

Actividad antibacteriana de dos desinfectantes en función de la temperatura y el tiempo de contacto

*José Neptalí Hernández y Adalgisa Rengel**

Departamento de Tecnología de Alimentos, Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar, Universidad de Oriente, Núcleo de Nueva Esparta, Boca del Río, Isla de Margarita. Apartado 147. Porlamar, Venezuela

Recibido: 25-01-02 Aceptado: 18-09-02

Resumen

Se estudió la actividad antibacteriana de una sal de amonio cuaternario y del hipoclorito de sodio en función de la temperatura y el tiempo de contacto, siguiendo el método de dilución propuesto por la A.O.A.C. (1980), ensayando ambos desinfectantes entre 10 y 100 ppm a 30 y 45°C, durante 5, 10 y 15 min y empleando cilindros de acero inoxidable como superficies de prueba y cepas "salvajes" de *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* como microorganismos de ensayo. Los resultados fueron agrupados en Tablas de contingencia, evaluándose la significación de las diferencias entre los grupos de cada Tabla mediante una prueba χ^2 . Se obtuvo que la actividad antibacteriana de los desinfectantes estudiados depende del microorganismo sobre el que estos actúen, así como de la temperatura y en algunos casos del tiempo de contacto entre la superficie contaminada y el desinfectante, observándose que el aumento de la temperatura incrementó la actividad antibacteriana de los desinfectantes ensayados, mientras que el aumento del tiempo de contacto incrementó la actividad del hipoclorito de sodio y en algunos casos la de la sal de amonio cuaternario. De igual manera se apreció que *S. aureus* fue el microorganismo más sensible a los dos desinfectantes estudiados y que la sensibilidad de los microorganismos Gram positivos estudiados, ante las sales de amonio cuaternario, fue mucho mayor que la exhibida por *Salmonella* spp. Por su parte, *B. cereus* fue muy resistente al hipoclorito de sodio. Así mismo, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de las Tablas de contingencia evaluadas.

Palabras clave: Actividad antibacteriana; desinfectantes; microorganismos; temperatura; tiempo de contacto.

Antibacterial activity of two disinfectants as a function of the temperature and the contact time

Abstract

The antibacterial activity of a quaternary ammonium salt and of the sodium hypochlorite as a function of the temperature and the contact time was studied following the dilution method proposed by the A.O.A.C. (1980), assaying both disinfectants between 10 and 100 ppm at 30 and 45°C, during 5, 10 and 15 min of contact and employing stainless steel cylinders as test surfaces and "wild" strains of *Salmonella* spp., *S. aureus* and *B. cereus* as test microorganisms.

* Autor para la correspondencia.

The results were grouped in contingency Tables, evaluating the significance of the differences among the groups of each table applying a χ^2 test. The antibacterial activity of the disinfectants studied depends on the microorganism tested, the temperature and the contact time among the contaminated surface and the disinfectant, observing that the increase in temperature incremented the antibacterial activity of both disinfectants, while the increase of the contact time increased the activity of the sodium hypochlorite and in some cases that of the quaternary ammonium salt. It was also noted that *S. aureus* was the most sensible microorganism to both disinfectants, while the Gram positive microorganisms exhibited more sensibility to the quaternary ammonium salt than *Salmonella* spp. On the other hand *B. cereus* was very resistant to the sodium hypochlorite. There were not statistically significant differences among the groups of the contingency tables evaluated.

Key words: Antibacterial activity; contact time; disinfectants; microorganisms; temperature.

Introducción

La presencia de microorganismos en los ambientes en que se procesan alimentos, es una fuente potencial de contaminación que puede conducir al deterioro de los alimentos o a la transmisión de microorganismos causantes de enfermedades (1). Por su parte, las prácticas de limpieza y desinfección de las estructuras de las plantas procesadoras y de los equipos presentes en éstas, ayudan a prevenir y eliminar los sitios potenciales para el crecimiento de microorganismos (2).

Un desinfectante es un agente, por lo general químico, capaz de matar las formas en desarrollo, pero no necesariamente las esporas, de los microorganismos; es decir, es aquel producto capaz de reducir a niveles despreciables la velocidad de crecimiento de patógenos y de otros microorganismos presentes en un determinado material. Así mismo, por actividad antibacteriana de un desinfectante se entiende la capacidad de dicho agente para destruir microorganismos (3, 4).

