

**Revisión de la incidencia de la Contaminación por *Bacillus Cereus*, en los Procesos Industriales de Fabricación de Harinas de Arroz (*oryza sativa*) y Trigo (*Triticum spp*) a Nivel Global.**

Wilson Ricardo Ríos Robayo

Asesor

Ing. Diego A. Marín Idárraga

Universidad Nacional Abierta y A Distancia

Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingeniería

Especialización en Procesos de Alimentos y Biomateriales

Facatativá 2021

## **Dedicatoria**

Este trabajo está dedicado en primer lugar a mis padres y hermanos por ser mi ejemplo de vida, de igual manera a mi esposa y mis hijos ya que son el motor de mi vida y por último a Dios por todas esas bendiciones recibidas y darme la oportunidad de cumplir todas mis metas.

## **Agradecimientos**

Agradezco a la Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD) por brindar las herramientas para poder llevar a cabo este trabajo, de igual manera al director-asesor asignado Ing. Diego A. Marín Idárraga, al semillero de Investigación SEPRON-BIOTECAL y al Grupo de Investigación GIEPRONAL ya que gracias a su gran conocimiento y experticia se logró adquirir habilidades que contribuyeron a cumplimiento de los objetivos propuestos.

## Resumen

Las esporas de *Bacillus cereus* son una preocupación para la industria alimentaria debido a su alta resistencia al procesamiento y a su capacidad para sobrevivir en condiciones propias de los procesos productivos. Esta monografía tuvo como objetivo realizar una revisión bibliográfica sistemática, sobre aspectos de su biología, taxonomía, alimentos que contamina y metodologías para detectar, prevenir y controlar este microorganismo, aunado a ello, su incidencia en los procesos de fabricación de Harinas de trigo y arroz. Métodos utilizados para detectar y cuantificar *Bacillus cereus* y enterotoxinas, así como *cereulidas* se compilan en este documento y además información relevante para poder dilucidar los mecanismos de inactivación de las esporas bajo ultrasonidos, combinado con tratamientos térmicos (termosonicación, TS), con tratamientos de presión (manosonicación, MS), y con tratamientos térmicos y de presión (manotermosonicación, MTS). Las técnicas moleculares basadas en la PCR, tienen como ventaja, una mayor rapidez y seguridad en la identificación del microorganismo, e incluso permiten su cuantificación mediante PCR a tiempo real (Q-PCR), sin embargo a pesar de que existen muchos estudios recientes sobre nuevas alternativas de detección de patógenos transmitidos por alimentos, no se ha podido dejar atrás aquellas que representan sobreesfuerzo y sobrecosto, como lo es el caso del precultivo. Por esa razón se debe aumentar los esfuerzos e investigar más a fondo, todas estas nuevas herramientas que ofrece la ciencia y la biotecnología.

*Palabras Clave:* *Cereulida*, control microbiológico, Enterotoxina, patógeno, PCR, superficies hidrófobas, técnicas moleculares.

## Abstract

*Bacillus cereus* spores are a concern for the food industry due to their high resistance to processing and their ability to survive in conditions typical of production processes. The objective of this monograph was to carry out a systematic bibliographic review on aspects of its biology, taxonomy, contaminating foods and methodologies to detect, prevent and control this microorganism, in addition to its incidence in the manufacturing processes of wheat and rice flour. Methods used to detect and quantify *B. cereus* and enterotoxins, as well as cereulides are compiled in this document and also relevant information to be able to elucidate the mechanisms of inactivation of spores under ultrasound, combined with thermal treatments (thermosonication, TS), with treatments of pressure (manosonication, MS), and with heat and pressure treatments (manothermosonication, MTS). Molecular techniques based on PCR have the advantage of greater speed and security in the identification of the microorganism, and even allow its quantification by means of real-time PCR (Q-PCR), however, despite the fact that there are many recent studies on new alternatives for the detection of foodborne pathogens, it has not been possible to leave behind those that represent overstrain and cost, such as preculture. For this reason, efforts should be increased and further research should be carried out on all these new tools offered by science and biotechnology.

*Key Words:* Cereulide, microbiological control, Enterotoxin, pathogen, PCR, hydrophobic surfaces, molecular techniques.

## Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN	10
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
JUSTIFICACIÓN	14
OBJETIVOS	16
Objetivo General: .....	16
Objetivos Específicos: .....	16
Metodología.	17
Planteamiento del problema de investigación. ....	17
Preguntas de investigación. ....	17
Fuentes de datos.....	18
<i>Bacillus Cereus.</i>	20
Características Generales.....	20
Crecimiento y Supervivencia.....	22
Formación de la Espora .....	24
Toxinas .....	25
Toxinas Diarreicas. (Hemolisina o Toxina HBL) .....	26
Alimentos Susceptibles de Contaminación .....	26
<i>Bacillus Cereus</i> en el Arroz ( <i>oryza sativa</i> ). ....	27
Casos reportados internacionalmente sobre la prevalencia de <i>Bacillus Cereus</i> en arroz. ....	28
<i>Bacillus cereus</i> en harina de Trigo ( <i>Triticum spp</i> ). ....	29
Proceso de fabricación de harina de arroz ( <i>oryza sativa</i> ) y trigo ( <i>Triticum spp</i> ).	32
Descripción del Proceso de fabricación de harina de arroz ( <i>oryza sativa</i> ) y trigo ( <i>Triticum spp</i> ). ....	33

Recepción del grano. ....	36
Limpieza. ....	37
Acondicionamiento del grano.....	41
Molienda.....	46
Empaque. ....	49
Incidencia de la contaminación por <i>Bacillus cereus</i> en el proceso de fabricación de harina de arroz ( <i>oryza sativa</i> ) y trigo ( <i>Triticum spp</i> ).	50
Determinación de puntos de muestreo.....	53
Desafíos Industriales.....	54
Implicaciones Para la Industria de Alimentos .....	55
Estudios biotecnológicos enfocados en la detección e inactivación del patógeno <i>Bacillus cereus</i> y sus toxinas.	57
Pruebas Fenotípicas .....	59
Pruebas Moleculares.....	60
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	61
Biosensores.....	62
Cultivos En Líneas Celulares .....	64
Inmunoensayo.....	64
Efecto de ultrasonidos y tratamientos térmicos y de presión en la inactivación de esporas de <i>Bacillus cereus</i> . ....	65
Tratamientos de ultrasonidos.....	66
Conclusiones	70
Referencias	73

## Lista de Tablas

Tabla 1. Los siete grupos genéticos de <i>Bacillus cereus</i> y sus principales características. .....	21
Tabla 2. Características genéticas de las toxinas diarreicas .....	26
Tabla 3. Casos de presencia de <i>Bacillus cereus</i> en arroz reportados internacionalmente. .....	28
Tabla 4. Resumen de las categorías de productos y los resultados del cribado para <i>Bacillus Cereus</i> .....	32
Tabla 5. Variables y efectos del procesamiento del separador de cereales.....	39
Tabla 6. Contaminación por <i>Bacillus cereus</i> en procesos productivos.....	50
Tabla 7. Resumen de recomendaciones para el muestreo de áreas y equipos.....	53
Tabla 8. Métodos biosensores para la detección de patógenos en alimentos.....	63
Tabla 9. Supervivencia de las esporas de <i>Bacillus cereus</i> después de tratamientos en diferentes momentos.....	69

## Lista de Figuras

Figura 1. Morfología <i>Bacillus Cereus</i> .....	20
Figura 2. Ecología de <i>Bacillus cereus</i> .....	24
Figura 3. Estructura de la cereulida.....	25
Figura 4. Diagrama de Proceso de Producción de Harinas.....	36
Figura 5. Silo metálico de almacenamiento.....	37
Figura 6. Separador-clasificador MTRA.....	38
Figura 7. Deschinadora en Seco.....	41
Figura 8. Silos de Consumo.....	41
Figura 9. Tanque de almacenamiento.....	42
Figura 10. Diseño mecánico de elevador de cangilones.....	42
Figura 11. Sinfines de transporte.....	43
Figura 12. Pulidor vertical.....	43
Figura 13. Ciclón.....	44
Figura 14. Cernedor.....	45
Figura 15. Secador.....	46
Figura 16. Molino de rodillos horizontales y los rodillos lisos.....	48
Figura 17. Molino de martillos.....	49
Figura 18. Embolsadora dosificadoras y fraccionadoras para polvos.....	50
Figura 19. Sistema de manotermosonicación a escala de laboratorio (MTS).....	67

## Introducción

Las especies de *Bacillus* son formadores de esporas Gram-positivas frecuentemente encontradas en el suelo. Se detectan con frecuencia en materias primas agrícolas y también en los procesos productivos de la industria alimentaria. La aparición de dichas bacterias, ha sido de particular interés en harinas y productos de panadería, puesto que poseen propiedades lipofílicas y forman endoesporas resistentes al calor, (Anderson, 1995). *Bacillus cereus* se relaciona con dos tipos diferentes de intoxicación alimentaria: el emético y el síndrome diarreico (Stenfors et al., 2008). El síndrome emético es una intoxicación causada por ingerir una sustancia termoestable llamada Cereulida de toxina emética, (Ehling et al., 2004). El diarreico es una infección causada principalmente por enterotoxinas Nhe (enterotoxina no hemolítica), Hbl (hemolisina BL) y CytK (citotoxina K) formada dentro del intestino humano al ingerir células vegetativas o esporas de *Bacillus cereus* (Ceuppens et al., 2010).

Por otra parte, la contaminación de las líneas de producción es de suma importancia debido a que este tipo de bacterias se adhieren a las superficies de los equipos, que comúnmente se conocen como biopelículas, las cuales pueden desarrollarse en diferentes tipos de superficies de acero inoxidable de equipos abiertos y cerrados, pisos, estructuras en goma, etc., debido a que las células se encuentran adheridas en sustancias poliméricas extracelulares (EPS) y que además forman un gel altamente hidratado capaz de crear una alta resistencia a tratamientos físico-químicos utilizados en los procedimientos de limpieza y desinfección, (Faille et al., 2014). *Bacillus cereus* forma biopelículas bajo estática y en condiciones de flujo,

especialmente en la interfaz aire-liquido, además producen varias cantidades de EPS, pero también de ADN, aspecto que tiene mucho que ver en la creación de biopelículas.

Generalmente la detección y cuantificación de este patógeno de alimentos se realiza por técnicas convencionales de precultivo y cultivo, dichas técnicas consumen mucho tiempo y, en ocasiones, llevan a identificaciones erróneas. En este documento se ha desarrollado diferentes métodos para la detección y control, basados en la técnica de la PCR, además se plantea nuevas alternativas que van de la mano con la biotecnología, llevadas a cabo por estudios científicos recientes referentes a este tema.

## Planteamiento Del Problema

La harina es un producto muy importante en la industria alimentaria, el mundo está experimentando un aumento significativo en la industria global de las harinas, tanto en capacidad de producción, como en el aumento de la demanda, convirtiéndose en un producto necesario para la elaboración de alimentos. El uso de esta materia prima en diversos procesos productivos hace que la calidad sea un factor primordial en la cadena productiva. Uno de los problemas más sensibles, y que se presenta al interior de las empresas molineras, es la contaminación biológica por *Bacillus Cereus*, (Sánchez y Correa, 2016) afirman “esta es una bacteria genéticamente diversa que se encuentra en el ambiente y contamina los alimentos, afectando la salud humana al ingerir el microorganismo”. Posee la habilidad de sobrevivir en diferentes ambientes y en condiciones de estrés, lo que hace muy difícil para la industria molinera, exceptuarla de sus alimentos (Anderson y Rönnner, 1995, p.145-155).

La alteración puede ocurrir rápidamente, si la calidad del agua y la limpieza de los utensilios empleados en la reconstitución, no son los adecuados, aunque la cantidad puede controlarse y reducirse en cierta medida, su eliminación total resulta imposible (Stenfors, 2008).

Entre los alimentos más susceptibles de ser contaminados, se encuentra las harinas, las carnes, leches, quesos y verduras (Sánchez y Correa, 2016). Los procesos de elaboración de harinas son muy susceptibles a esta contaminación, ya que esta es una bacteria ubicua, encontrándose en suelo, polvo, ambiente y es de fácil propagación (OPS/OMS, 2016).

Los principales factores que contribuyen a la contaminación son; temperatura de cocción inadecuada, equipos contaminados y condiciones higiénicas deficientes, en lugares de procesamiento de alimentos (Bhunja, 2008). Las esporas resisten altas temperaturas y condiciones ambientales extremas como; congelación, calentamiento, secado y radiación (Bottone y Sarrias, 2010).

Este microorganismo puede adherirse a superficies (especialmente las superficies hidrófobas), (Klavenes, 2002), incluido el acero inoxidable, material ampliamente utilizado en las plantas de alimentos, lo que facilita más su permanencia. (Jullien, 2002). Todos los alimentos, ingredientes o materias primas están contaminados con esta bacteria, la dosis infectiva es de aproximadamente 10<sup>5</sup> UFC/g (OPS/OMS, 2016). Un alimento que contenga más de 10<sup>4</sup> UFC/g de *Bacillus cereus* no es apto para su consumo (Alimentaria AS, 2010). Los contaminantes existentes no cambian el aspecto ni características de los alimentos, es por esto que en ocasiones pasa inadvertida.

La *cereulida*, producida por *Bacillus cereus*, es una pequeña toxina depsipéptida altamente resistente, a la cual se enfrenta la industria alimentaria. Este patógeno puede ingresar a las áreas de producción en cualquier etapa de la cadena productiva. (Katia R, Katharina S, Ute Messelhäusser, Monika E, 2020).

Como síntesis de esta problemática surge este interrogante; ¿Cuál es la incidencia de la contaminación por *Bacillus Cereus*, en los procesos industriales de fabricación de harinas de arroz (*oryza sativa*) y trigo (*Triticum spp*) a nivel global?

