptura mecánica cuando se someten a campos eléctricos de alta intensidad (Zimmermann *et al.*, 1974, 1982; Salhani *et al.*, 1982; Teissi *et al.*, 1982; Bates *et al.*, 1983; Lo *et al.*, 1984). La ruptura de la membrana se ha explicado por dos mecanismos: la apertura de poros a través de la bicapa lipídica (Sale y Hamilton, 1968; Crowley, 1973; Benz *et al.*, 1979; Teissie y Tsong, 1981; Dimitrov, 1984), y la apertura de poros a través de

los canales proteicos presentes en la membrana (Teissie y Tsong, 1980; Hofmann, 1986).

La aplicación de campos eléctricos produce un incremento del potencial a través de la membrana y como resultado se acumulan cargas opuestas en ambos lados de ésta, las cuales se atraen entre sí. Esta acumulación de cargas provoca por un lado una compresión que reduce el espesor de la membrana, con fuerzas elásticas o viscoelásticas restauradoras que se oponen a la electrocompresión. Cuando las fuerzas compresivas actúan más rápidamente, con disminución del espesor de la membrana, que las fuerzas elásticas restauradoras, se produce una ruptura local (Crowley, 1973; Dimitrov, 1984). Por otro lado, muchos canales proteicos sensibles al potencial de membrana se abren, permitiendo el flujo iónico a través de la membrana plasmática (Teissie y Tsong, 1980; Hofmann, 1986). También se pueden presentar alteraciones en la movilidad y en la actividad de enzimas de importancia metabólica (Guilliland y Speck, 1967; Hamilton y Sale, 1967), así como cambios en la organización interna de los organelos (Pothakamury *et al.*, 1997). Al elevar el valor del campo aplicado por encima de un valor crítico, los poros formados en la membrana y los canales proteicos se hacen irreversibles, con lo que se produce la lisis celular (Sale y Hamilton, 1968; Zimmermann *et al.*, 1974; Benz *et al.*, 1979; Teissie y Tsong, 1981).

Para la aplicación de CEAI en la conservación industrial de alimentos es necesario profundizar en el conocimiento de las variables más importantes del proceso, que pueden ser variables relacionadas con el microorganismo y el medio en que éste se encuentra, y variables asociadas al sistema de generación de los CEAI. En el primer grupo están la concentración y el tipo de electrolitos presentes en el medio, la temperatura, el pH y la conductividad eléctrica del medio, el tipo de microorganismo, la concentración celular y la etapa del crecimiento (Sale y Hamilton, 1967; Hülshager *et al.*, 1981; Jayaram y Castle, 1992; Pothakamury *et al.*, 1996). En el segundo grupo se encuentran la intensidad del campo, la forma de onda, la energía entregada, la frecuencia y el número de pulsos aplicados, el tiempo de tratamiento y la forma de los electrodos (Guilliland y Speck, 1967; Pothakamury *et al.*, 1995, 1997; Mizumo y Hory, 1998).

En el presente trabajo se estudió la inactivación de *Escherichia coli* ATCC 95922, por aplicación de CEAI. La cepa de *E. coli* fue inoculada en soluciones de glicerol, en jugos de frutas, y en caldo nutritivo, para luego evaluar la fracción letal que podía obtenerse al aplicar los CEAI, evaluando el efecto del pH y los grados Brix sobre la fracción letal, así como sus posibles interacciones.

La fracción letal (FL) permite cuantificar el grado de inactivación o inhibición del crecimiento que se obtiene con un tratamiento determina-

do sobre un microorganismo, y se define en la ecuación 1.

$$FL = (C_i - C_f) / C_f \quad (1)$$

Donde C_i es la concentración del microorganismo en el medio de crecimiento antes del tratamiento, y C_f es la concentración del microorganismo en el medio de crecimiento después del tratamiento.

La fracción letal puede expresarse en porcentaje multiplicando la ecuación 1 por 100 y es un valor inverso al porcentaje de supervivencia en una población microbiana determinada.

Materiales y Métodos

Microbiológicos

Tratamiento previo de la cepa. La cepa utilizada fue la *Escherichia coli* ATCC 95922, la cual se adquirió liofilizada y se reconstituyó en 50 ml de caldo nutritivo, con adición de 5 ml de glicerol al 10% como crioprotector. Luego de incubar por 15h a 37°C, se distribuyó en 5 tubos con 10 ml cada uno; 4 de estos tubos se guardaron a 0°C como reserva. El quinto tubo se adicionó a 100 ml de caldo nutritivo y se distribuyó en 55 tubos con 2 ml cada uno, que se almacenaron a 0°C, para su posterior utilización en los diferentes ensayos.