El tiempo de exposición, pH, temperatura, dureza u otras sustancias interferentes presentes en el agua, el grado de limpieza de las superficies a desinfectar, así como la concentración de los gérmenes y la concentración del producto desinfectante, son

los factores más importantes que afectan las actividades de saneamiento (5, 6).

Los compuestos clorados, en una gran variedad de formas, son probablemente los desinfectantes más populares y comúnmente utilizados. Cuando soluciones concentradas de hipoclorito de sodio son disueltas en agua, hay un descenso en el pH debido a la formación de ácido hipocloroso, el cual es un fuerte oxidante, que aparentemente destruye las bacterias reaccionando y rompiendo las membranas celulares (5).

Cuando las soluciones de cloro entran en contacto con los microorganismos, se produce un efecto letal en estos, siempre que la concentración y el tiempo de contacto sean suficientes. Algunas de las teorías que explican este efecto se basan en la postulación de reacciones de oxidación de los componentes de la célula, en la formación de cloraminas tóxicas por la acción del cloro en el material protoplasmático y en la inactivación por el cloro de enzimas esenciales en el metabolismo celular (3).

Los desinfectantes a base de amonio cuaternario son agentes catiónicos con capacidad de penetración, rápida actividad a bajas concentraciones y propiedades surfactantes, humectantes y detergentes (5). El mecanismo de su acción germicida no se ha establecido completamente, sin embargo se

sabe que está asociado con la inactivación de enzimas, desnaturalización de las proteínas celulares y rompimiento de las membranas celulares; es decir, que los compuestos de amonio cuaternario pueden actuar en la membrana citoplasmática microbiana, causando daños que conllevarían a la pérdida de los constituyentes citoplasmáticos y la posterior muerte celular (5, 7).

La presente investigación estuvo orientada a estudiar el efecto de la temperatura y el tiempo de contacto sobre la actividad antibacteriana de dos desinfectantes comerciales de uso común en la industria alimentaria, así como a diferenciar la actividad de dichos desinfectantes frente a microorganismos "salvajes" comúnmente transmitidos por alimentos, lo cual constituye el punto de partida para el diseño de planes de limpieza y desinfección óptimos, en donde se conjuguen de manera eficaz el tipo de desinfectante a utilizar, la concentración y temperatura más adecuada del mismo y el tiempo de contacto más apropiado entre la superficie a sanear y el desinfectante, en función de la flora bacteriana que pudiera encontrarse en dicha superficie.

Materiales y Métodos

La realización del estudio estuvo basada en el método de dilución propuesto por la A.O.A.C. (8) para estudios de desinfectantes miscibles en agua, que permitan determinar las máximas diluciones efectivas para las prácticas de desinfección.

Desinfectantes

Se emplearon dos desinfectantes: uno a base de cloruro de n-alquil dimetil bencil amonio al 1,6% (A) y otro a base de hipoclorito de sodio al 5,25% (B), los cuales fueron adquiridos en comercios dedicados al expendio de productos para uso industrial. El empleo de estos dos desinfectantes se fundamentó en que cada uno posee un ingrediente activo diferente, con distintos modos de acción; además estos desinfectantes son

los más comúnmente usados en las prácticas de desinfección llevadas a cabo en la industria alimentaria, los de más fácil adquisición y cuyo uso está recomendado.

Temperaturas y Tiempos de Contacto

Se ensayó con dos temperaturas (30 y 45°C) y con tres tiempos de contacto (5, 10 y 15 min). Se eligieron tales temperaturas debido a que las prácticas de desinfección en la industria alimentaria venezolana, generalmente son efectuadas utilizando agua a temperatura ambiente, la cual posee una temperatura alrededor de los 30°C; así mismo, como se propuso estudiar el efecto de la temperatura sobre la actividad antibacteriana de los desinfectantes mencionados, se consideró necesario establecer una temperatura superior a 30°C, y tomando en cuenta que el hipoclorito de sodio es inestable a temperaturas superiores a los 50°C, se estableció que los ensayos deberían efectuarse a una temperatura inferior a ésta; además, 45°C es un valor cercano al límite máximo del rango de crecimiento de los microorganismos estudiados.