## Justificación

Uno de los principales retos para las empresas productoras de alimentos es garantizar la inocuidad de sus productos, de tal manera que no se excedan los niveles establecidos de microorganismos patógenos y que no se afecte la salud de los consumidores (Logan NA, 2011).

La detección de este microorganismo es de carácter obligatorio en alimentos pulverizados, ya que causa intoxicaciones alimentarias. Es necesario contar con herramientas adecuadas de detección y rápido diagnóstico. Gracias a estudios científicos de los últimos años en materia de biología molecular, la PCR múltiple es una alternativa específica, rápida y segura la detección (Sánchez J, Correa M, Castañeda-Sandoval LM, 2016).

Se han obtenido avances considerables en la comprensión de la biosíntesis de toxina de cereulida, pero falta una visión general del conocimiento actual sobre esta, con respecto a la perspectiva de la industria alimentaria (Katia R, Katharina S, Ute Messelhäusser, Monika E, 2020).

La producción, así como datos precisos sobre fuentes de contaminación y factores que promueven la formación de toxinas, se necesitan con urgencia para prevenir la contaminación (Katia R, Katharina S, Ute Messelhäusser, Monika E, 2020).

Teniendo en cuenta que la información sobre la prevalencia de este microorganismo en el procesamiento de harinas es muy limitada (Dosea R, Marcellini

P, Santos A, Dantas A, Silva L, 2010), se requiere de iniciativas de investigación, que generen documentos con información clara y actualizada, sobre esta problemática, ya que es de vital importancia para la optimización de los procesos y servirá de referente para personas relacionadas con los sectores de la industria alimentaria, la salud y los organismos de salud pública, que puedan implementar acciones de mejora en el control microbiológico de los alimentos (Sánchez J, Correa M, Castañeda-Sandoval LM, 2016)

## Objetivos

### Objetivo General:

Realizar una revisión bibliográfica crítica de información relacionada con la contaminación por *Bacillus Cereus* y su potencial impacto en los procesos industriales de elaboración de harinas de arroz (*Oryza sativa*) y trigo (*Triticum spp*).

### Objetivos Específicos:

Sintetizar información actualizada sobre este microorganismo (*Bacillus Cereus*), aspectos relevantes, su biología, genética, toxinas y sus efectos en el humano, y los alimentos susceptibles de contaminación por esta bacteria.

Analizar el comportamiento del *Bacillus cereus*, en los procesos industriales de fabricación de harinas de arroz (*Oryza sativa*) y trigo (*Triticum spp*), aunado a ello, comprender cada una de las fases que intervienen en el proceso de elaboración de

Determinar que métodos o técnicas existen para detectar, prevenir y controlar este microorganismo y sus toxinas en los alimentos.

## **Metodología.**

Para poder llevar a cabo la presente monografía que tiene como principal objetivo realizar una revisión bibliográfica sistemática, se planteó una serie de pasos y actividades que contribuyeron a la obtención de la información y la profundización sobre el estudio a desarrollar en relación con la contaminación microbiana de los alimentos por *Bacillus Cereus*, aunado a ello se utilizaron técnicas y herramientas que permitieron alcanzar los objetivos propuestos.

## **Planteamiento del problema de investigación.**

Luego de plantear un tema en general demasiado amplio, en este caso la contaminación biológica de los alimentos, se quiso elegir un subtema del cual surgen muchos interrogantes y que además conlleva a una problemática muy sensible que causa afectación directamente en los procesos de alimentos. A pesar de que existen muchos antecedentes y varios estudios científicos sobre este tema, hace falta obtener enfoques más recientes y profundos sobre dicho tema, que conlleve a tener una visión más amplia de cómo contrarrestar sus efectos.

## **Preguntas de investigación.**

Luego de definir cuál problemática sería el enfoque de este trabajo y cuáles serían los lineamientos se procede a plantear los siguientes interrogantes:

- ¿Cuál es el objetivo principal de esta investigación?

- ¿Cuál es la importancia de llevar a cabo esta propuesta?
- ¿Cuál es alcance de esta propuesta?
- ¿Qué recursos se tienen disponibles para el desarrollo de esta propuesta?
- ¿Qué bases de datos son pertinentes para realizar una revisión bibliográfica sistemática?
- ¿Cuál es la situación actual de esta problemática, en este caso la contaminación por *Bacillus Cereus* en los procesos productivos, a nivel mundial?
- ¿Cuáles son los antecedentes sobre este tema, en los últimos 10 años?
- ¿Qué estudios científicos se han llevado a cabo sobre esta problemática?
- ¿Cuáles son las características de la bacteria *Bacillus Cereus*?
- ¿Cuáles son los entornos empresariales donde se evidencia la presencia de dicha bacteria?
- ¿Cuáles son los factores que favorecen el crecimiento de esta bacteria?
- ¿Qué afectación produce la contaminación por esta bacteria en la industria harinera de trigo y arroz?
- ¿Cuáles son las etapas que intervienen en el proceso de fabricación de harinas de trigo y arroz?
- ¿Qué técnicas o procedimientos existen para la detección y cuantificación de este microorganismo?

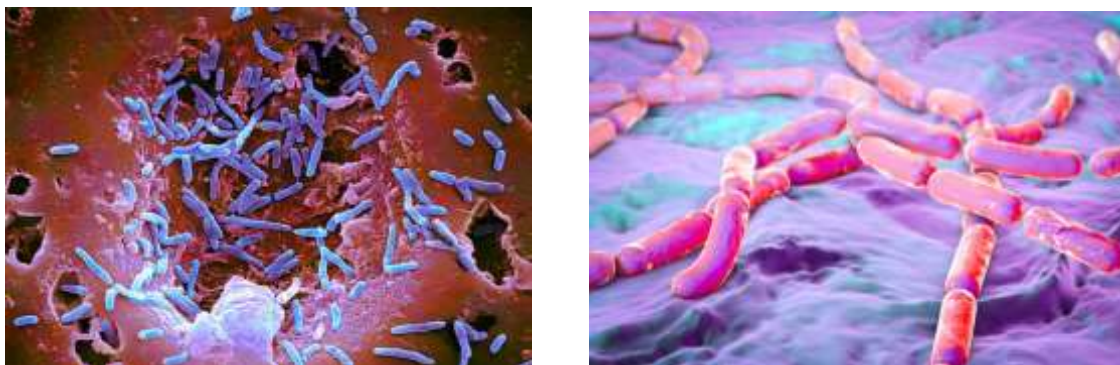
### **Fuentes de datos.**

Por medio de palabras clave como; contaminación microbiana, *Bacillus cereus* contaminación, *Bacillus cereus* en la industria, *Bacillus cereus* industria harinera, *Bacillus cereus* en el arroz, *Bacillus cereus* en el trigo, *Cereulida* en la industria,

proceso de fabricación de harinas, detección de patógenos, biotecnología alimentaria etc., se realizó una extensa revisión bibliográfica en las bases de datos:

- Scielo
- Web of Science
- Science Direct
- Google Académico

### *Bacillus Cereus.*



**Figura 1.** Morfología *Bacillus Cereus*. (Fotografía) Alamy.es

### **Características Generales**

*Bacillus (B.) cereus* sensu lato (s.l.) es un grupo de Grampositivo, facultativo anaeróbico, catalasa positiva, formadora de esporas y bacterias en forma de varilla.

Actualmente incluye una variedad genéticamente estrecha de especies filogenéticas, con características fenotípicas y patogénicas distintas (Ehling-Schulz et al., 2011a, 2019; Okinaka y Keim, 2016).

En la tabla 1 se encuentra información más detallada de este grupo, esta clasificación tiene como principal característica el “termotipo”, además diferencias entre la habilidad de crecer a altas o bajas temperaturas (Carlin et al., 2010).

**Tabla 1.** Los siete grupos genéticos de *Bacillus cereus* y sus principales características.

<b>Grupo</b>	<b>Especies incluidas</b>	<b>Asociado a intoxicaciones alimentarias</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Resistencia de las esporas</b>	<b>Observaciones</b>
<b>I</b>	<i>B. pseudomycooides</i>	NO	10-40°	Desconocida	Mesófila
<b>II</b>	<i>B. Cereus II B Thuringiensis</i>	SI	7-40°	Mediana	Muchas cepas son Psicrotolerantes
<b>III</b>	Cepas eméticas De <i>Bacillus. Cereus III B Thuringiensis III B anthracis</i>	SI	15-45°	Alta	Mesofila
<b>IV</b>	<i>Bacillus Cereus IV B Thuringiensis IV</i>	SI	10-45°	Mediana	Mesofila
<b>V</b>	<i>Bacillus cereus V, B Thuringiensis V</i>	SI	8-40°	Mediana	Mesofila
<b>VI</b>	<i>B. weihenstephanensis B. mycooides</i>	NO	5-37°	Baja	Todas las Cepas Son psicrotolerantes
<b>VII</b>	<i>B cytotoxicus</i>	SI	20-50°	Alta	Termotolerantes

(Guinebretiere et al, 2008; Carlin et al 2006 (5, 6) (como se citó en el Instituto Nacional de Salud [INS], 2011).

*Bacillus Cereus* es un microorganismo resistente a los procesos de cocción o pasteurización de los alimentos (Carlin et al., 2010). Generalmente se encuentra en el ambiente y contamina fácilmente los alimentos por malas prácticas de manufactura, lo cual puede propiciar su proliferación y desencadenar enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) al hombre, (INS, 2010).

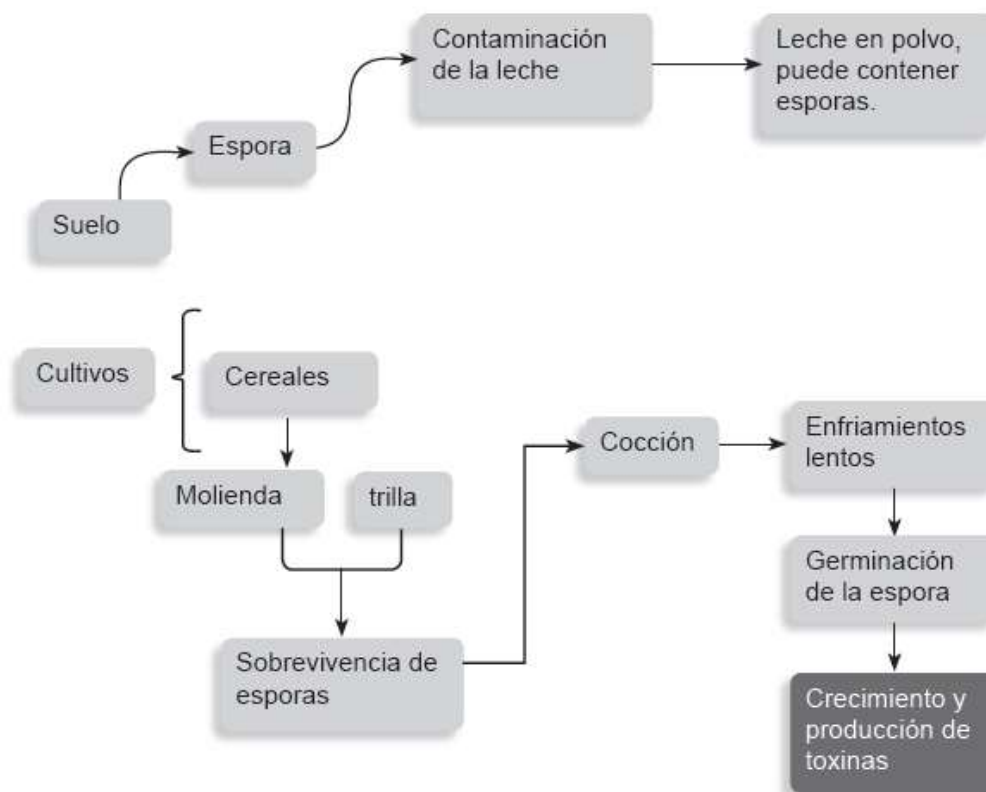
Forma esporas resistentes a altas temperaturas, deshidratación y radiación, y produce toxinas que contaminan gran variedad de alimentos (Granum y Lund, 1998). Tiene la habilidad de crecer en un amplio rango de temperaturas, desde los 4 °C a 48 °C, a PH de 4,9 a 9,3 y soporta concentraciones de NaCl hasta del 7 %, De Vos et al. (2012). Las esporas resisten bajas condiciones de humedad y a tratamientos térmicos. (INS, 2011). Según la cepa a la cual pertenece, presenta diferentes grados de toxicidad (Okstad y Kolsto, 2011). Los alimentos más susceptibles de ser contaminados son, harinas, leches, verduras, carnes, pescados, arroz y sus derivados (Gibbs P, 2002). Se ha comprobado que los alimentos con alto contenido de almidón son más vulnerables, debido a que esta bacteria produce enzimas de tipo amilasas, que le permite hidrolizar dicho carbohidrato y utilizarlo como fuente para su crecimiento (INS, 2011).

### **Crecimiento y Supervivencia**

La temperatura óptima de crecimiento de *Bacillus cereus* es de 30°C a 40°C, algunas cepas pueden crecer a temperaturas de 55°C. El rango para producción de la toxina va de 15°C a 40°C (NZFSA, 2010), dado que las cepas productoras no germinan a temperaturas menores a 15°C (Finlay W, Logan N, 2002). El rango de pH para el

crecimiento es de 4,5 a 9,5 con un pH óptimo de 6 a 7 (Finlay W, Logan N, 2002). Es más resistente a condiciones de estrés como pH ácido y sales biliares (Lake et al., 2009). Requiere de oxígeno para la producción de la toxina emética, seguridad alimentaria de Nueva Zelanda (NZFSA, 2010), crece en condiciones de aerobiosis. En ausencia de oxígeno y en condiciones de microaerofilia el porcentaje de crecimiento se ve reducido (Lake et al., 2009).