Preparación de la cepa para el estudio del efecto de la intensidad de campo: Para estudiar el efecto del nivel de campo sobre las células de *E. coli*, se tomó un tubo con 2 ml de inóculo conservado a 0°C, se le adicionó 8 ml de

caldo nutritivo y se incubó por 24h a 37°C para activar completamente todas las células en el medio de cultivo; de estos 10 ml se tomó 5 ml y se adicionaron a 20 ml de caldo nutritivo, incubándose por 4h, para permitir que el cultivo alcanzara la fase de crecimiento logarítmico, por ser esta la de mayor sensibilidad del microorganismo al tratamiento con CEAI (Pothakamury *et al.*, 1996). El cultivo de 4h se centrifugó a 3000 rpm por 5 min, se eliminó el sobrenadante y se redisolvió las células precipitadas en 8 ml de glicerol al 5%. Este procedimiento se repitió 3 veces en cada inóculo, con el objetivo de eliminar las sales que estuvieran presentes en el caldo de cultivo y que podían provocar la formación de arcos en las cubetas de electroporación. De la muestra así tratada se tomaron alícuotas de 80 µl y se colocaron en 5 cubetas de electroporación para aplicarles pulsos de 0, 5, 10, 15 y 20 kV/cm, respectivamente. A cada cubeta con las células suspendidas en glicerol al 5%, se le aplicó uno de los pulsos mencionados y se mantuvo en hielo. Este procedimiento se realizó por triplicado. La utilización de soluciones de glicerol y el procedimiento de centrifugación, se deben a que en esta etapa del estudio se requería establecer las condiciones que permitieran cubrir el mayor rango de intensidades de campo, sin que se presentaran arcos al interior de las cubetas en el momento de aplicar campos altos.

Preparación del cultivo para la aplicación de CEAI sobre E. coli inoculada en jugos de fruta: Después de observar el efecto de CEAI sobre *E. coli* inoculada en solución de glicerol al 5%, se pasó a evaluar el efecto de CEAI sobre *E. coli* inoculada en jugos de fruta, lo cual permitió observar el comportamiento del equipo generador de impulsos actuando sobre soluciones con presencia de electrólitos, ya que estos alteran algunas variables impor-

tantes en el tratamiento, como son la constante de tiempo (τ), la conductividad del medio y las fracciones letales obtenidas. En estos ensayos se aplicó una intensidad de 15 kV/cm, para no trabajar en el límite de capacidad entregada por el equipo generador de impulsos en este tipo de tratamientos (20 kV/cm). Esto se hizo necesario dado que se aplicarían dos pulsos consecutivos y los medios usados para suspender las células (jugos de fruta), presentan mayor conductividad que las soluciones de glicerol al 5%.

Para la inoculación de *E. coli* en los jugos de frutas, se tomó uno de los tubos con 2 ml conservados a 0°C y se hizo el mismo procedimiento anterior hasta llevarlo a la fase de crecimiento logarítmico, en este punto se tomó 1 ml y se diluyó hasta 10⁻² en solución de glicerol al 5%, 1 ml de esta dilución se adicionó a 9 ml de jugo y se sometieron a un tratamiento con dos pulsos de 15 kV/cm. Los jugos utilizados fueron seleccionados de una serie de 25 jugos, los cuales fueron probados inoculándolos con *E. coli* y cultivándolos durante 24 horas a 37°C, haciéndoles recuento en placas de Agar Endo (CMJ479) para determinar si entre los componentes del jugo existe alguno que pueda inhibir espontáneamente el crecimiento de *E. coli*. Con esta prueba se descartaron los que presentaban inhibición del crecimiento de *E. coli*, para evitar la interferencia de este efecto en el tratamiento con CEAI. Los jugos seleccionados fueron esterilizados a 121°C por 15 min para eliminar todos los microorganismos presentes antes de la inoculación; también se filtraron para eliminar las partículas sólidas no disueltas que pudieran favorecer la ruptura dieléctrica del medio.

Preparación del medio para estudiar el efecto del pH y los grados Brix: Para evaluar el efecto del pH y los grados Brix sobre la fracción letal obtenida con los CEAI en *E. coli*, se preparó caldo

nutritivo ajustando el pH por adición de ácido cítrico y los grados Brix por adición de sacarosa. A estas soluciones se les inoculó un cultivo con el mismo procedimiento anterior para llevarlo a la fase de crecimiento logarítmica, se les diluyó hasta 10⁻³ en caldo nutritivo, de esta dilución 80 µl se colocaron en cubetas de electroporación y se sometieron a un tratamiento con dos pulsos de 15 kV/cm.