Microorganismos de Ensayo

Como contaminantes de las superficies de prueba, se utilizaron cepas "salvajes" de *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, aisladas en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos-IIC-ECAM, y provenientes de diferentes alimentos. La selección de estos microorganismos se debió a que cada uno de ellos es exponente de los principales tipos de microorganismos presentes en alimentos.

Superficies de Prueba

Se utilizaron cilindros de acero inoxidable de 6 mm de diámetro interno, 8 mm de diámetro externo y 10 mm de longitud.

Procedimiento

Basándose en lo establecido por la A.O.A.C. (8), los cultivos de los diferentes microorganismos se mantuvieron en agar

nutritivo a 5°C, lo que constituyó el "stock" de cultivo. De cada "stock" se inocularon tubos de ensayo que contenían 10 mL de caldo nutritivo, que fueron incubados durante 24 h a 37°C. A partir de éstos, por cada tratamiento se efectuó una inoculación con un asa de platino de 4 mm de diámetro, en tres tubos de ensayo (25 x 150 mm) que contenían 10 mL de caldo nutritivo, los cuales fueron incubados a 37°C durante 24 h. En cada uno de estos cultivos se sumergieron 10 cilindros de acero inoxidable previamente esterilizados, durante un tiempo de 15 min, al cabo de los cuales fueron removidos del caldo y colocados en posición vertical en una placa de Petri estéril, cuyo fondo contenía una doble capa de papel de filtro Whatman N° 2, para seguidamente, una vez tapadas las placas, secarlos en una estufa a 37°C durante 30 min.

Antes de cada ensayo, los cilindros fueron lavados con NaOH 1,0 N, posteriormente enjuagados con agua desionizada y seguidamente colocados en grupos de 30 cilindros en matraces Erlenmeyer, para luego cubrirlos con solución de asparagina (0,1% en agua destilada), con la finalidad de evitar cambios en el pH del medio. Seguidamente el matraz fue taponado con algodón y esterilizado durante 20 min a 121°C. Al cabo de este tiempo se dejó enfriar, y luego se mantuvo a temperatura ambiente hasta el momento en que se utilizaron los cilindros.

Para determinar la población bacteriana a la que fueron expuestas las superficies de prueba, inmediatamente después de removidos los cilindros de los tubos con caldo nutritivo, se realizó de este caldo un recuento total en placas, utilizando agar nutritivo e incubando a 37°C durante 24 h. En lo referente a la población bacteriana de *Salmonella* spp. empleada para los ensayos respectivos, ésta estuvo comprendida entre $1,0 \times 10^9$ y $1,4 \times 10^9$ UFC/mL; por su parte, los recuentos de *Staphylococcus aureus* estuvieron entre $2,2 \times 10^8$ y $3,0 \times 10^8$ UFC/mL y la población bacteriana de *Bacillus cereus* es-

tuvo comprendida entre $4,4 \times 10^7$ y $5,6 \times 10^7$ UFC/mL.

A continuación, de cada desinfectante se realizaron diluciones con agua desionizada. Para ambos desinfectantes, la máxima concentración del ingrediente activo ensayada fue de 100 ppm. A partir de esta máxima concentración se efectuaron diluciones en rangos decrecientes de 10%, para un total de 10 diluciones.

Seguidamente, se colocó con una aguja de platino, un cilindro contaminado y seco por cada tubo de ensayo (17 x 150 mm) con 10 mL de cada una de las diluciones del desinfectante estudiado; dichos tubos se colocaron en una gradilla metálica, la cual estuvo dispuesta en un baño de agua a la temperatura preestablecida, durante 15 min antes de cada ensayo. Una vez colocados los cilindros en los tubos de ensayo con la solución desinfectante, estos fueron mantenidos en el baño de agua a la misma temperatura, durante el tiempo de contacto preestablecido; al transcurrir éste, se procedió a extraer los cilindros (con una aguja de platino) y a colocarlos individualmente en un tubo de ensayo (17 x 150 mm) con 10 mL de caldo tripticosa soya (medio de subcultivo), para posteriormente incubarlos a 37°C durante 48 h. Al transcurrir este tiempo se verificó si en los medios de subcultivo hubo o no hubo crecimiento bacteriano. Cada ensayo se efectuó por triplicado.

El punto crítico de desinfección fue aquel donde se inhibió el crecimiento bacteriano en los tres medios de subcultivo en que se sembraron los cilindros provenientes de un mismo tratamiento.