Sobrevive principalmente en alimentos secos, las cepas más termoresistentes se encuentran en procesos industriales donde se utilizan procesos térmicos (deshidratación y pasteurización) y las cepas psicrófilas en ambientes fríos. Estudios realizados en cultivos de arroz, identificaron una prevalencia de 9.52%, la cual varía cada etapa del cultivo, la mayor presencia se evidencia en la cosecha (Fritz et al., 2010). Como se muestra en la figura 2, se han encontrado cepas psicrófilas en suelos polares y cepas termófilas en climas tropicales (Stetten et al., 1998).



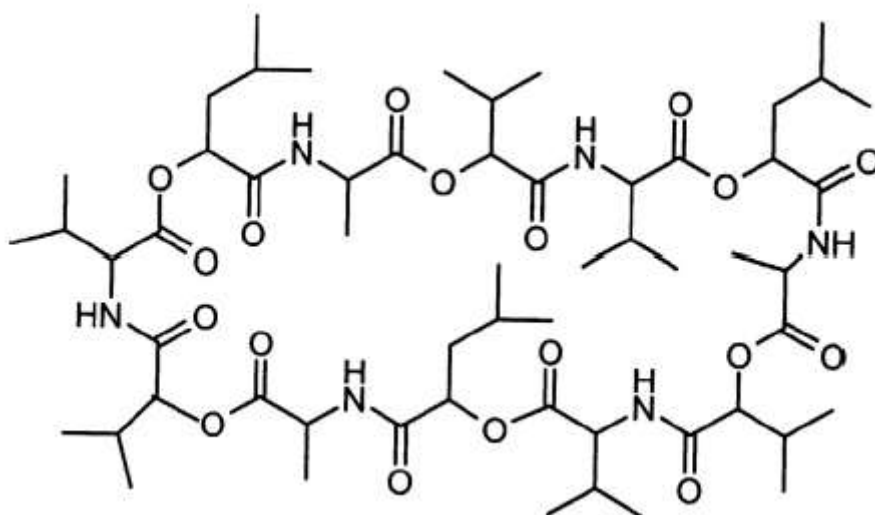
**Figura 2.** Ecología de *Bacillus cereus* (INSA, 2011).

### Formación de la Espora

La espora es una forma dormante de las bacterias derivada de la forma vegetativa. Se forman cuando las condiciones de crecimiento le favorecen y por restricciones en los nutrientes, para su germinación se necesita la presencia de L-alanina, la cual es afectada por cambios en la temperatura (Collado et al., 2006) y puede adherirse fácilmente a las superficies (Anderson et al., 1995).

## Toxinas

La más conocida es la toxina emética *cereulida*, (Figura 3), la cual produce enterotoxinas como; la hemolisina (HBL), la enterotoxina no hemolítica (NHE) y la citotoxina K (CytK) (Rosenquist et al., 2005). La detección y cuantificación de *cereulida*, se vio obstaculizada en el pasado por la falta de métodos adecuados. El método ISO (EN-ISO, 18465), que se basa en un isótopo estable el ensayo de dilución (espectrometría de masas con SIDA) (Bauer et al., 2010), permite la cuantificación precisa de *cereulida* en los alimentos (In't Veld et al., 2018).



**Figura 3.** Estructura química de la *cereulida*.

La *cereulida*, que consiste en un patrón repetido de tres unidades de tetrapéptidos.

Fuente: (Agata et al., 1994).

Toxinas Diarreicas. (Hemolisina o Toxina HBL)

**Tabla 2.** Características genéticas de las toxinas diarreicas.

<b>Nombre de la toxina</b>	
<b>Hemolisina (HBL)</b>	Genes/proteínas hb/C/L2 hbD/L1 hbIA/B  Toxina formada por tres proteínas, organizadas en un operon
<b>Enterotoxina no hemolítica</b>	Genes/proteínas nheA/A nheB/B nheC/C  Toxina formada por tres proteínas, organizadas en un operon
<b>Citotoxina K (Cyt K)</b>	Gen/proteína cytk/CytK  Una única proteína

(EFSA, 2005)

### **Alimentos Susceptibles de Contaminación**

De acuerdo con la cepa, se puede presentar diferentes grados de toxicidad (Okstad y Kolsto, 2011) Los alimentos más susceptibles de ser contaminados son; harinas, leches, verduras, pescados, arroz y sus derivados (Gibbs P, 2002). Alimentos con alto contenido de almidón con frecuencia se ven contaminados, debido produce enzimas del tipo amilasas que le permiten hidrolizar dicho carbohidrato (INS, 2011).

Esta bacteria se encuentra en el suelo y el polvo (Guinebretière y Nguyen, 2003), pero los nichos son en gran parte desconocidos. El hábitat primario podría encontrarse en algunas plantas, como el arroz (Kim et al., 2014; Ehling et al., 2015), lo que podría explicar su prevalencia en alimentos ricos en almidón. Se ha investigado sobre la presencia de este microorganismo en una variedad de alimentos como pasta, leche cruda, arroz, miel, harina de trigo, perejil, y detectó 3.5% de cepas eméticas. En otro estudio, que comprende 202 muestras de alimentos, el 7,7% de las muestras contenían emético *Bacillus cereus* (Batchoun et al., 2011).

### ***Bacillus Cereus* en el Arroz (*oryza sativa*).**

El arroz por su contenido de proteínas, grasas y su alto contenido de carbohidratos, es un excelente hábitat para las bacterias, sin embargo, por el bajo contenido de agua no permite su multiplicación, las esporas de *Bacillus cereus* pueden contaminar el arroz desde el cultivo y germinar cuando el arroz ha sido procesado (Gilbert y Stringer, 1974), además pueden mantenerse viables en el arroz seco, hasta por 48 semanas, pero si el aw aumenta a 0,78 la viabilidad puede reducirse a 16 semanas (Jaquette y Beuchat, 1998).

El arroz blanco, puede contener desde 46 a 100% de contaminación con este microorganismo. Es imposible que las formas vegetativas de *Bacillus cereus* se multipliquen en el arroz, que usualmente es almacenado con un porcentaje de humedad de 12-14%, aunque sus esporas pueden sobrevivir (Haque y Russell, 2005).

Casos reportados internacionalmente sobre la prevalencia de *Bacillus Cereus* en arroz.

En estudios realizados en arroz crudo, no se evidencia la presencia de este microorganismo debido a su ubicuidad en la naturaleza. Un estudio realizado en la India logró el aislamiento de esta bacteria en dos variedades de arroz (BR5 y BRRI Dhan 28) que son cultivados en Bangladesh.

**Tabla 3.** Casos de presencia de *Bacillus cereus* en arroz reportados internacionalmente.

<b>PAÍS</b>	<b>AÑO</b>	<b>TIPO DE ARROZ</b>	<b>PREVALENCIA</b>	<b>OTROS DATOS DE INTERES</b>
<b>Argentina</b>	2010	Arroz Crudo	100%	Concentraciones Variaron entre 2-7 UI/g
<b>España</b>	2002	Arroz con o sin cascarilla	100%	Las cepas aisladas produjeron toxina diarreica
<b>Estados Unidos</b>	1981	Arroz trillado	100-%	Concentraciones entre 1-2 UL
<b>Holanda</b>	1998	Arroz crudo	40-100%	Concentraciones entre 2-4 UL
<b>Hong Kong</b>	1995	Arroz crudo	68,9%	Concentraciones variaron entre $5 \cdot 10^2$ - $2 \cdot 10^4$ UFC/g
<b>Korea</b>	2009	Arroz integral	37%	Las cepas dieron positivo para los genes de la toxina diarreica

Se presentan datos de diferentes estudios realizados en arroz. (Fangio et al., 2010; Sarrias et al., 2003; Bryan et al., 1981, Notermans et al., 1998; Lee et al., 1995; Park et al., 2009; Lake et al., 2009).

### ***Bacillus cereus* en el Trigo (*Triticum* spp).**

(Sofroni, E. 2010), realizó una investigación referente a la calidad microbiológica del grano y la harina de trigo en Queensland, Australia, con el fin de evaluar criterios microbiológicos. Trecientos cincuenta muestras de harina fueron analizadas para *Bacillus cereus*, 300 para *Escherichia coli*, 150 para *salmonella*, 100 para aeróbicos y 50 muestras de granos para detectar *Bacillus cereus*, *salmonella*, *E. coli*, moho y levadura. Las prevalencias de levadura, moho, *E. coli* y *Bacillus cereus* fueron 56, 40, 2.0 y 4.0% para granos, 71, 17, 0,7 y 0,3% para la harina. Cifras interesantes, que ayudan a evaluar la capacidad de cumplimiento de estándares microbiológicos y además tener una visión clara del grado de seguridad y calidad microbiológica de este producto.

Dicha bacteria, formadora de esporas de intoxicación alimentaria, es omnipresente por naturaleza y su nicho ecológico principal es el suelo, debido a esto las esporas se introducen en el trigo y otros cereales y su alta resistencia a procesos de calentamiento, secado, desinfección e irradiación, contribuyen a la supervivencia y resistencia durante toda la cadena alimentaria. *Bacillus cereus* no se aisló en cualquiera de las 300 muestras de harina, pero si en 2 de 50 muestras de granos de trigo, a una media de 2.1 log UFC / g. Lo que se pudo evidenciar es que la presencia de este microorganismo es más alta en los granos de trigo, que en la harina de trigo como tal (Sofroni, E. 2010).

La harina de trigo es uno de los cereales más consumidos en Lesotho. Otro estudio realizado en Roma se llevó a cabo para investigar la calidad fisicoquímica y microbiológica de tortas, trigo blanco, trigo integral y harina de trigo, producidas por

una empresa de molienda en Maseru, Lesotho. En total se recolectaron 90 muestras de las cuales se realizó un análisis fisicoquímico y un recuento en placa de *coliformes* totales, *Bacillus cereus*, *Salmonella spp*, *E. coli*, levaduras y mohos.

En una evaluación más cualitativa, se identificaron en las harinas microbios de los géneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Aspergillus* y *Penicillium*. Los patógenos (*Bacillus cereus* y *Salmonella spp*) y los organismos (*coliformes* y *E. coli*) estaban por encima de los límites recomendados por el Programa Mundial de Alimentos (PMA). Gracias a esto se vio la necesidad de implantar procesos estrictos de limpieza y saneamiento en dichas empresas para la seguridad del consumidor y la protección de la salud pública, (Ntuli et al., 2013).

El contenido de humedad de la harina oscila entre el 11 y el 14%, pero el límite estipulado es del 15%, por encima del límite, la harina es susceptible al ataque microbiano. En consecuencia, las condiciones de almacenamiento después de la molienda y el envasado son muy importantes para la calidad de la harina, ya que afectan la vida útil y la seguridad de la harina, (Ntuli et al., 2013).

La calidad del cereal y las buenas prácticas poscosecha, son aspectos relevantes para garantizar la calidad del producto, la contaminación puede presentarse durante el crecimiento del cultivo, pre-cosecha, post-cosecha, secado, transporte y almacenamiento, por lo tanto, afecta negativamente el rendimiento, la calidad y el valor nutricional de la harina producida, (Ntuli et al., 2013).

Los informes mostraron que los hongos productores de micotoxinas (*Aspergillus spp*, *Penicillium spp*, *Fusarium spp*) y las bacterias patógenas (*Salmonella spp*, *Bacillus cereus*) pueden contaminar la harina de trigo, incluidos sus productos, y los niveles de contaminación están influenciados por las condiciones climáticas durante la maduración y recolección de los cereales. Los datos sobre la presencia de *Bacillus cereus* en la harina son extremadamente limitados. Un estudio de la microbiología de la molienda de trigo y harina en Australia demostró que el 81% de las muestras de trigo entrantes y El 93% de las muestras de harina dieron positivo a *Bacillus cereus* (Ntuli et al., 2013).

Otro estudio australiano que investiga la calidad de grano de trigo y harina de trigo procedente de dos molinos encontraron *Bacillus cereus* en el 4% de las muestras de granos, pero en ninguna de las 300 analizadas muestras de harina. Como la técnica utilizada tenía un límite de detección de 2.0 log UFC / g las muestras de grano exhibieron una media 2.1 log UFC / g, es concebible que múltiples casos de la contaminación del grano y la harina con *Bacillus cereus* puede haber desaparecido sin ser detectado. En el estudio de (Kindle et al., 2019), la ocurrencia de *Bacillus cereus* sensu lato fue muy común, con 75 de 89 productos (84%) dando un resultado positivo de la prueba. El porcentaje de muestras positivas fue en gran parte similar entre las diferentes categorías de productos, que van desde el 75% al 90% en todas las categorías de productos, en las que cinco o más productos estaban disponibles para la prueba. Esto incluía harina de trigo, castaño, escanda, avena y alforfón, como se muestra en la (Tabla 4).