A todas las cubetas, después del tratamiento en el electroporador, se les extrajo cuantitativamente los 80 µl de medio, diluyéndolos con 7020 µl de solución de glicerol al 5% (dilución 10⁻²), llevando luego hasta 10⁻⁴ para sembrar 1 ml por duplicado en placas con Agar Endo (CMJ479), se incubaron por 24h a 37°C y se hizo el recuento de las colonias típicas de *E. coli*.

Eléctricos

El equipo para generación de pulsos que se utilizó fue un electroporador BIO-RAD, con capacitancias variables y un voltaje máximo de 2500 voltios. El capacitor utilizado fue de 10 microfaradios y se fijó una resistencia en el equipo de 200 ohmios. Las cubetas para electroporación consistían de dos electrodos planos, paralelos, separados 0,1 cm dentro de material plástico aislante, formando una cámara de sección cuadrada con 80 µl de capacidad, en el interior de la cual se colocó la muestra a tratar. Las muestras se colocaron en las cubetas en condiciones totalmente asépticas. La forma de onda aplicada fue de decaimiento exponencial, con una constante de tiempo que dependía de la conductividad del medio de suspensión celular utilizado. Las cubetas es-

tuvieron sumergidas en hielo antes y después de la aplicación del CEAI, la superficie exterior de los electrodos, por ser metálicos, facilitó la transferencia de calor para mantener la temperatura del medio lo más baja posible. En los ensayos a diferentes intensidades de campo, se aplicó un solo pulso para poder aplicar niveles de campo de hasta 20 kV/cm, sin que se formara arco al interior de las cubetas. En estos ensayos las intensidades de campo utilizadas fueron 0, 5, 10, 15 y 20 kV/cm, tomando la cubeta correspondiente a 0 kV/cm como control. En los ensayos en que se aplicó dos pulsos de 15 kV/cm se dejó un intervalo de 1,5 min entre pulso y pulso, manteniendo la cubeta en hielo durante el tiempo entre pulsos.

La conductividad eléctrica de los jugos se midió con un conductímetro Shott Gerate CG858, el cual se calibró para hacer las lecturas a 23°C.

Diseño de Experimentos

Se adoptó un diseño factorial 2³ (Montgomery, 1991), para evaluar el efecto de los factores (intensidad de campo, pH y grados Brix) sobre la variable respuesta (Fracción letal=FL). El ajuste estadístico fue hecho con el software Design - Expert, versión 5.0. El diseño factorial completo se hizo por duplicado. El medio utilizado para la suspensión celular en los ensayos de esta parte del estudio fue el caldo nutritivo, por ser un medio donde *E. coli* crece sin restricciones hasta 37°C (Pascual, 1992). Los datos experimentales obtenidos del diseño factorial fueron ajustados al polinomio en la ecuación 2 (Montgomery, 1991).

$$FL = \alpha_0 + \alpha_1 X_1 + \alpha_2 X_2 + \alpha_3 X_3 + \alpha_{12} X_1 X_2 + \alpha_{13} X_1 X_3 + \alpha_{23} X_2 X_3 + \alpha_{123} X_1 X_2 X_3 \quad (2)$$

Donde los α son las constantes de ajuste y X_1 , X_2 , X_3 son variables codificadas para nivel de campo eléctrico, pH y grados Brix, respectivamente.

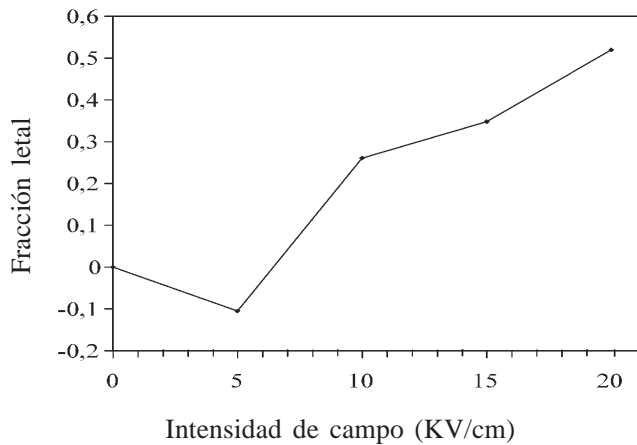


Figura 1. Fracción letal por aplicación de un pulso de CEAI sobre células de *E. coli* inoculadas en soluciones de glicerol al 5% en función de la intensidad del campo aplicado.

Resultados y Discusión

Efecto de la Intensidad de Campo Eléctrico

La curva de crecimiento de *E. coli* (no mostrada) determinó que a las 4h se encontraba en la fase de crecimiento logarítmico. Esta fase permite el mayor efecto letal sobre las células de *E. coli* (Pothakamury *et al.*, 1996), por lo que se escogió para la aplicación de los CEAI en todos los experimentos.