Análisis Estadístico

Por cada combinación microorganismo-desinfectante, se elaboró una Tabla de contingencia 3 x 2, en donde se indicaron los puntos críticos de desinfección correspondientes a los tres tiempos de contacto y dos temperaturas estudiadas en dichas combinaciones. La significación de las dife-

rencias entre los grupos de cada Tabla, fue evaluada a través de una prueba χ^2 con $\alpha=0,05$, lo que posteriormente permitió diferenciar la actividad antibacteriana de los dos desinfectantes estudiados, sobre las cepas de *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*.

Resultados y Discusión

En la Tabla 1 se aprecia que a los tres tiempos de contacto estudiados a 30°C, así como también a 5 y 10 min a 45°C no se produjo la inhibición del crecimiento de *Salmonella* spp. a ninguna de las concentraciones estudiadas del desinfectante A, produciéndose la desinfección de las superficies de prueba únicamente en el ensayo a 45°C durante 15 min. El punto crítico de desinfección para esta combinación tiempo-temperatura fue de 80 ppm del ingrediente activo del desinfectante. En esta Tabla igualmente

se observa que en los ensayos con *Salmonella* spp. y el desinfectante B, a ninguno de los tres tiempos de contacto estudiados a 30°C se consiguió la desinfección de las superficies de prueba; sin embargo, a 45°C fue posible la desinfección de las mismas a los 5, 10 y 15 min de contacto. Los puntos críticos de desinfección en estos ensayos fueron de 100, 80 y 50 ppm respectivamente, evidenciándose con este resultado la influencia de la temperatura y el tiempo de contacto en la actividad antibacteriana del desinfectante, al apreciarse que a medida que se incrementan estos dos parámetros disminuye la concentración necesaria de hipoclorito de sodio para lograr la inhibición del crecimiento de *Salmonella* spp.

En la Tabla 2 se observa que *Staphylococcus aureus* pudo ser destruido en los seis ensayos realizados con el desinfectante A. Referente a los puntos críticos de desinfección

Tabla 1

Actividad antibacteriana de los desinfectantes estudiados en los ensayos con *Salmonella* spp.

Tiempo de contacto (min)	Desinfectante A		Desinfectante B	
	Temperatura (°C)			
	30	45	30	45
5	-	-	-	+
10	-	-	-	+
15	-	+	-	+

- : no se inhibió el crecimiento del microorganismo a ninguna de las concentraciones estudiadas de los desinfectantes.
+ : se inhibió el crecimiento del microorganismo.

Tabla 2

Actividad antibacteriana de los desinfectantes estudiados en los ensayos con *Staphylococcus aureus*.

Tiempo de contacto (min)	Desinfectante A		Desinfectante B	
	Temperatura (°C)			
	30	45	30	45
5	+	+	-	-
10	+	+	+	+
15	+	+	+	+

- : no se inhibió el crecimiento del microorganismo a ninguna de las concentraciones estudiadas de los desinfectantes.
+ : se inhibió el crecimiento del microorganismo.

ción, se obtuvo que la inhibición del crecimiento del microorganismo se logró a una concentración de 30 ppm de la sal de amonio cuaternario utilizada durante 5 y 10 min de contacto a 30°C, así como 20 ppm para estos mismos tiempos a 45°C y 10 ppm para las dos temperaturas estudiadas a 15 min de contacto. Los resultados antes expuestos muestran, además de una notoria sensibilidad de *Staphylococcus aureus* a las sales de amonio cuaternario, cómo en las dos temperaturas estudiadas se obtuvieron idénticos Puntos Críticos de Desinfección a los 5 y 10 min de contacto, es decir, que no se produjo un incremento de la actividad antibacteriana del desinfectante estudiado al incrementarse el tiempo de contacto de 5 a 10 min. En cuanto a los resultados obtenidos en los ensayos con *Staphylococcus aureus* y el desinfectante B, se tuvo que en las dos temperaturas ensayadas con un tiempo de contacto de 5 min no se inhibió el crecimiento bacteriano a ninguna de las concentraciones estudiadas del hipoclorito de sodio, mientras que a 30°C se inhibió el crecimiento del microorganismo con 80 y 70 ppm del ingrediente activo del desinfectante durante un tiempo de contacto de 10 y 15 min respectivamente; a una temperatura de 45°C se inhibió el crecimiento bacteriano a los 10 y 15 min de contacto con 60 y 50 ppm de hipoclorito de sodio, respectivamente. Es así como se aprecia que el incremento de la temperatura y el tiempo de contacto entre el desinfectante B y *Staphylococcus aureus*, favoreció la actividad de dicho desinfectante, requiriéndose una menor concentración de

éste para lograr la inhibición del crecimiento bacteriano.