**Tabla 4.** Resumen de las categorías de productos y los resultados del cribado para *Bacillus Cereus*.

<b>Producto/ Categoría</b>	<b>N/Probado</b>	<b>Positivo para <i>B. Cereus</i></b>	<b>Porcentaje de muestras positivas por categoría</b>
<b>Trigo</b>	41	37	90%
<b>Castaño</b>	2	2	100%
<b>Escanda</b>	12	9	75%
<b>Avena</b>	5	4	80%
<b>Alforfón</b>	1	1	100%

(Kindle et al., 2019)

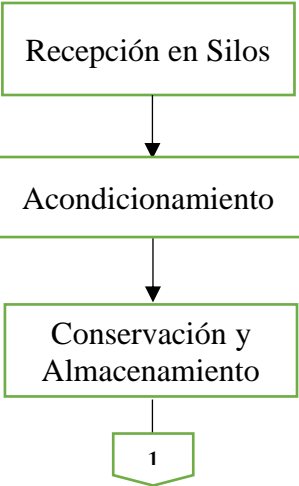
#### **Proceso de fabricación de harina de arroz (*oryza sativa*) y trigo (*Triticum spp*).**

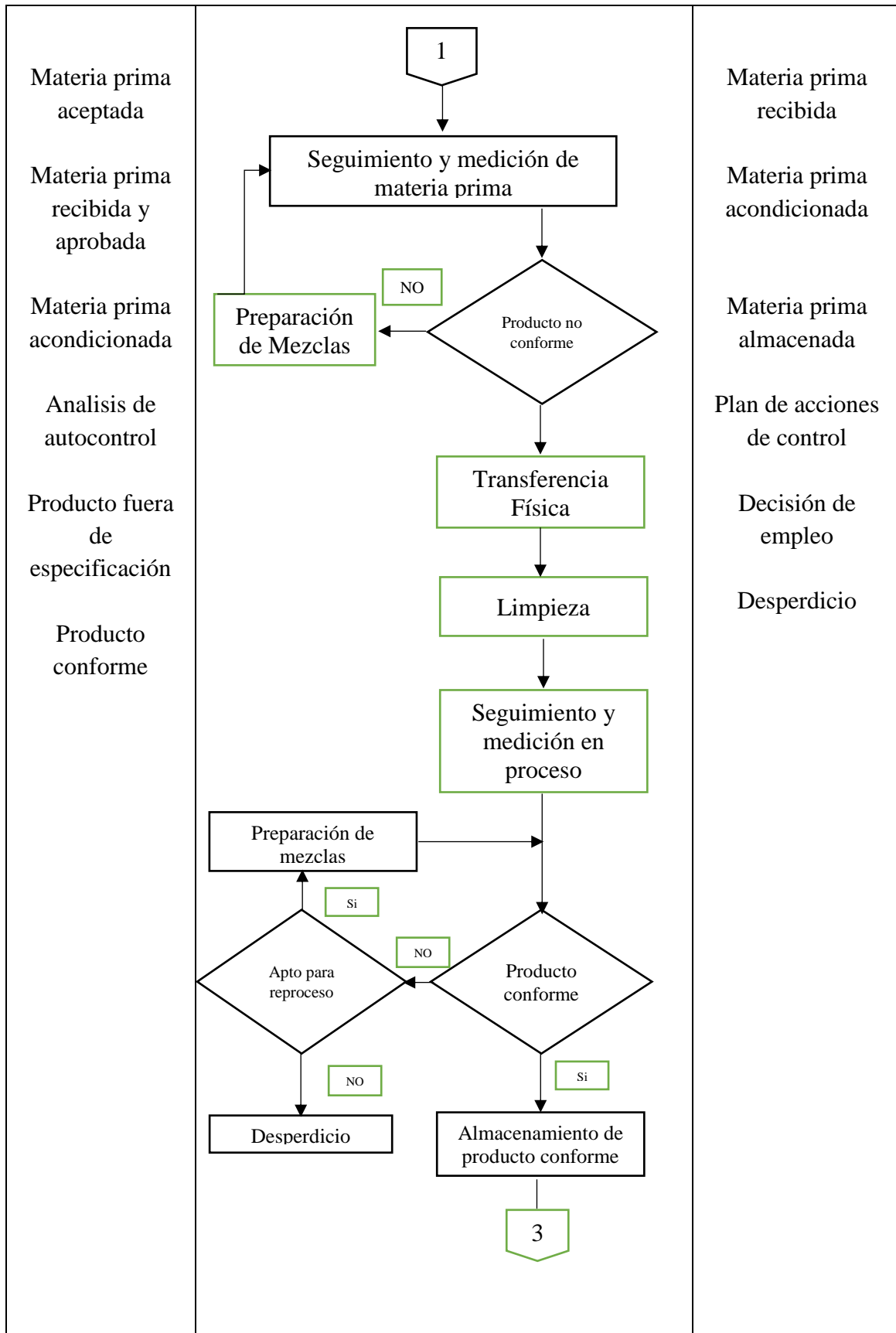
Con el fin de comprender la incidencia de la contaminación por *Bacillus Cereus* en las etapas productivas de fabricación de harinas, se lleva a cabo una descripción clara de cada uno de los procesos inmersos en la elaboración de dicho producto. Esto con el fin de identificar la vulnerabilidad en cuanto a contaminación microbiana se refiere, en cada una de las fases del proceso.

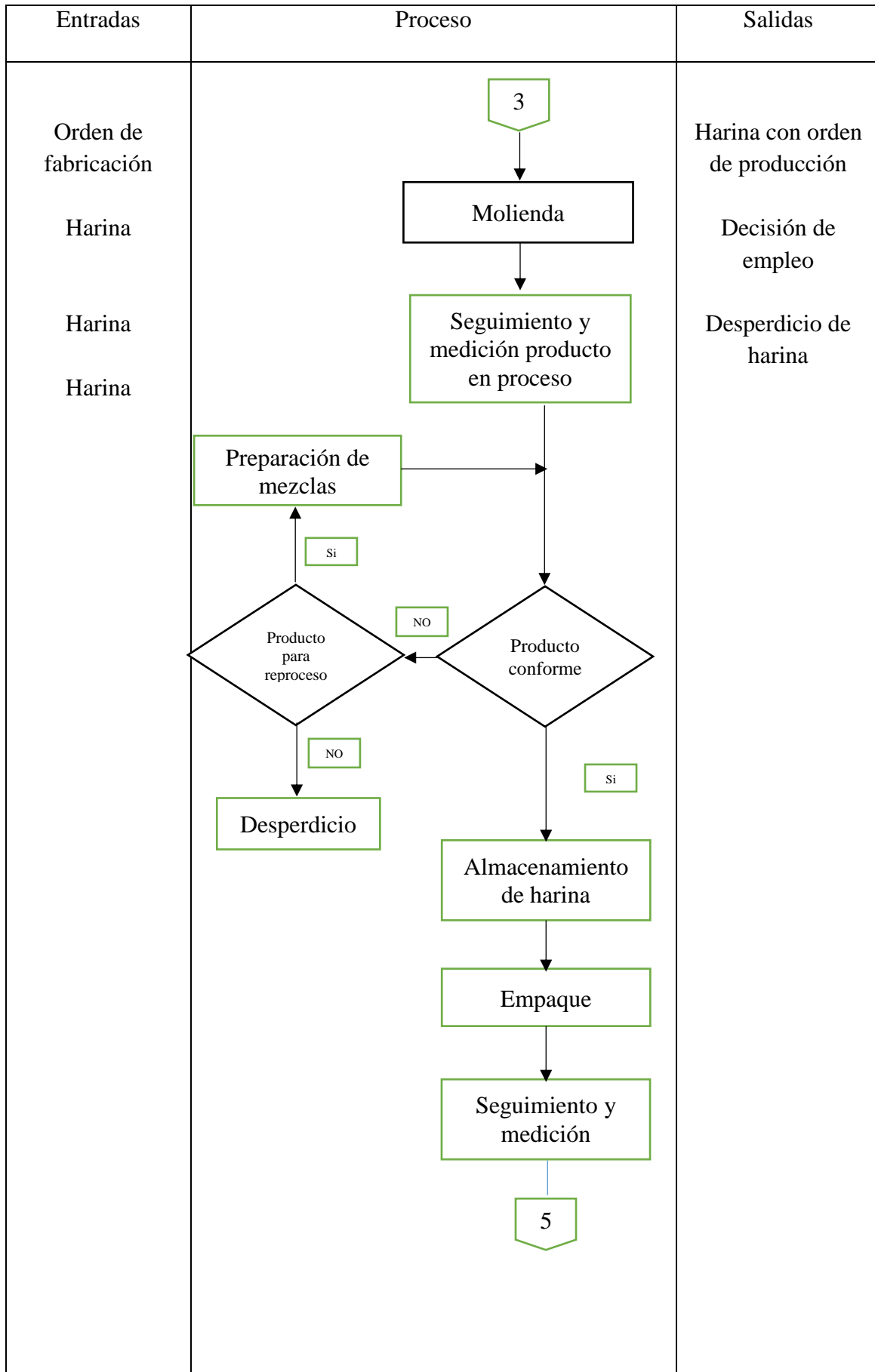
**Descripción del Proceso de fabricación de harina de arroz (*oryza sativa*) y trigo (*Triticum spp*).**

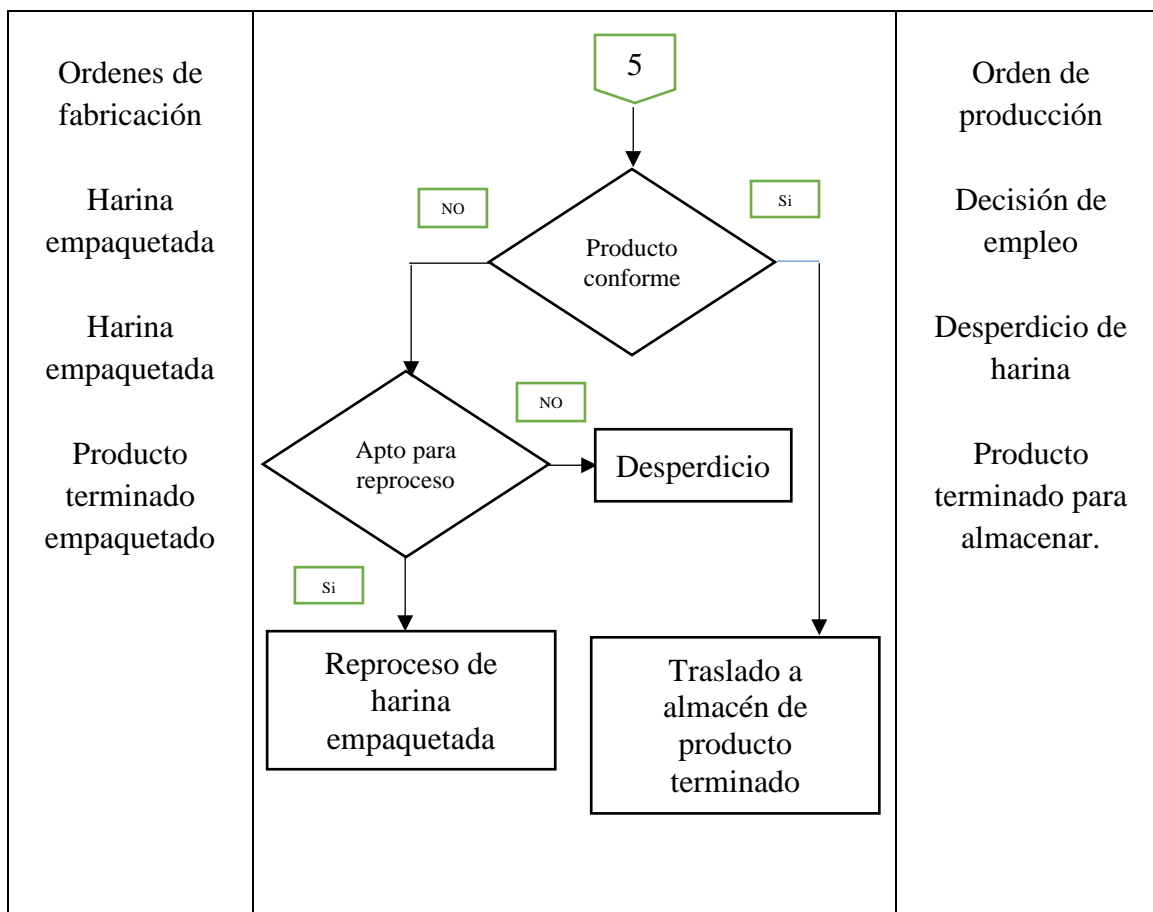
El propósito es la elaboración de harinas siguiendo cada una de las etapas del proceso productivo, cumpliendo con las especificaciones de calidad, mediante el uso racional de los recursos, con la finalidad de cumplir con planes de producción y asegurando la satisfacción del cliente.

El alcance del proceso productivo de harinas comprende desde la recepción, acondicionamiento, almacenamiento, conservación y transferencia física de la materia prima al proceso de limpieza, hasta la entrega del producto terminado al almacén. En la figura 4 se podrá visualizar cada una de las fases del proceso, mediante un diagrama de flujo

Entradas	Proceso	Salidas
<p>Materia prima aceptada</p> <p>Materia prima recibida y aprobada</p> <p>Materia prima acondicionada</p> <p>Análisis de autocontrol</p>	 <pre> graph TD     A[Recepción en Silos] --&gt; B[Acondicionamiento]     B --&gt; C[Conservación y Almacenamiento]     C --&gt; D[1]           </pre>	<p>Materia prima recibida</p> <p>Materia prima acondicionada</p> <p>Materia prima almacenada</p> <p>Plan de acciones de control</p>







**Figura 4.** Diagrama de Proceso de Producción de Harina de Arroz (*oryza sativa*) y Trigo (*Triticum spp*). Fuente: Elaboración propia.

Recepción del grano.

Este es el proceso donde se recibe el grano directamente del transportador, la recepción del grano puede realizarse en bolsas, tolvas o silos, (Figura 5). Cuando se recibe producto en altas cantidades, es recomendable utilizar silos, ya que estos no ocupan mucho espacio, son de fácil limpieza y requiere de menor cantidad de mano de obra, (Elizabeth Hernández, 2012)



**Figura 5.** Silo metálico de almacenamiento. Fuente: Autor.

#### Limpieza.

En este proceso lo que se busca es limpiar parcialmente el grano antes de realizar la molienda, lo que se busca en esta etapa es eliminar impurezas grandes o pequeñas de otros cereales, además piedras, palos, vidrio, madera etc., utilizando cualquier tipo de separador, ya sea vibrante o magnético. Para la limpieza se utiliza tres principios donde se separa las partículas indeseables: tamaño de partícula, peso y forma. El proceso de limpieza involucra los siguientes equipos para la eliminación de impurezas.