En estos ensayos se definió en el equipo una resistencia de 200 ohmios y una capacitancia de 10 microfaradios, obteniéndose constantes de tiempo para la onda de decaimiento exponencial de 2 ms.

La Figura 1 muestra la fracción letal de diferentes intensidades de campo sobre células suspendidas en soluciones de glicerol al 5%, usando un pulso de decaimiento exponencial. Esta solución tiene baja conductividad eléctrica y permite alcanzar mayores intensidades de campo para un cultivo determinado. Las intensidades por encima de 20 kV/cm, presentaron arco eléctrico al interior o exterior de las cubetas, consecuente con lo reportado por Hülshager *et al.* (1981). Los voltajes aplicados por encima de 20 kV/cm y las altas concentraciones de células pueden generar también la for-

mación de arcos, al igual que la presencia de sales o temperaturas elevadas, ya que estas aumentan la conductividad eléctrica del medio. Cada punto en la Figura 1 representa el promedio de tres lecturas.

En la Figura 1, la fracción letal negativa significa que el tratamiento no inhibió el crecimiento, por el contrario los recuentos en las cubetas tratadas fueron mayores que en los controles. La posible explicación a este hecho se basa en que el voltaje crítico para letalidad de un pulso de campo eléctrico externo sobre *E. coli*, tiene un valor cercano a 10 kV/cm (Sale y Hamilton, 1968; Zimmermann *et al.*, 1974; Hülshager *et al.*, 1981), es decir, 5 kV/cm por encima del campo aplicado en estas cubetas. En este caso, aunque no se presente efecto letal, sí puede generarse efecto térmico, porque la aplicación del pulso aumenta la temperatura del medio unos cuantos grados centígrados (Sale y Hamilton, 1968; Zimmermann *et al.*, 1974; Hülshager *et al.*, 1981), lo que puede incrementar los recuentos en estas cubetas con respecto a los controles.

Aplicación de CEAI a *E. coli* Inoculada en Jugos de Frutas

Las fracciones letales obtenidas con la aplicación de dos

TABLA I
FRACCIÓN LETAL OBTENIDA AL APLICAR DOS PULSOS DE 15 KV/CM DE CEAI SOBRE LA *E. coli* INOCULADA EN JUGOS DE FRUTAS

JUGO	pH	°Brix	Conductividad (µS/cm)	τ (ms)	Fracción Letal
Guanábana	3,62	9,8	1312	0,97	0,9278
Banano	4,83	9,4	1707	0,84	0,9489
Guayaba	4,01	9,2	1192	1,20	0,7692
Zanahoria	6,00	8,2	1849	0,85	0,6333
Papaya	4,84	7,9	1289	0,97	0,9730
Sandía	4,88	6,4	984,5	1,03	0,9849
Aguacate	6,01	4,2	1270,5	0,55	0,6042
Melón	6,36	5,5	1741	1,02	0,9901
Pera	4,15	8,8	1007,5	1,27	0,9910
Manzana	4,2	12,8	807,5	1,36	0,9904

pulsos de 15 kV/cm a *E. coli* inoculada en jugos de fruta se presentan en la Tabla I, con los valores de pH, conductividad y grados Brix, para cada jugo. Además se presenta el valor de la constante de tiempo (τ) de la onda obtenida en cada caso. La resistencia del equipo se fijó en 200 ohmios y la capacitancia en 10 microfaradios, y el tiempo entre pulsos fue de 1,5 min.

Cada valor en la Tabla I representa el promedio de dos lecturas. Todos los jugos utilizados en este estudio fueron evaluados para garantizar que no fueran inhibidores naturales de *E. coli*, por lo tanto la letalidad obtenida es producto de la aplicación del campo eléctrico y de su interacción con alguna de las variables involucradas en el proceso.

La constante de tiempo (τ), es el producto RC (resistencia total x capacitancia) definido como el tiempo necesario para que el voltaje máximo disminuya al 36%, y se toma como el tiempo efectivo de aplicación del pulso (Jayaram y Castle, 1992). La resistencia total se ve afectada por la conductividad del medio a tratar, lo que se refleja en los diferentes valores de fracción letal en cada uno de los jugos. La constante de tiempo es entonces una variable que depende de otros factores, difícil de definir previamente;

pero está relacionada con la fracción letal, teniendo en cuenta que τ está asociada con el tiempo del tratamiento, el cual está dado como τ x n (duración del pulso x número de pulsos; Hülshager *et al.*, 1981; Jayaram y Castle, 1992; Pothakamury, 1995; Quin *et al.*, 1998).