En la Tabla 3 se observa que *Bacillus cereus* fue destruido en todos los ensayos realizados con el Desinfectante A. Las concentraciones requeridas de la sal de amonio cuaternario para lograr la destrucción del microorganismo fueron de 90 ppm a 30°C durante 5 y 10 min de contacto, 70 ppm durante 15 min a 30°C y 5 min a 45°C, así como 50 ppm a 45°C durante 10 y 15 min de contacto. Estos resultados evidencian, además de la sensibilidad de *Bacillus cereus* a las sales de amonio cuaternario, que el incremento de la temperatura del desinfectante aplicado disminuye la concentración necesaria del mismo para la desinfección de las superficies de prueba contaminadas con este microorganismo; sin embargo, también se observa que los Puntos Críticos de Desinfección a 30°C durante 5 y 10 min de contacto y a 45°C durante 10 y 15 min de contacto, fueron idénticos, por lo que el incremento en los tiempos de contacto a una misma temperatura, no siempre estuvo relacionado con una disminución de la concentración necesaria del desinfectante para lograr la inhibición del crecimiento bacteriano.

Los resultados obtenidos en los ensayos con *Bacillus cereus* y el desinfectante B, demuestran que solamente a una temperatura de 45°C durante un tiempo de contacto de 15 min fue posible la desinfección de las superficies de prueba, con un punto crítico de desinfección de 100 ppm de hipoclorito de sodio, lo que evidencia una alta resisten-

Tabla 3
Actividad antibacteriana de los desinfectantes estudiados en los ensayos con *Bacillus cereus*

Tiempo de contacto (min)	Desinfectante A		Desinfectante B	
	Temperatura (°C)			
	30	45	30	45
5	+	+	-	-
10	+	+	-	-
15	+	+	-	+

cia del microorganismo ante las diversas condiciones de tiempos de contacto, temperaturas y concentraciones de hipoclorito de sodio a las que fue sometido, a pesar de que Wei *et al.* (9) afirman que la cloración puede inactivar el mecanismo de germinación de las esporas, debido probablemente a la ruptura de la envoltura de las mismas y sus capas subyacentes, lo que origina un incremento de la permeabilidad de estas estructuras, con el consecuente aumento de la susceptibilidad a ser destruidas; sin embargo, si se toman en cuenta los resultados obtenidos por Lee y Frank (10) y McCarthy (11), quienes comprobaron que las células adheridas a superficies son más resistentes que las células suspendidas en un cultivo, se puede suponer entonces que la adherencia del cultivo al acero inoxidable dificulta la acción del cloro sobre este tipo de microorganismo y más aún en el caso de *Bacillus cereus*, que posee esporas.

Diferenciando la actividad antibacteriana de los desinfectantes estudiados sobre las tres cepas de los microorganismos utilizados, se observó que *Staphylococcus aureus* fue el microorganismo más sensible a los dos desinfectantes estudiados, en especial al desinfectante A, resultando *Salmonella* spp. muy resistente a este producto y *Bacillus cereus* bastante sensible al mismo. Por otra parte, *Salmonella* spp. fue menos resistente al desinfectante B que *Bacillus cereus*.

La sensibilidad de los microorganismos Gram positivos ante el desinfectante A, se explica por el hecho de que el modo de acción de éste se fundamenta en la desnaturalización de las proteínas y el posterior rompimiento de las membranas celulares (3), y tal como lo señalan Pelczar *et al.* (4) las bacterias Gram positivas poseen un menor contenido lipídico en sus paredes celulares, lo que favorece la desnaturalización de las proteínas.

Lógicamente que la actividad antibacteriana del desinfectante A contra *Staphylococcus aureus* es mayor que contra *Bacillus cereus* debido a la presencia de esporas en

este último, las cuales son más resistentes a los agentes de desinfección que el propio microorganismo.