#### Separador de Cereales.

El principio de funcionamiento es separar las partículas por diferencia de tamaños, ejecutada por una acción mecánica. El equipo posee dos imanes a la entrada para eliminar partículas metálicas presentes. El separador cuenta con 4 mallas de 12mm (lámina metálica perforada principal) y 4 mallas de 3mm (criba de arena).



**Figura 6.** Separador-clasificador MTRA. Fuente: Autor.

El separador de cereales empieza a funcionar directamente debajo de las bocas de entrada donde se encuentra un piso distribuidor, el cual reparte el grano en todo el ancho del tamiz, esto garantiza además el pleno aprovechamiento de la superficie de tamizado. Con los dos pisos de tamices, principal y de arena, se consigue una buena separación de las impurezas gruesas y finas. Las salidas de los residuos, es decir las colas del tamiz superior y el paso del grano inferior, pueden disponerse de derecha a izquierda.

El grano limpio llega a la salida del tamiz donde se dispone un canal de aspiración de oscilación sintonizada y pueden ser fácilmente aspiradas algunas partículas más livianas que el grano. El grado de limpieza depende del flujo y distribución de carga, la regulación de la inclinación del tamiz en sentido longitudinal y transversal, la abertura del tamiz, el flujo de salida de carga del separador, volumen y velocidad de aire (aspiración). En la tabla 5 se describe cada una de las variables con sus respectivos efectos sobre el procesamiento de la máquina.

**Tabla 5.** Variables y efectos del procesamiento del separador de cereales.

<b>Flujo de carga de entrada</b>	La capacidad máxima se alcanza cuando el flujo de producto es lo más uniforme posible. Si hay demasiada fluctuación del grano hacia arriba indica que la limpiadora esta sobrecargada, cuando la carga es demasiado alta, habrá una inadecuada separación de partes ferrosas en el paso por los imanes.
<b>Inclinación de la mesa o inclinación del equipo</b>	Si el tamiz se encuentra demasiado elevado en la parte superior y demasiado bajo en la parte inferior (inclinación mayor a 55°), se podrá encontrar grano en la salida de impurezas. Si el tamiz se encuentra sin ninguna inclinación, se impedirá el flujo del grano sobre las cribas y se acumulará creando sobrecarga.
<b>Malla del tamiz</b>	Si la abertura de la criba superior es muy pequeña, gran cantidad de grano saldrá con impurezas gruesas y si es demasiado grande también se encontrará impurezas gruesas en el grano.
<b>Flujo de salida de carga del separador</b>	Si el flujo de salida del grano no es uniforme se forzará el motor del canal de aspiración, dado que aspirará aire y no partículas.

Fuente: Elaboración propia.

### Deschinadora en Seco.

El principio de funcionamiento es separar las partículas por diferencia de densidad de estas mediante una acción neumática y mecánica, se debe tener en cuenta la homogenización del grano sobre la mesa, de forma que no haya espacios entre granos. Se utiliza aspiración para eliminar el polvillo. Debe tenerse en cuenta que el ángulo de inclinación de la mesa debe ser aproximadamente entre  $30^\circ$  y  $40^\circ$  (Hernández, 2012).

El producto llega sobre la válvula de cierre del aire y pasa hasta la esquina inferior de la mesa. La mesa esta provista de una tela perforada, a través de la cual fluye el aire proporcionalmente de abajo hacia arriba. Mantenido sobre cojines de aire, fluye el grano, después de pasar la zona de separación llega el grano limpio a la salida. Las piedras las cuales no son mantenidas por la fuerza del aire llegan por medio del movimiento de oscilación a la parte final (parte de la mesa más elevada), donde por medio de aire a contracorriente son separadas completamente del grano y llegan a la salida de piedras (Hernández, 2012).



**Figura 7.** Deschadora en seco industrial. Fuente: Autor

Silos de Consumo.

Estos silos están diseñados para almacenar el grano limpio que entrara al siguiente proceso. Deben permanecer libres de cualquier tipo de infestación, por lo cual debe realizarse una limpieza exhaustiva para que no haya ninguna proliferación de bacterias u hongos, manteniendo así la inocuidad del producto. Cuentan con sensores de nivel para controlar la cantidad de grano y así no habrá sobrecarga que pueda ocasionar problemas de atascamiento y desbordamiento del producto (Hernández, 2012).



**Figura 8.** Silos de Consumo. Fuente: Autor

Acondicionamiento del grano.

Este proceso consiste en ajustar la humedad del grano para facilitar la separación de la cáscara y el salvado del endospermo y así mejorar la eficiencia y calidad de la molienda, el salvado se endurece y se acondiciona el almidón del endospermo. El grano se somete a la adición de agua con un posterior reposo alcanzando una humedad del 15-15.5 %

para trigos blandos y de 16.5% para trigos duros a una temperatura inferior de 45°, el reposo depende del tipo de trigo, (Hernández, 2012), a continuación se describirá los equipos que intervienen en este proceso.

Tanque de Recepción.



**Figura 9.** Tanque de almacenamiento. (Fotografía) grupolassen.com

El tanque de recepción está diseñado para recibir el grano proveniente de los silos de consumo por medio de un elevador de canjilones y un juego de sinfines. El tanque debe tener un sensor sonda de nivel para controlar la entrada de grano al proceso (Hernández, 2012).



**Figura 10.** Diseño mecánico de elevador de canjilones. Fuente: Autor.



**Figura 11.** Sinfines de transporte. Fuente: Autor.

Pulidor del grano.

El principio de funcionamiento del pulidor es separar los componentes del grano por medio de la fricción entre el grano, la malla y el rotor, el cual permite pulir el grano de forma que el germen y el pericarpio (cascarilla) se desprenda del endospermo. El pulidor posee un sistema de ventilación para retener el grano dentro del dispositivo.

(Hernández, 2012).



**Figura 12.** Pulidor industrial vertical. Fuente: Autor

## Ciclón.

El ciclón es un equipo de forma cónica, usado para separar partículas sólidas pequeñas o polvo fino de gases (aire). El gas y partículas sólidas entran tangencialmente por la parte superior. La penetración de la mezcla le imparte un movimiento giratorio continuo descendente y ascendente. Las partículas más pesadas descienden por la parte inferior del ciclón, por el peso, también existe mayor velocidad porque se disminuye el área de salida. Las partículas pequeñas y livianas que se encuentran en suspensión disminuyen su velocidad de transporte cuando ingresan al ciclón porque se aumenta el área de separación, salen por la parte superior debido a la aspiración del ambiente. (Hernández, 2012).



**Figura 13.** Ciclón industrial. Fuente: Autor.

## Cernedor.

El principio de funcionamiento es separar el producto por tamaño de grano mediante una acción mecánica, mediante un movimiento circular realizado por un contrapeso, tamizando así el endospermo desgerminado. El grano entra por la parte superior del

cernedor sobre las mallas que mediante movimiento circular va separando de acuerdo con su tamaño de partícula. Cuando el tamaño de partícula es mayor que la cobertura de la malla queda retenido el material sobre esta, y lo que no, pasara a la siguiente malla, hasta terminar el recorrido, finalmente, por la parte inferior del cernedor sale el material clasificado (Hernández, 2012).

El cernedor está formado por una estructura rectangular metálica compuesta por 22 mallas por sección, siete secciones y seis de ellas tienen aspiración (central), en la sección central se encuentra el sistema de transmisión de potencia que produce el movimiento y en las otras seis secciones se encuentran mallas distribuidas por tamaño de abertura de mayor a menor. El número de malla representa el número de aberturas que hay por pulgada lineal (Hernández, 2012).



**Figura 14.** Cernedor industrial. Fuente: Autor

## Secador

El principio del funcionamiento es un intercambio de calor directo para eliminar humedad del producto. El tratamiento térmico es por medio del paso de vapor en tubos. El objetivo es disminuir el contenido de agua del subproducto para evitar crecimiento microbiano debido a la humedad. La secadora es un intercambiador de calor de carcasa y tubos de contacto directo entre el vapor y el subproducto húmedo. Los tubos tienen aletas o superficies amplias en el exterior de la pared para obtener una mayor transferencia de calor a la vez que circula el subproducto dentro del mismo. El calor que es transferido al subproducto evapora el agua del mismo disminuyendo la humedad, el vapor es aspirado junto con el polvillo (Hernández, 2012).



**Figura 15.** Secador industrial. Fuente: Autor.

## Molienda.

Este proceso consiste en reducir el tamaño del grano por medio de molinos de rodillos. Inicialmente se separa el salvado y el germen del endospermo y posteriormente se reduce este último hasta obtener la harina. El propósito es maximizar el rendimiento de

la harina con el mínimo contenido de salvado. Dicho proceso se fundamenta en dos etapas; ruptura y reducción, la molienda se realiza gradualmente, obteniendo en cada etapa una parte de harina y otra de partículas de mayor tamaño. Los molinos generalmente utilizan entre cuatro y seis juegos de rodillos de ruptura, estos tienen forma de espiral con acanaladuras para romper el grano (figura 16) y los trozos grandes de endospermo. Para la reducción se utiliza otros cuatro o seis juegos de rodillos suaves y lisos que pulverizan los pedazos de endospermo grandes hasta convertirlo en harina, (Hernández, 2012).

#### Trituración.

El grano de trigo después de haber sido limpiado y acondicionado se pasa por el primer juego de rodillos para ser triturado. La velocidad del cilindro superior es 2.5 mayor que la del cilindro inferior. En cada ciclo se obtienen (Hernández, 2012):

- Trozos grandes de grano que van al siguiente triturador de rodillos estriados.
- Sémola impura que va a los sasores
- Una pequeña parte de harina que va a las bolsas o a los silos.

#### Purificación.

Posterior a la trituración se realiza la eliminación del salvado y clasificación de las sémolas por grosor a través de tamices y purificadores. Los sasores están constituidos por tamices oscilantes a través de los cuales circula una corriente de aire de abajo hacia arriba, que arrastra las partículas de salvado, atravesando los trozos de endospermo el

tamiz ya que son más densos al estar limpio. El objetivo de los sasores es limpiar la sémola impura y clasificarla según el tamaño y pureza para la molienda en los cilindros de reducción. Antes de entrar el producto a los sasores es necesario desempolvarlo, eliminando la harina que está adherida, (Hernández, 2012).

### Reducción.

El objetivo de la reducción es moler las sémolas y las semolinas purificadas y convertirlas en harina. Los cilindros de comprensión reducen las partículas de sémola hasta una finura de harina además elimina algunas partículas de salvado y germen que pueden quedar, esta operación se realiza con un cernido. Este proceso se realiza varias veces hasta que queda eliminada la mayor parte de semolina extraíble (Hernández, 2012).



**Figura 16.** Molino de rodillos horizontales y los rodillos lisos industriales. Fuente:

Autor

El molino de martillos realiza la función del molino de impacto o molino secundario. Por medio del impulso del motor al rotor, el material es triturado con el movimiento de los martillos a la place de impacto. Esto genera una trituración más controlada pudiendo

ajustarse a los requerimientos del tamaño del material de salida, como de 1 1/2" hasta finos por medio de las rejillas clasificatorias. No hay material desperdiciado ya que el material inadecuado regresa al molino hasta alcanzar el tamaño requerido. El molino de martillos puede producir diferentes tamaños al mismo tiempo. Figura 17 (Hernández, 2012).



**Figura 17.** Molino de martillos industrial. (Fotografía). Interempresas.net.

Empaque.

El producto madurado y enriquecido se empaqueta en bolsas de polietileno para presentaciones de kilo y libra y bolsas de fibra para presentaciones de bultos de 50 Kg y arrobas a granel de 25Lb, el empaquetado se realiza a través de máquinas como se muestra en la figura 18. Para este proceso existe; Embolsadora dosificadoras y fraccionadoras para polvos, materiales granulados para bolsas valvuladas, bolsas de boca abierta con tolva alimentadora y opcionalmente con tolva de precarga, (Hernández, 2012).



**Figura 18.** Embolsadora dosificadoras y fraccionadoras para polvos industriales.

(Fotografía) lrmelectronica.com.

**Incidencia de la contamina por *Bacillus cereus* en el proceso de fabricación de harina de arroz (*oryza sativa*) y trigo (*Triticum spp*).**

**Tabla 6.** Contaminación por *Bacillus cereus* en procesos productivos.

Factores contaminantes	Descripción/recomendaciones	Etapas del proceso de fabricación
Materia prima	Existe el riesgo de que las materias llegue a la planta de producción contaminadas con <i>Bacillus cereus</i> , es por esto que se recomienda contar con proveedores de materiales que cumplan con los requisitos establecidos por las normas oficiales, establecer y acordar entre la empresa y el proveedor los requisitos y especificaciones de los materiales, asegurar la confiabilidad en la certificación de los materiales recibidos, seleccionar los proveedores que cumplan con los requisitos necesarios para	Recepción del grano

---

garantizar la inocuidad de los materiales, evaluar los proveedores y realizar seguimiento al cierre de brechas y emitir acciones correctivas ante auditorías o quejas y reclamos.