La regresión lineal de los valores de constante de tiempo (τ) y fracción letal, presentados en la Tabla I, presentó una relación estadísticamente significativa al 90% de confianza (P = 0,060), establecida por la ecuación 3.

$$FL = 0,478 + 0,401\tau \quad (3)$$

Esta ecuación establece que con mayores tiempos de tratamiento mayor será la fracción letal obtenida, correspondiendo con lo reportado por Hülshager *et al.* (1981), Jayaram y Castle (1992), Pothakamury *et al.* (1995) y Quin *et al.* (1998).

La conductividad del medio está asociada con la formación de arcos en las cubetas y con la constante de tiempo (Jayaram y Castle, 1992), por lo tanto está asociada con la fracción letal de los CEAI. Por otro lado, algunos iones como Ca²⁺ y Mg²⁺ han sido reportados con efectos importantes en la protección de las membranas bacterianas contra CEAI, por lo que al estar presentes

TABLA II
NIVELES DE LAS VARIABLES
DEL DISEÑO FACTORIAL 2³

FACTOR	NIVELES REALES		NIVELES CODIFICADOS	
	BAJO	ALTO	BAJO	ALTO
Campo (kV/cm)	10	15	-1	+1
°Brix (%)	1,7	5,7	-1	+1
pH	4,2	7,2	-1	+1

en algunos jugos afectan la letalidad de los CEAI en ellos (Hülshager *et al.*, 1981).

El pH y los grados Brix son parámetros muy importantes para caracterizar un jugo de fruta, y pueden presentar diferentes valores según el proceso de elaboración al que se hayan sometido los jugos. Su influencia en la fracción letal de los CEAI requiere ser evaluada, pero en las muestras de la Tabla I, la variabilidad que presentan los diferentes jugos puede opacar el efecto del pH o de los grados Brix. Por lo tanto, para estudiar el efecto de estas variables se debe definir un medio en el que sólo se modifiquen el pH y los Brix, pero que las demás variables en el medio permanezcan fijas, ya que el efecto de otros electrolitos tiene influencia importante (Hülshager *et al.*, 1981; Jayaram y Castle, 1992). Además, dicho medio no debe ser inhibidor del crecimiento de la *E. coli*.

Influencia del pH y los °Brix Sobre la Fracción Letal

El pH y los grados Brix dependen básicamente de los componentes del medio líquido. En la primera parte de este trabajo se determinó el efecto del incremento de la intensidad de campo sobre las células de *E. coli* en un medio de muy baja conductividad, con un pH y grados Brix muy diferentes a los que se encuentran en un jugo de fruta. Para determinar cómo influyen simultáneamente el pH, los grados Brix y la intensidad de campo eléctrico aplicado sobre las células de *E. coli*, además de las interacciones de estas

variables y sus posibles efectos, se adoptó un diseño factorial 2³, con una réplica, tomando el pH, los grados Brix y la intensidad de campo como factores, con dos niveles cada uno. La variable respuesta es la Fracción Letal. La codificación de los factores y los niveles de cada uno, se presentan en la Tabla II. En la Tabla III se presenta el diseño factorial 2³ y una réplica, con los valores de fracción letal obtenidos respectivamente.

En la Tabla III (experimentos 3 y 14) se señala la mejor combinación de los factores para las condiciones de trabajo, las cuales se obtuvieron con una intensidad de campo alta (15 kV/cm), pH alto (7,2) y grados Brix bajos (1,7%). A la combinación de los factores a los que se obtuvo menor fracción letal (Tabla III, experimentos 1 y 13), con intensidad de campo baja (10 kV/cm), grados Brix altos (5,7%) y pH alto (7,2) se observó un incremento en los recuentos con respecto a los controles, lo que se puede deber a que se está en el límite inferior (10 KV/cm) de intensidad de campo letal para *E. coli* (Sale y Hamilton, 1968; Zimmermann *et al.*, 1974; Hülshager *et al.*, 1981). Además se incrementó la concentración de sacarosa, que es una fuente de carbono importante para este microorganismo (Rose, 1977). Todos estos factores pueden conjugarse para el incremento en la permeabilidad de la membrana, sin llegar a ser letales a estos niveles, pero si aceleran el paso de nutrientes como la sacarosa, favoreciendo el crecimiento de la *E. coli*.

TABLA III
DISEÑO FACTORIAL 2³ Y RESULTADOS
EXPERIMENTALES DE FRACCIÓN LETAL

Corrida N°	Factores			Fracción letal
	Campo	°Brix	pH	
1	-	+	+	-0,039
2	+	+	-	0,861
3	+	-	+	0,917
4	+	+	+	0,816
5	-	-	-	0,167
6	-	-	+	0,800
7	-	+	-	0,538
8	+	+	+	0,549
9	+	-	-	0,683
10	-	-	+	0,700
11	+	-	-	0,758
12	-	+	-	0,506
13	-	+	+	-0,449
14	+	-	+	1,000
15	+	+	-	0,675
16	+	-	-	0,024

El modelo ajustado para los factores e interacciones con efectos estadísticamente significativos, en términos de los factores reales, se presenta en la ecuación 4.