Considerando que las paredes celulares de los microorganismos Gram positivos son más gruesas que las de los Gram negativos (4), se puede explicar el hecho de que el desinfectante B resultó más eficaz contra *Salmonella* spp que el desinfectante A, ya que el modo de acción del primero se fundamenta en la formación de compuestos tóxicos que afectan el metabolismo del microorganismo, y es muy claro que una pared celular delgada debe favorecer la permeabilidad de la misma facilitándose el ingreso de los compuestos tóxicos al interior celular, provocándose entonces el efecto antibacteriano del desinfectante. Así mismo, el mayor grosor de las paredes celulares de las bacterias Gram positivas puede dificultar la actividad antibacteriana del desinfectante B sobre este tipo de microorganismos.

En otro orden de ideas se tiene que en todos los ensayos realizados se apreció que el incremento en la temperatura de los desinfectantes favorece la actividad antibacteriana de estos, por lo que se requirieron menores concentraciones del ingrediente activo de los mismos para lograr la desinfección de las superficies de prueba en los ensayos a 45°C que en los ensayos a 30°C, ya que seguramente el incremento en la temperatura de un desinfectante acelera los procesos de difusión de dicho agente antibacteriano a través de las paredes celulares de los microorganismos o las reacciones químicas en las que se fundamenta su modo de acción, favoreciéndose entonces la eficacia germicida.

Sin embargo, el incremento del tiempo de contacto no siempre favoreció la actividad antibacteriana del desinfectante A, ya que en algunos ensayos con este desinfectante y a la misma temperatura, se obtuvieron idénticos Puntos Críticos de Desinfección a dos diferentes tiempos de contacto sucesivos, tal vez porque las reacciones en las que se fundamenta el modo de acción de este agente re-

quieren de un tiempo superior a los 5 min, para que se pueda observar entonces un efecto sobre la actividad antibacteriana.

Los análisis estadísticos realizados no revelaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de los Puntos Críticos de Desinfección en las combinaciones microorganismo-desinfectante evaluadas.

Conclusiones

El aumento en la temperatura de los desinfectantes estudiados incrementó la actividad antibacteriana de éstos.

A medida que se incrementó el tiempo de contacto del hipoclorito de sodio con las superficies contaminadas, se incrementó la actividad antibacteriana del mismo.

El incremento del tiempo de contacto de las sales de amonio cuaternario con las superficies contaminadas, no siempre favoreció la actividad antibacteriana del desinfectante.

Staphylococcus aureus fue el microorganismo más sensible a los dos desinfectantes estudiados.

La sensibilidad de los microorganismos Gram positivos estudiados, ante las sales de amonio cuaternario, fue mucho mayor que la exhibida por *Salmonella* spp.

Staphylococcus aureus fue más sensible a las sales de amonio cuaternario y al hipoclorito de sodio que *Bacillus cereus*.

Bacillus cereus fue más resistente que *Salmonella* spp. al hipoclorito de sodio.

Referencias Bibliográficas

1. HELKE D., WONG A. *J Food Prot* 57 (11): 963-968, 1994.
2. GABIS D., FAUST R. *Food Technol* 42 (12): 81-82, 1988.
3. BARREIRO J. *Higiene y Saneamiento en el Procesamiento de Alimentos*. Universidad Simón Bolívar, Baruta, 1992.
4. PELCZAR M., REID R., CHANG E. *Microbiología*. 4° ed. Editorial McGraw Hill, México, D.F., 1982.
5. GIESE J. *Food Technol* 45 (12): 74-80, 1991.
6. PIETO Y., BARDONESCHI G. Desinfección. Cap. 1 (Parte VI). En *Microbiología Alimentaria*. Vol. 1. Bourgeois C., Mescle J., Zucca J. (Ed.), Ed. Acribia, Zaragoza, pp. 305- 320, 1994.
7. HUGO W. *J Appl Bacteriol* 71: 9-18, 1991.
8. A.O.A.C. *Official Methods of Analysis*. 13ª ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C., pp. 58-59, 1980.
9. WEI C., COOK D., KIRK J. *Food Technol* 39 (1): 107-114, 1985.
10. LEE S., FRANK J. *J Food Prot* 54 (1): 4-6, 1991.
11. McCARTHY S. *Food Technol* 46 (12): 84-7, 1992.