Instalaciones El estado de las edificaciones e instalaciones puede favorecer el crecimiento *Bacillus cereus*, se sabe que esta bacteria se encuentra en el medio ambiente y suele reproducirse en zonas donde haya presencia de polvo y suciedad, de igual manera depósitos de agua, pisos, drenajes y cuartos fríos favorece la sobrevivencia. Las zonas con alto contenido de humedad favorecen la formación de biopelículas. Se debe evitar el uso de difusores de aire que puedan presentar acumulación de agua. El uso de materiales porosos favorece la persistencia de *Bacillus Cereus* en las plantas, los filtros y líneas de conducción son puntos de contaminación. Debido a esto se debe asegurar el diseño, construcción y mantenimiento sanitario de las instalaciones donde se elaboran, almacenan y despachan materias primas, material de empaque y productos terminados para consumo humano y así evitar una posible contaminación cruzada, la correcta ubicación geográfica, diseño y construcción, además de la separación de las áreas críticas de las no críticas y el

---

---

	<p>adecuado diseño, construcción y mantenimiento de puertas, pisos, techos, ventanas, drenajes, instalaciones sanitarias, ventilación, iluminación, abastecimiento de agua, etc., de las edificaciones del establecimiento.</p>	
Equipos y utensilios	<p>Se debe enfocar en el diseño y ubicación de los equipos, de manera que faciliten las buenas prácticas de higiene, monitoreo, producción y almacenamiento inocuo de los materiales y productos, aunado a ello la instalación y uso de los equipos estén acorde al tipo de procesos de manera que se resguarde la inocuidad de los materiales y productos, se respete la secuencia lógica de los flujos del proceso, desde la recepción de la materia prima, empaques y otros insumos hasta la entrega a los centros de producción, almacenamiento y transporte y que los equipos para las operaciones críticas estén dotados de los instrumentos y accesorios para la medición de las variables como por ejemplo: temperaturas, humedad relativa, etc.</p>	Todas las etapas del proceso
Personal	<p>Las personas que intervienen en el proceso pueden convertirse en fuente de contaminación directa e indirecta. Debido a esto se debe garantizar los estándares establecidos en las prácticas higiénicas por parte del personal de las plantas, almacenes, agencias, visitantes y contratistas con el propósito de evitar una</p>	Todas las etapas del proceso.

---

---

fuente de contaminación para las materias primas, empaques, productos en proceso y terminados.

---

Factores de riesgo de contaminación por *Bacillus cereus* en procesos productivos de fabricación de harina de trigo y arroz. Adaptado de: (Instituto Nacional de Salud (INS), 2011)

### **Determinación de puntos de muestreo.**

Para determinar los puntos de muestreo se tiene que considerar todo el proceso productivo desde las materias primas hasta el producto terminado, pasando por el producto en proceso, los ambientes de todas las zonas de la planta procesadora, así como todas superficies, tanto de contacto como de no contacto. (Betelgeux, 2013).

**Tabla 7.** Resumen de recomendaciones para el muestreo de áreas y equipos.

<b>Muestreo</b>	<b>Breve descripción</b>
Cuando	<p>Selección de los lugares de muestreo:</p> <p>Según historial de cada empresa y el proceso productivo. Debe incluir:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Superficies de contacto con alimentos RTE (más frecuencia)</li> <li>- Superficies de no- contacto con alimentos RTE</li> <li>- Ambiente (más ocasional)</li> </ul>
Donde	<p>Momento de realizar el muestreo:</p> <p>Nunca inmediatamente después de la limpieza y desinfección. Para incrementar la probabilidad de detectar una cepa persistente es recomendable:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Durante el procesado</li> <li>- Después de mínimo 2h de producción</li> <li>- Final de la tanda de producción</li> </ul> <p>Muestreo diario o bien rotativo (no siempre el mismo día de la semana)</p>

---

---

Como	<p>Dispositivo para la toma de muestra:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Gasa / toallita / esponja o escobilla (por áreas pequeñas o de difícil acceso)</li> <li>- Seco (para áreas húmedas) o bien húmedo (para áreas secas)</li> </ul> <p>Diluyente:</p> <p>Soluciones estériles sin neutralizante, excepto si se espera la presencia de residuos de desinfectantes (ejemplo después de la limpieza y desinfección)</p> <p>Área:</p> <p>Lo más extensa posible. Recomendable entre 1000- 3000 cm<sup>2</sup> (evitar uso de plantillas que podrían contribuir a diseminar la contaminación)</p>
------	---

---

Resumen de las recomendaciones para el muestreo de áreas y equipos usados para la producción de alimentos listos para el consumo (RTE). (Bover-Cid y Garriga, 2014)

### **Desafíos Industriales**

Debido a que las cepas se encuentran en el medio ambiente, es difícil pretender que materias primas e ingredientes alimentarios se encuentren libres de contaminación, es por esto que deben tenerse en cuenta en la producción de alimentos, especialmente, cepas eméticas, capaces de producir mucho calor. La toxina de cereulida es estable y resistente a los ácidos, además son motivo de preocupación, ya que las bacterias pueden eliminarse durante la producción y el procesamiento de alimentos pero la toxina será imposible de erradicar. La temperatura es un factor crítico en la producción y procesamiento de alimentos, es uno de los factores externos mejor estudiados con respecto a la Cereulida. Las cepas eméticas de *Bacillus cereus* sensu stricto (s.s.) son mesofílicas cepas que crecen entre  $\geq 10^{\circ}\text{C} - 48^{\circ}\text{C}$ , (Carlin et al., 2006; Apetroaie et al., 2008).

## Implicaciones Para la Industria de Alimentos

Una vez se introduce en líneas de producción, la eliminación es un desafío, debido a la resistencia ambiental de sus esporas, estas demuestran resistencia al calor elevado y propiedades hidrofóbicas. Una vez se adhieren a la superficie, podría formar biopelículas, que aumentará la resistencia de las bacterias al calor y a la limpieza. Sin embargo, la resistencia al calor varía según los factores intrínsecos y extrínsecos. Por ejemplo, el tiempo de supervivencia de las esporas de *Bacillus cereus* en el tampón a 100 ° C puede ser <0.07 min, mientras que en el aceite de oliva las esporas de *Bacillus cereus* pueden incluso sobrevivir 121 ° C durante más de 15 min ( $D_{121\text{ ° C}} = 17.5$  min), (Katia et al., 2020).

Durante el procesamiento de alimentos, las esporas de cepas eméticas pueden volverse dominantes debido a su mayor resistencia al calor en comparación con las esporas de cepas no eméticas. Estos resultados han sido corroborados por un estudio que muestra que las cepas pertenecientes al grupo filogenético III, que comprende el emético *Bacillus cereus* cepas de *cereus*, muestran la mayor resistencia al calor de los miembros de *Bacillus cereus*, con  $T_{logD} = 0.8\ 96.6 \pm 3.5\text{ ° C}$  (Luu-Thi et al., 2014). Además, recientemente  $D_{95\text{ ° C}}$ -valores para dos cepas eméticas (7.04 y 6.64 min en tampón, respectivamente) se han informado, que fueron aproximadamente de 2 a 10 veces más altas que los valores  $D_{95\text{ ° C}}$  determinados para cepas no eméticas, (Katia et al., 2020).

No es posible inactivar la cereulida preformada en un alimento matriz, solo es posible con la destrucción completa de la comida misma, tampoco puede ser destruido utilizando procesamientos térmicos; comotostado, cocinado o microondas. Como es

estable en un rango de pH de pH 2 a pH 11, las medidas higiénicas normales en la producción no son efectivas, debido a su pequeño tamaño, Además, la cereulida podría unirse a superficies hidrofóbicas, como tuberías de procesamiento de alimentos. La seguridad alimentaria solo se puede garantizar evitendo el crecimiento de la bacteria en sí o mediante el establecimiento de estrategias para la prevención en la producción, procesamiento y almacenamiento de alimentos, (Katia *et al.*, 2020).

Como se dijo anteriormente, la temperatura es fundamental en el control de la formación de *Cereulide*. Generalmente en la fabricación de alimentos se maneja varios procesos, (por ejemplo, mezcla de ingredientes, tratamiento térmico, enfriamiento o intermedio almacenamientos) en los que la temperatura juega un papel importante y podría convertirse en un parámetro crítico para producción de cereulida. El almacenamiento intermedio es un punto crítico al cual se le debe prestar atención. Si el producto se almacena en condiciones favorables, las cantidades bacterianas irán en aumento rápido ( $\geq 10^4$ - $10^5$  ufc / ml o g), la producción de cereulida podría ser desencadenada y la toxina puede acumularse (Frenzel et al., 2011).

El tiempo para un almacenamiento intermedio seguro depende de temperatura de almacenamiento y el recuento bacteriano al comienzo del procedimiento de almacenamiento, este debe establecerse según el tipo de producto para controlar el crecimiento bacteriano y para minimizar el riesgo de cereulida en la producción.

## **Estudios biotecnológicos enfocados en la detección e inactivación del patógeno**

### **Bacillus cereus y sus toxinas.**

A pesar de los esfuerzos por combatir la contaminación por patógenos transmitidos por alimentos, día a día cientos de productos alimenticios resultan contaminados por bacterias que comúnmente se conocen como Salmonella, Escherichia coli, Listeria, *Bacillus Cereus*, etc., aspecto que no solo afecta la salud humana, por el elevado índice de morbilidad causado por las (ETAS), de igual manera impacta a las empresas del sector alimentario. Los métodos de biodetección que regularmente se utilizan, no han permitido contrarrestar esta problemática, por esa razón se ha visto la necesidad de investigar otro tipo de técnicas mucho más eficientes y eficaces, de las cuales se discutirá en este capítulo, con el ánimo de mostrar al lector nuevas alternativas, que beneficiaran no solo al consumidor sino también al sector productivo.

La detección rápida y sensible de patógenos transmitidos por los alimentos en la industria alimentaria es de gran importancia en la práctica diaria para garantizar la inocuidad de los alimentos. La contaminación de los alimentos y el agua con bacterias es actualmente una preocupación pública en todo el mundo, ya que se asocia con una mayor tasa de mortalidad y carga económica debido a los posibles brotes. Los patógenos bacterianos transmitidos por los alimentos comúnmente existen en materias primas alimenticias. Esto se debe a la exposición continua a instalaciones higiénicas inadecuadas y prácticas de saneamiento inadecuadas, (Sarah et al., 2020). A pesar de que se han logrado avances en la detección y análisis de bacterias patógenas utilizando tanto inmunoensayos como diagnósticos moleculares, rara vez se desarrollan herramientas de captura efectivas y no se comprenden los mecanismos de captura. Por

lo tanto, para gestionar la seguridad alimentaria, se requieren herramientas de captura in situ, rentables, sensibles y fiables mediante el tacto, (Kwang et al., 2019).

Los métodos tradicionales para la detección de estas bacterias en la matriz alimentaria se basan en el enriquecimiento de la muestra y el posterior cultivo de patógenos en placa de agar, seguido de la identificación bioquímica. Este método tiene limitaciones relacionadas con el requisito de medios específicos para el enriquecimiento, temperaturas de incubación optimizadas para diferentes especies de bacterias, alto número de placas de Petri para cultivo y personal capacitado para el aislamiento e identificación de los microorganismos. Además, la identificación exitosa de un patógeno específico puede llevar hasta una semana, lo que se considera prolongado. Por lo tanto, los métodos microbiológicos estándar de oro convencionales no cumplen demanda de pruebas rápidas de patógenos en productos alimenticios. Estos inconvenientes han fomentado el desarrollo de métodos de detección alternativos cuyo objetivo es paliar algunas de las desventajas de los métodos de detección estándar, Sarah et al. (2020).

A nivel mundial, la detección y cuantificación se realiza empleando pruebas de tipo fenotípico y se llevan a cabo de acuerdo con las Normas Internacionales ISO 7932:2004 e ISO 21871:2006 (Martínez, 2008), Estas normas establecen realizar el recuento en placa utilizando agares diferenciales para *Bacillus cereus*. En Colombia el Instituto Nacional para la Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA), implementó la Norma Técnica Colombiana NTC: 4679 versión 1 de 2006, que es una adopción modificada de la norma ISO 7932:2004, por la cual se determina el procedimiento para el análisis y la cuantificación de colonias de *Bacillus cereus* en alimentos para humanos

y animales (ICONTEC, 2006). A continuación se describen las pruebas fenotípicas y moleculares más utilizadas en la detección, además, se discuten otros ensayos para la detección de sus toxinas, como las herramientas inmunoenzimáticas, la utilización de líneas celulares y métodos de análisis instrumental (Sánchez et al., 2016).

### **Pruebas Fenotípicas**

*Bacillus cereus* puede ser aislado e identificado en muestras alimenticias en el medio de cultivo MYP. La característica principal es la formación de un precipitado blanco, alrededor de las colonias que crecen de color rosa, el cual corresponde a la hidrólisis de lecitina en el medio. El rojo de fenol se utiliza para detectar cambios de pH en el medio producto de la fermentación del manitol; las colonias que crecen de coloración amarilla, resultado del descenso de pH del medio por la fermentación del manitol, no corresponden a colonias de *Bacillus cereus*, y la polimixina determina la selectividad del medio puesto que inhibe a las bacterias Gram negativas (Bhunja, 2008).

Este método ha sido utilizado en diversos estudios para el aislamiento, enumeración y caracterización en diferentes matrices como arroz (Sarrías et al., 2002), alimentos refrigerados que contienen vegetales (Choma et al., 2000), entre otros. La desventaja de este método es que no diferencia a *Bacillus cereus* de otros miembros del grupo 1A de *Bacillus* como *B. thuringiensis*, *B. anthracis* y *B. mycoides*, lo que puede generar una identificación errónea de la cepa (Peng et al., 2001).

## Pruebas Moleculares

Los métodos microbiológicos utilizados comúnmente en la detección de estos patógenos, de origen alimentario, son laboriosos y consume mucho tiempo. Esta situación, aunada a la demanda por resultados inmediatos y a los avances tecnológicos, ha conducido al desarrollo de una amplia gama de métodos rápidos en las últimas décadas. Para esto existen métodos moleculares utilizados en la detección e identificación de microorganismos patógenos transmitidos por alimentos.

La literatura reciente reporta un número significativo de técnicas moleculares, alternativas, sensibles y selectivas para la detección, enumeración e identificación de microorganismos patógenos en alimentos, siendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la plataforma más popular, mientras que la secuenciación de alto rendimiento se perfila como una técnica de gran aplicabilidad a futuro. Sin embargo, aun con todas las ventajas que ofrecen estas novedosas metodologías, no se deben pasar por alto sus limitaciones. Así, por ejemplo, los métodos moleculares no constituyen protocolos estandarizados, lo que dificulta su utilización en algunos casos. Por esta razón se debe trabajar arduamente para superar tales limitaciones y mejorar la aplicación de estas técnicas en matrices tan complejas como los sistemas alimenticios, (Palomino y Gonzales, 2014).