Los resultados del análisis de regresión del diseño y los datos del análisis de varianza para el modelo, se presentan en la Tabla IV.

Los coeficientes en la Tabla IV corresponden a los factores codificados y en la ecuación (4) a los factores en sus valores reales.

$$FL = - 2,09 + 0,10 \cdot \text{Campo} + 0,36 \cdot \text{°Brix} + 0,27 \text{ pH} - 0,073 \cdot \text{°Brix} \cdot \text{pH} \quad (4)$$

La Tabla IV permite observar que el factor más importante de los tres estudiados, es la intensidad del campo aplicado (P= 0,0007), que tie-

ne un efecto estadísticamente significativo sobre la fracción letal. Menos importantes los grados Brix (P= 0,0905), también tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la fracción letal. El pH (P= 0,9256), como efecto principal, no es estadísticamente significativo, correspondiendo con lo observado por Hülshager, 1981. Un aspecto verdaderamente importante, es la significancia de la interacción entre el pH y los grados Brix (P= 0,0019), la cual es casi

tan significativa como el nivel de campo.

La gráfica de interacción se presenta en la Figura 2, donde se puede observar que

TABLA IV
RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE REGRESIÓN
DEL DISEÑO FACTORIAL 2³

Factor	Coefficiente	Valor - T	Valor - P
Intercepto	0,53		
Campo	0,25	4,68	0,0007
°Brix	-0,099	-1,86	0,0905
pH	5,125 x 10 ⁻³	0,096	0,9256
Interacción °Brix - pH	-0,22	-4,07	0,0019

R² = 0,7919; F= 10.46 con 4 y 11 grados de libertad.

un incremento en el pH con un bajo valor de grados Brix, puede incrementar la fracción letal de los CEAI, mientras que un cambio equivalente en pH, a un valor alto de grados Brix, ocasiona el efecto contrario sobre la fracción letal. El efecto observado a grados Brix altos, concuerda con los reportes de Hamilton y Sale (1967), quienes observaron plasmólisis y muerte de *E. coli*, al aplicarle CEAI en una solución hipertónica de pH 7,2 y 10% de sacarosa. Para lo observado con grados Brix bajos, no se tiene una explicación clara.

Conclusiones

La bacteria *E. coli* puede ser eliminada en jugos de frutas usando CEAI, alcanzando efectos letales de hasta 99%, como prueban los resultados obtenidos al aplicar dos pulsos de 15 kV/cm en algunos jugos en este estudio. La máxima intensidad de campo que se puede aplicar está limitada por la concentración celular, la temperatura y la conductividad del medio. En las condiciones desarrolladas en este trabajo, intensidades de campo por encima de 20 kV/cm, pueden generar arcos indeseables en el interior o exterior de las cubetas de electroporación.

La intensidad del campo eléctrico aplicado influye notablemente en los valores de fracción letal obtenidos al aplicar CEAI a *E. coli*, no siendo igual la influencia del pH o los grados Brix, como variables independientes, pero si como variables combinadas. Sus interacciones pueden tener efectos importantes, ya sea para incrementar o disminuir la fracción letal obtenida con el tratamiento. Los incrementos de pH tienen efectos positivos sobre la fracción letal, cuando los grados Brix son bajos; y tienen efectos negativos cuando los grados Brix son altos. Estos resultados son válidos para las condiciones de trabajo en este estudio, y no se pueden extrapolar indiscriminadamente a otras condiciones.

Otros microorganismos importantes como contaminantes de jugos de frutas son las levaduras, las cuales resisten pH ácidos y concentraciones de sacarosa mayores que las bacterias (Comisión Internacional Sobre Especificaciones Microbiológicas, 1985; Jay, 1978; Pascual, 1992) pero se ha encontrado que muestran una mayor sensibilidad a los CEAI (Sale y Hamilton, 1967; Quin, 1998) sugiriendo que los tratamientos estudiados podrían ser efectivos contra muchos otros microorganismos alternativos de jugos además de la *E. coli*.