## **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La enumeración de patógenos transmitidos por alimentos es un aspecto principal del diagnóstico molecular microbiológico, especialmente si quiere utilizarse para la evaluación cuantitativa del riesgo. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la técnica de diagnóstico molecular más ampliamente utilizada debido a su protocolo rápido y de fácil uso. Por lo general, 2-3 h son necesarias para completar una PCR, pero hoy en día se están desarrollando sistemas de PCR más avanzados para generar un resultado en cuestión de minutos, (Palomino y Gonzales, 2014).

Muchos microorganismos patógenos, asociados a alimentos son capaces de producir toxinas. Entre ellos se puede mencionar a *S. aureus*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Bacillus cereus*, y *E. coli*. En base a esto se han desarrollado diferentes tipos de métodos dirigidos a la detección de genes para toxinas. Estos métodos incluyen; amplificación e hibridación con sondas. Los métodos de PCR dirigidos a la detección de toxinas se han desarrollado para varias especies bacterianas como; *V. cholerae*, *E. coli* y algunos aislados de estafilococos, por nombrar unos pocos. Muchos de los métodos basados en ácidos nucleicos utilizan la PCR para detectar toxinas diferentes o genes de virulencia que permiten que las bacterias se conviertan en patógenos. (Palomino y Gonzales, 2014).

Las ventajas de estos ensayos, junto con su facilidad de uso y la susceptibilidad a la automatización los hacen muy atractivos para su aplicación en alimentos, con el fin de superar la larga etapa de cultivo de enriquecimiento. Es posible que la investigación y la evolución en este campo crezcan y conduzcan a ensayos de detección; rápidos,

específicos y sensibles, que se puedan realizar directamente en muestras de alimentos en un futuro próximo (Palomino y Gonzales, 2014).

### **Biosensores.**

Varios métodos basados en biosensores se han aplicado exitosamente en la detección de patógenos alimentarios. Estos sensores se han desarrollado utilizando ADN, técnicas inmunológicas y péptidos de fagos (Tabla 8). Los biosensores poseen varias propiedades atractivas, incluida una alta sensibilidad y especificidad, respuesta rápida, rendimiento robusto, capacidad de multiplexación, costo-efectividad y portabilidad, lo que les permite ser ampliamente utilizados para la detección de agentes químicos y biológicos. Particularmente, los biosensores han atraído un gran interés en la identificación y detección de bacterias en alimentos perecederos y semi-perecederos, debido a su cuantificación casi en tiempo real (pocos minutos versus varias horas), sin preenriquecimiento y detección in situ con formato fácil de usar. Generalmente, un biosensor contiene dos componentes esenciales: un elemento de reconocimiento de objetivos y un transductor de señal que transforma el reconocimiento de objetivos en señales detectables físicamente. Se han adoptado varios tipos de elementos de reconocimiento para la detección de bacterias, como anticuerpos, aptámeros, fagos, péptidos antimicrobianos (AMP), lectina, células, enzimas, etc. Entre ellos, los AMP son una de las alternativas más potenciales debido a su alta estabilidad, síntesis simple, fácil accesibilidad y alta afinidad hacia las bacterias, (Zhaohui et al., 2020).

**Tabla 8.** Métodos biosensores para la detección de patógenos en alimentos.

Técnicas de detección	Organismos	Compuestos Detectados
<b>Biosensores basados en ADN</b>	Patógenos	<i>Bacillus anthracis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria Monocytogenes</i>
	Compuestos	Aflatoxinas, PCB, Pesticidas
<b>Biosensores basados en enzimas</b>	Patógenos	<i>E. coli O157:H7</i> , <i>Salmonella enterica sv.</i> <i>Typhimurium</i>
	Compuestos	Pesticidas, antibióticos (leche), ácido benzoico (bebidas de soda), L lactasa 1 (pasta de tomate), aminas biógenas 1 (sauerkraut)
<b>Biosensores basados en anticuerpos y receptores 2</b>	Patógenos	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Campylobacter spp.</i> , <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. enterica sv. enteritidis</i> , <i>S. entérica Sv. typhimurium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Yersinia pestis</i>
	Compuestos	Pesticidas, antibióticos (leche), solventes orgánicos, Aflatoxinas, enterotoxina B estafilocócica

1 Compuestos para indicar frescura en el alimento.

2 Biosensores que combinan técnicas inmunológicas y péptidas de fagos. (Palomino y Gonzales, 2014).

### **Cultivos En Líneas Celulares**

Las enterotoxinas forman poros en la membrana de las células eucariotas, para ser detectados se utiliza la microscopía electrónica de barrido. Esta característica se ha utilizado para la detección de las toxinas en cultivos en líneas celulares animales como Vero y McCoy (Raddadi et al., 2010).

La toxina puede ser identificada en un bioensayo utilizando espermatozoides de cerdo, en los cuales la toxina afecta la función mitocondrial, inhibiendo su motilidad; asimismo, puede ser evaluada en el cultivo celular HEP-2; causando vacuolas a las células (Stenfors et al., 2008). Estos ensayos basados en líneas celulares animales son de alto costo y el requieren de una compleja infraestructura (Bhunja, 2008).

### **Inmunoensayo**

Estos se caracterizan por ser inmunoenzimáticos basados en anticuerpos, para la detección de las enterotoxinas El inmunoensayo visual bde-via de Tecra® detecta la subunidad A de la enterotoxina NHE (Raddadi et al., 2010); el método de la aglutinación reversa pasiva (bcet-rpla) de Oxoid®, detecta la subunidad L2 de la enterotoxina HBL, mientras que el test Duopath® *Cereus Enterotoxins* de Merck®, utiliza anticuerpos monoclonales dirigidos a las subunidades B y L2 de las

enterotoxinas NHE y HBL, respectivamente (Krause et al., 2010). Estas pruebas sólo detectan una toxina específica, por lo que pueden producir resultados falsos negativos.

### **Efecto de ultrasonidos y tratamientos térmicos y de presión en la inactivación de esporas de *Bacillus cereus*.**

Muchos enfoques alternativos a los tratamientos térmicos han probado y propuesto con éxito para la alimentación. Actualmente, numerosos estudios se están centrando en tecnologías no térmicas o han reducido la intensidad del calor durante la esterilización mediante la combinación de métodos térmicos y no térmicos. Estos incluyen procesos de alta presión hidrostática (HPP) combinado con calor o HPP-térmico, alta presión dióxido de carbono y radiación, ultrasonido (EE. UU.) Tiene ondas acústicas con frecuencias en el rango de 20 a 100 kHz. El ultrasonido se ha aplicado en la industria alimentaria y en la investigación sobre la inactivación de microorganismos y enzimas, así como a la extracción asistida por ultrasonido. El ultrasonido es una tecnología Bgreen, que puede reducir el consumo de energía y agua, generar menos gases de efecto invernadero, aumentar la tasa de utilización de los recursos y garantizar productos de alta calidad y seguridad, (Ruiling et al., 2019).

Específicamente, se informó que el ultrasonido posee propiedades antimicrobianas, además de su papel positivo en la extracción, homogeneización, mezcla, desespumante y emulsificación. La razón última del efecto bactericida del ultrasonido de potencia de alta intensidad es su efecto de cavitación, lo que da como resultado la producción y colapso de microburbujas. El colapso genera enorme temperatura localizada (5500 K) y presión (aproximadamente 50 MPa). Otra teoría para explicar el efecto letal del

ultrasonido sugiere que la sonicación de cualquier líquido da como resultado la formación de radicales libres, que ataca el ADN dentro las células microbianas, (Ruiling et al., 2019).

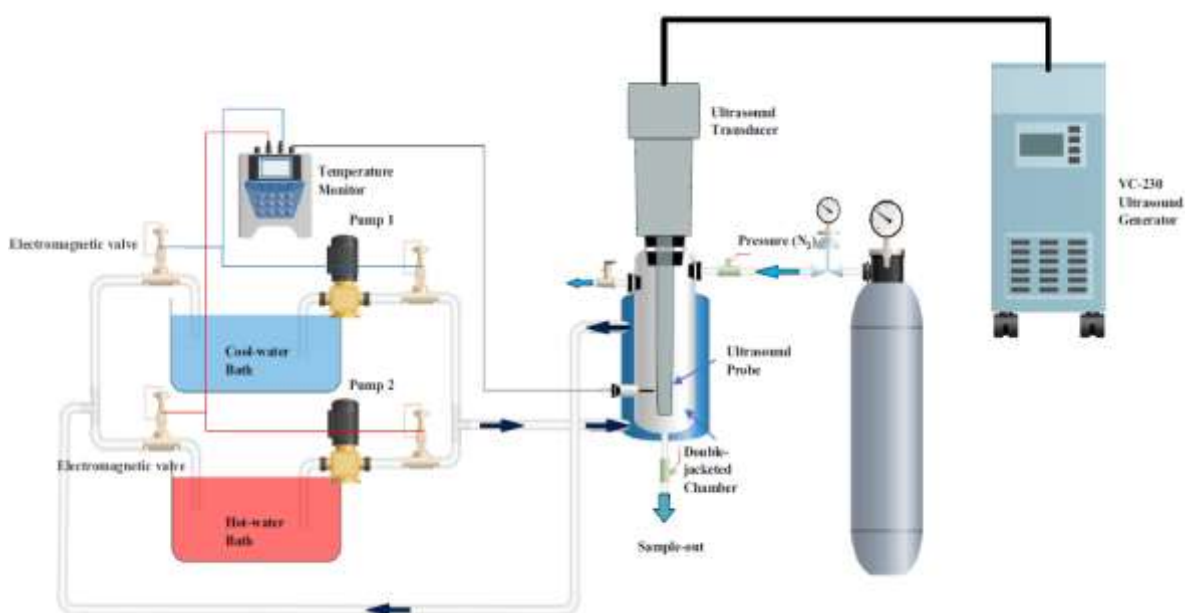
Las células vegetativas son sensibles al ultrasonido mientras que sus contrapartes de esporas son resistentes al tratamiento. Sin embargo, termosonicación (TS) y manosonicación (MS) han reducido esta resistencia, por lo que aumentando la inactivación de esporas. Sin embargo, una temperatura superior existe un límite ( $60^{\circ}\text{C}$ ) para la inactivación de TS. La temperatura excesiva, tiene un efecto amortiguador de la cavitación y tratamiento, y más allá de esta temperatura, el tratamiento no resulta en cualquier muerte adicional de los microorganismos, (Ruiling et al., 2019).

### **Tratamientos de ultrasonidos.**

Los tratamientos de ultrasonido se realizaron utilizando una escala de laboratorio Sistema MTS (Fig. 19) 800 W, 20 Procesador ultrasónico de alta intensidad kHz Vibra-Cell VC-230 (Sonics & Materials Inc., Newtown, CT) con una sonda de titanio sólido de 13 mm revestida de acero que se colocó en un reactor de doble camisa con un diámetro interior de 40 mm, fue utilizado con un volumen de muestra de trabajo de 40 mL. El equipamiento también tenía la capacidad de medir la potencia de ultrasonidos siendo generados durante el proceso. La sonda de ultrasonido estaba sumergida en la muestra y la distancia entre la punta de la sonda al fondo de la cámara era de 9 mm. La temperatura de la muestra fue monitoreada a través de un sensor térmico y controlado mediante la circulación de agua a través de una camisa de agua. El relé conectado al sensor térmico transfirió una señal para mantener la muestra a la temperatura deseada

durante el tratamiento a través de las válvulas electromagnéticas. Presurización en los tratamientos MTS y MS fueron proporcionados por una fuente de nitrógeno, (Ruiling et al., 2019).

Las condiciones de tratamiento fueron las siguientes: MTS (400 kPa, 80 ° C, 20 kHz, 100%), TS (100 kPa, 80 ° C, 20 kHz, 100%), MS (400 kPa, 20 kHz, 100%), T (80 ° C) y EE. UU. (20 kHz, 100%) hasta 30 min. Antes de los experimentos, la sonda y la cámara fueron lavadas a fondo y se desinfecta con etanol al 75% y luego etanol residual en la sonda, y la cámara se lavó con agua destilada esterilizada. Para cada tratamiento, 36 mL de estéril, se colocó agua destilada en el reactor y se precalentó al valor objetivo. Una vez alcanzada la temperatura objetivo, 4 mL de esporas resuspendidas se inoculó en el destilado estéril agua. La concentración inicial de esporas en el sonoreactor fue aproximadamente 107 UFC / mL. Inmediatamente después de la inoculación, las muestras se trataron en diferentes momentos, las muestras se recolectaron e inmediatamente se enfriaron en hielo, (Ruiling et al., 2019).



**Figura 19.** Sistema de manotermosonicación a escala de laboratorio (MTS)

(Ruiling et al., 2019).

La población de supervivencia de esporas de *Bacillus cereus* después de EE. UU. (20 kHz, 100%), T (80 ° C), TS (80 ° C, 20 kHz, 100%), MS (400 kPa, 20 kHz, 100%) y MTS (400 kPa, 80 ° C, 20 kHz, 100%) los tratamientos se presentan en la Tabla 9. La inactivación por el ultrasonido fue insignificante, incluso cuando se combina con presión, lo que resultó en reducciones logarítmicas de 0.3 después de 30 min. Además, no se observó ninguna diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre los tratamientos con y sin presión excepto para el tratamiento de 30 min. El efecto esporicida del el tratamiento térmico fue incluso mejor que el tratamiento con ultrasonido combinado con presión. Ultrasonido de potencia simultánea y los tratamientos térmicos (TS) lograron reducciones de 0.41 log después de 15 min de tratamiento. Sin embargo, el efecto de MTS fue significativo en comparación con los tratamientos T, TS, US y MS. Una reducción logarítmica de 1.18 después de 5 min de tratamiento con MTS fue logrado que fue mucho mayor que la reducción lograda por los otros tratamientos a los 30 min, (Ruiling et al., 2019).