El trabajar con el diseño de experimentos utilizado es claramente ventajoso comparado con los métodos en los cuales una sola variable es modificada a la vez. Estos métodos no solamente son tediosos y de alto costo, sino que pueden prestarse para malas interpretaciones de los resultados, ya que se pueden solapar los efectos de interacciones entre diferentes factores. El diseño de experimentos permite apreciar efectos principales e interacciones entre variables, con un número reducido de experimentos, lo cual disminuye costos en la investigación y ahorra tiempo, permitiendo orientar el rumbo a seguir en futuras investigaciones

En Colombia, debido al bajo grado de tecnificación en algunas pequeñas y medianas empresas, se presenta una alta manipulación del producto, incrementando la posibilidad de contaminación. *E. coli* se encuentra en el contenido intestinal del hombre y los animales, por lo que es un buen indicador de la calidad higiénica de los alimentos, principalmente por su relativa resistencia a pH ácido (Rose, 1977, Jay, 1978; Pascual, 1992). Por lo anterior las posibilidades de inactivación de *E. coli* con técnicas diferentes al calor, siempre redundarán en mejorar la calidad del producto que llega a los consumidores.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue financiado por el Comité para el De-

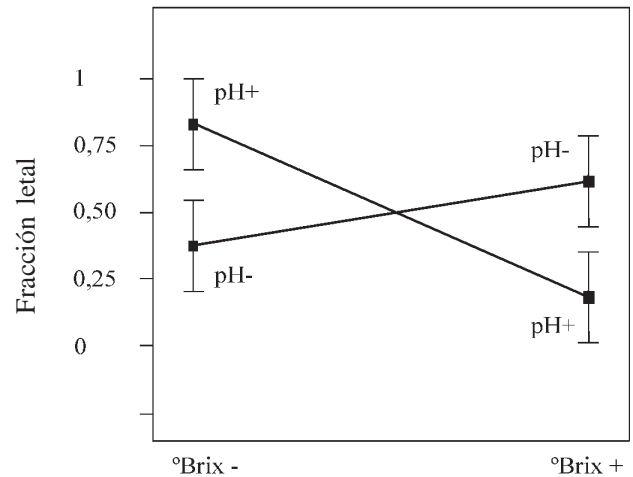


Figura 2. Interacción entre pH y °Brix y su efecto sobre la fracción letal obtenida al aplicar dos pulsos de 15 kV/cm a células de *E. coli* inoculadas en caldo nutritivo.

sarrollo de la Investigación, CODI, de la Universidad de Antioquia. Los autores agradecen a los Dres. Luis Fernando García y Luis Fernando Barrera de la Facultad de Medicina, a los estudiantes María Dulfary Sánchez Pino, Diana Patricia Rios y Haen Luis Amaya, de la Universidad de Antioquia, y a Kennet Roy Cabrera, de la Universidad Nacional de Colombia.

REFERENCIAS

- Barbosa G, Gongora M, Swanson B (1998) Nonthermal electrical methods in food preservation. *Food Science and Technology International* (Oct). pp. 363-370.
- Bates G, Gaynor J, Shekhawat N (1983) Fusion of plant protoplasts by electric fields. *Plant Physiol*. 72: 1110-1113.
- Benz R, Beckers F, Zimmermann U (1979) Reversible electrical breakdown of lipid bilayer membranes: A charge - pulse relaxation study. *J. Mem. Biol*. 48: 181-204.
- Comisión Internacional sobre Especificaciones Microbiológicas (1985) *Ecología Microbiana de los Alimentos*.
- Crowley J (1973) Electrical breakdown of bimolecular lipid membranes as an electromechanical instability. *Biophys. J.* 13: 711-724.
- Dallas G (1997) Minimally Processed Fruits and Vegetables: Reducing Microbial Load by Nonthermal Physical Treatments. *Food Technology* 51: 66.
- Dimitrov D (1984) Electric field - induced breakdown of lipid bilayers and cell membranes: A thin viscoelastic film model. *J. Mem. Biol.* 78: 53-60.
- Dun J (1996) Pulsed light and pulsed electric field for foods and eggs. *Poultry Science* 75: 1133-1136.
- Gilliland S, Speck M (1967a) Inactivation of microorganisms by electrohydraulic shock. *Applied Microbiol.* 15: 1031-1037.
- Gilliland S, Speck M (1967b) Mechanism of the bactericidal action produced by electrohydraulic shock. *Applied Microbiol.* 15: 1038 - 1044.
- Gould G (1995) *New Methods of Food Preservation*. Blackie Academic & Professional. Londres. 324 pp.
- Hamilton W, Sale A (1967) Effects of high electric fields on microorganisms: II. Mechanism of Action of the Lethal Effect. *Biochim. Biophys. Acta* 148: 789-800.
- Hofmann G (1986) Electronic genetic-physical and biological aspects of cellular electromagnetic manipulation. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine* (Dec). pp. 6-25.
- Hulshager H, Potel J, Niemann E (1981) Killing of bacteria with electric pulses of high field strength. *Radiation Environm. Biophys.* 20: 53-65.
- Jay JM (1978) *Microbiología Moderna de los Alimentos*. Acribia, Zaragoza. pp 301-302.

- Jayaram S, Castle G (1992) Kinetics of sterilization of *Lactobacillus brevis* cells by the application of high voltage pulses. *Biotechnol. Bioeng.* 40: 1412–1420.
- Lo M, Tsong T, Conrad M, Strittmater S, Hester L, Snyder S (1984) Monoclonal antibody production by receptor-mediated electrically induced cell fusion. *Nature.* 310: 792–794.
- Martin O, Zhang Q, Castro A, Barbosa G, Swanson B. Pulsed electric fields of high voltage to preserve foods. Microbiological and engineering aspects of the process. *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Alim.* 34: 1–34.
- Martin O, Rosell J, Barbosa G (1997) Campos eléctricos elevados: Una alternativa para la conservación de alimentos. *Automática e instrumentación* N° 272: 59–62.
- Mertens B, Knorr D (1992) Developments of Nonthermal Processes for Food Preservation. *Food Technology* (May): 124–133.
- Mizumo A, Hori Y (1988) Destruction of Living Cells by Pulsed High – Voltage Application. *IEEE Trans. Ind. Appl.* 24: 387–393.
- Montgomery, D (1991) *Diseño y Análisis de Experimentos.* Iberoamérica, México. 589 pp.
- Pagán R, Esplugas S, Gongora M, Barbosa G, Swanson B (1998) Inactivation of *Bacillus subtilis* spores using high intensity pulsed electric fields in combination with other food conservation technologies. *Food Sci. Technol. Internat.* N° 4: 33–44.
- Pascual M (1992) *Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas.* Díaz de Santos, Madrid. pp 21–27.
- Pothakamury U, Monsalve A, Barbosa G, Swanson B (1995) High voltage pulsed electric field inactivation of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus delbrueckii*. *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Alim.* 35(1): 101–107.
- Pothakamury U, Vega H, Zhang Q, Barbosa G, Swanson B (1996) Effect of Growth Stage and Processing Temperature on the Inactivation of *E. coli* by Pulsed Electric Fields. *J. Food Protection* 59: 1167–1171.
- Pothakamury U, Barbosa G, Swanson B, Spence B (1997) Ultrastructural changes in *Staphylococcus aureus* treated with pulsed electric fields. *Food Sci. Technol. Internat.* 3: 113–121.
- Quin B, Pothakamury U, Vega O, Martin O, Barbosa G, Swanson B (1995) Food Pasteurization Using High – Intensity Pulsed Electric Fields. *Food Technol. (Dic)*: 55–59.
- Quin B, Barbosa G, Swanson B, Pedrow P, Olsen R (1998) Inactivating Microorganisms Using a Pulsed Electric Field Continuous Treatment System. *IEEE Trans. Ind. Appl.* 34: 43–50.
- Rose AH (1977) *Microbiología Química.* Alambra, Madrid. 112 pp.
- Rosell J, Arantegui J, Barbosa G (1998) Aplicación de los pulsos eléctricos de alta tensión para la conservación de alimentos. *Alimentación, Equipos y Tecnología* (jul-ago): 109–114.
- Sale H, Hamilton W (1967) Effects of high electric fields on microorganisms: I. Killing of Bacteria and Yeasts. *Biochim. Biophys. Acta* 148: 781 – 788.
- Sale J, Hamilton W (1968) Effects of high electric fields on microorganisms: III. Lysis of erythrocytes and protoplast. *Biochim. Biophys. Acta* 163: 37–43.
- Salhani N, Schnabl H, Kuppers G, Zimmermann U (1982) The hydraulic conductivity as a criterion for the membrane integrity of protoplasts fused by an electric field pulse. *Planta* 155: 140–145.
- Teissie J, Tsong T (1980) Evidence of voltage – induced channel opening in Na/K ATPase of human erythrocyte membrane. *J. Mem. Biol.* 55: 133–140.
- Teissie J, Tsong T (1981) Electric field induced transient pores in phospholipid bilayer vesicles. *Biochemistry* 20: 1548–1554.
- Teissie J, Knutson V, Tsong T, Lane M (1982) Electric pulse – induced fusion of 3T3 cells in monolayer culture. *Science* 216: 537–538.
- Zapata J, Martinez O, Salazar B, Moreno G, Gallego F (1999) Conservación de Alimentos con Campos Eléctricos Pulsados de Alto Voltaje. *Vitae* 6: 11–18.
- Zimmermann G, Pilwat GY, Riemann F (1974) Dielectric breakdown of cell membranes. *Biophys. J.* 14: 881–897.
- Zimmermann G, Vienken J (1982) Electric field – induced cell-to-cell fusion. *J. Mem. Biol.* 67: 165–182.