Las esporas tratadas reducidas de manera constante con el tiempo de procesamiento MTS, y un log de 3.0 (CFU / mL) se registró una reducción después de 20 min. En la etapa inicial, 1,18 log (UFC / ml) La inactivación de las esporas de *Bacillus cereus* fue logrado dentro de los 5 min del tratamiento MTS. Este declive fue más drástico hacia los últimos 5 min (0.07 log (CFU / mL)) del tratamiento. En otras palabras, se produjo una tasa decreciente en la inactivación de las esporas con el aumento de la duración del tratamiento con MTS, (Ruiling et al., 2019).

**Tabla 9.** Supervivencia de las esporas de *Bacillus cereus* después de tratamientos en diferentes momentos.

Tiempo (min)	5	10	15	20	25	30
US	7.29 ± 0.06A; a	7.27 ± 0.05A; a,b	7.22 ± 0.03A; a,b,c	7.21 ± 0.07A; a,b,c	7.19 ± 0.01A; b,c	7.18 ± 0.03A; c
T	7.25 ± 0.04A; a	7.18 ± 0.03A; a,b	7.10 ± 0.06A; b,c	7.04 ± 0.07A; c	6.99 ± 0.08B; c	6.92 ± 0.12B; d
TS	7.20 ± 0.07A; a	7.04 ± 0.08A; a,b	6.89 ± 0.17A; b,c	6.87 ± 0.07B; b,c	6.84 ± 0.03C; c	6.79 ± 0.08B,C; c
MS		7.22 ± 0.08B; a,b				
MTS	7.29 ± 0.03A; a	5.71 ± 0.01C; b	7.15 ± 0.03B; b,c	7.17 ± 0.06C; b,c	7.13 ± 0.02D; c	7.00 ± 0.02C; d
	6.12 ± 0.10B; a		5.00 ± 0.02C; c	4.50 ± 0.01D; d	4.25 ± 0.01E; e	4.18 ± 0.03D; e

La población inicial de las esporas fue de aproximadamente  $7,30 \pm 0,02$  log UFC / mL. Los valores fueron las medias de las mediciones por triplicado  $\pm$  desviación estándar; valores con diferentes letras mayúsculas en la misma columna y letras minúsculas en la misma fila mostraron diferencias significativas en  $p < 0.05$ , Ruiling et al (2019).

## Conclusiones.

La problemática expuesta en este documento es muy clara en cuanto a salud pública se refiere, sin embargo, no se cuenta con suficiente información cualitativa y cuantitativa, de la afectación que genera a los procesos productivos en la industria alimentaria, de ahí la importancia de investigar más a fondo al interior de las líneas de producción y poder dilucidar el verdadero impacto que trae consigo la contaminación microbiológica en los productos alimenticios en proceso.

Cuando los porcentajes de contaminación por *Bacillus Cereus* en las líneas de producción, sobrepasa los límites establecidos en la normatividad, se debe recurrir a paradas de proceso no programadas, dicho microorganismo se ha vuelto capaz de crear una alta resistencia a condiciones ambientales y a técnicas físico-químicas de limpieza, ocasionando incumplimiento en los planes de producción, paradas largas en los procesos, extensas jornadas de limpieza y grandes cantidades de producto rechazadas por microbiología fuera de especificación. En consecuencia, se ha creado la necesidad de indagar en nuevas estrategias para contrarrestar esta contaminación patogénica.

En la actualidad el principal objetivo de las empresas productoras de alimentos es simplificar aquellas técnicas de detección de este microorganismo, así mismo disminuir los tiempos de detección y disminuir los elevados costos a los cuales tiene que incurrir. La ciencia y la biotecnología han desarrollado nuevas alternativas de detección y cuantificación, fundamentadas en las técnicas convencionales, con el objetivo de eliminar dichas barreras y por consiguiente brindar nuevas herramientas para el control y prevención de dicha problemática.

Durante las últimas décadas, se han desarrollado varios métodos para la detección de patógenos transmitidos por los alimentos. Los métodos basados en cultivo, incluido el cultivo selectivo, la identificación bioquímica catiónico y serológico se conocen como los métodos estándar de oro para la detección sensible y precisa de bacterias. Sin embargo, requieren mucho tiempo y trabajo. Ensayos de ácido nucleico basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que se basan principalmente en la amplificación de especies, fragmento de ácido nucleico dentro de un organismo objetivo, son lo suficientemente sensibles como para detectar bacterias incluso en niveles únicos, por ende, están involucrados el pretratamiento y el aislamiento del ADN de muestras complicadas, y posiblemente los resultados positivos se originaron en casos no específicos y la amplificación del catión no se puede evitar.

Ensayos basados en inmunología, que emplean la interacción entre el anticuerpo y el antígeno en la superficie de las bacterias diana, son rápidas y altamente específicas, pero ellos sufren de baja sensibilidad, alto costo y manipulaciones tediosas. Para lograr una detección simple y automática de bacterias, se han desarrollado kits comerciales de prueba rápida, incluido el sistema API para la caracterización bioquímica de bacterias, el sistema BAX basado en PCR e inmunoenzimático VIDAS.

Excepto el sistema API, los otros dos sistemas pueden proporcionar resultados en 24 h, sin embargo, requieren tediosos y costosos instrumentos, que apenas se aplican en prueba de campo y áreas menos desarrolladas. Por lo tanto, para lograr la detección rápida, simple y sensible de bacterias, se necesitan pruebas de campo, mayor desarrollo y adaptación del método de detección, la detección rápida de contaminantes

alimentarios en una etapa temprana es fundamental para la optimización de los procesos para la industria harinera.

El desarrollo y la optimización de alternativas novedosas para el seguimiento, caracterización y enumeración de patógenos en alimentos es uno de los aspectos clave en la microbiología de alimentos, y se vuelve cada vez más importante para la agricultura, la industria alimentaria y los consumidores.

## Referencias

- Anderson, A., Rönner U, & Granum P. (1995). What problems does the food industry have with the sporeforming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* International Journal of Food Microbiology. (28), 145-55.
- Andersson, M.A., Hakulinen, P., Honkalampi-Hämäläinen, U., Hoornstra, D., Lhuguenot, J.-C., Mäki-Paakkanen, J., Savolainen, M., Severin, I., Stamatii, A.L., Turco, L., Weber, A., von Wright, A., Zucco, F., & Salkinoja-Salonen, M. (2007). Toxicological profile of cereulide, the *Bacillus cereus* emetic toxin, in functional assays with human, animal and bacterial cells. *Toxicon* (49), 351–367. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.10.006>.
- Apetroaie-Constantin, C., Shaheen, R., Andrup, L., Smidt, L., Rita, H., & Salkinoja-Salonen, M. (2008). Environment driven cereulide production by emetic strains of *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.* (127), 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.006>.
- Barboza, Corona. (2010). Inocuidad y bioconservación de alimentos. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=41613084005>
- Batchoun, R., Al-Sha'er, & A.I., Khabour, O.F. (2011). Molecular characterization of *Bacillus cereus* toxigenic strains isolated from different food matrices in Jordan. *Foodb. Pathog. Dis.* (8), 1153–1158. <https://doi.org/10.1089/fpd.2011.0853>.
- Bauer, T., Stark, T., Hofmann, T., & Ehling-Schulz, M. (2010). Development of a stable isotope dilution analysis (SIDA) for the quantification of the *Bacillus cereus* toxin cereulide in foods. *J. Agric. Food Chem.* (58), 1420–1428. <https://doi.org/10.1021/jf9033046>.

- Betelgeux. (2013). Estrategias de control de *Listeria monocytogenes* persistente. Retrieved from [http://www.betelgeux.es/images/files/Documentos/Enrique\\_Orihuel\\_ \\_Estrategias\\_de\\_control\\_de\\_Listeria\\_monocitogenes\\_persistente.pdf](http://www.betelgeux.es/images/files/Documentos/Enrique_Orihuel_-_Estrategias_de_control_de_Listeria_monocitogenes_persistente.pdf)
- Bhunja, A. (2008). *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*. Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis. (pp. 135-48).
- Bover-Cid, S., y Garriga, M. (2014). Investigación sobre las condiciones que determinan el crecimiento y la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. Retrieved from [https://www.gencat.cat/salut/acsa/html/es/dir3122/informe\\_listeria\\_irta\\_2014\\_es.pdf](https://www.gencat.cat/salut/acsa/html/es/dir3122/informe_listeria_irta_2014_es.pdf)
- Carolina, Palomino-Camargo1. Yuniesky, González-Muñoz. (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. (31), 3. 535-46.
- Carlin, F., Fricker, M., Pielaat, A., Heisterkamp, S., Shaheen, R., Salonen, M.S., Svensson, B., Nguyen-The, C., & Ehling-Schulz, M. (2006). Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Food Microbiol.* (109), 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.022>.
- Carlin, F., Brillard, J., Broussolle, V., Clavel, T., Duport, C., & Jobin, M. (2010). Adaptation of *Bacillus cereus*, and ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environmental. *Food Research International*. (43), 1885-94.
- Ceuppens, S., Boon, N., Rajkovic, A., Heyndrickx, M., Van de Wiele, T., & Uyttendaele, M. (2010). Quantification methods for *Bacillus cereus* vegetative

cells and spores in the gastrointestinal environment. *J Microbiol Meth.* 83 (2), 202-10.

- Choma, C., Guinebretiere, M., Carlin, F., Schmitt, P., Velge, P., & Granum, PE. (2000). Prevalence, characterization and growth of *Bacillus cereus* in commercial cooked chilled foods containing vegetables. *J Appl Microbiol.* 88(4), 617-25. Epub 2000/05/03.
- Collado, J. Fernandez, A. Rodrigo, & M. Martinez, A. (2006). Modelling the effect of a heat shock and germinant concentration on spore germination of a wild strain of *Bacillus cereus*. *International Journal of food microbiology.* (106), 85-9.
- Consumer Eroski. (2009). Del grano a la harina. <https://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/del-grano-a-la-harina.html>
- De Vos, PG., Jones, D. Krieg, N. Ludwig, W. Rainey, F. Schleifer, K. Whitman, W. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second ed. Athens, GA. Springer.
- EFSA BIOHAZ Panel, (2016). Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. *EFSA J.* 14, e04524. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4524>.
- Eglezos, Sofroni. (2010). Microbiological Quality of Wheat Grain and Flour from Two Mills in Queensland, Australia. *Journal of food protection.* (73), 1533-1536.
- Ehling-Schulz, M., Knutsson, R., & Scherer, S. (2011). *Bacillus cereus*. In: Kathariou, S., Fratamico, P., Liu, Y. (Eds.), *Genomes of Food- and Water-Borne Pathogens*. ASM Press, Washington D.C. (pp. 147–164).
- Ehling-Schulz, M., Frenzel, E., & Gohar, M. (2015). Food-bacteria interplay: pathometabolism of emetic *Bacillus cereus*. *Front. Microbiol.* (6), 704. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00704>.

- Ehling-Schulz, M., Lereclus, D., & Koehler, T.M. (2019). The *Bacillus cereus* group: Bacillus species with pathogenic potential. *Microbiol. Spectr.* 6 GPP3-0032-20181.
- Embolsadora dosificadoras y fraccionadoras para polvos. (Fotografía).  
<https://www.lrmelectronica.com.ar>.
- Faille, C., Bénézec, T. Midelet-Bourdin, G. Lequette, Y. Clarisse, M. Ronse, G. Ronse, A. & Slomianny, C. (2014). Sporulation of *Bacillus* spp. within biofilms: A potential source of contamination in food processing environments, *Food Microbiology*, (40), 64-74.  
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002014000021>)
- Fangio, M., Roura, S., & Fritz, R. (2010). Isolation and Identification of *Bacillus* spp. and Related Genera from different Starchy Foods. *Journal of Food Science.* (75), 218.
- Fernandez-No, IC., Guarddon, M. Böhme, K. Cepeda, A. Calo-Mata, P. & Barros-Velázquez, J. (2011). Detection and quantification of spoilage and pathogenic *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* by real-time PCR. *Food Microbiol.* 28(3), 605-10.
- Finlay, W., & Logan N. (2002). *Bacillus cereus* emetic toxin production in cooked rice. *Food Microbiology.* (19) 43.
- Frenzel, E., Letzel, T., Scherer, S., & Ehling-Schulz, M. (2011). *Inhibition of cereulide toxin synthesis by emetic Bacillus cereus via long- chain polyphosphates.* *Appl. Environ. Microbiol.* (77), 1475–1482. <https://doi.org/10.1128/AEM.02259-10>.
- Fritz, L., Berlitz, D., Mussoi, V., Machado, V., & Fiuza. L. (2010). Frecuencia de *Bacillus* spp em solos e diferentes sistemas de cultivo de arroz irrigado em cachoeirinha, Rs. *Bragantia*.

- Fricker, M., Ågren, J., Segerman, B., Knutsson, R., & Ehling-Schulz, M. (2011). Evaluation of *Bacillus* strains as model systems for the work on *Bacillus anthracis* spores. *Int. J. Food Microbiol.* (145) 129-136.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.036>.
- Gilbert, R., Stringer, MF. (1974) the survival and growth of *Bacillus cereus* in boiled and fried in relation to outbreaks of food poisoning. *Journal of Hygiene.* (73), 433-44.
- Gibbs, P. (2002). Characteristics of spore-forming bacteria. Clive de W. Blackburn and Peter J McClure, editor. Foodborne pathogens: Hazards, risk analysis and control. Boca Raton: CRC Press LLC and Woodhead Publishing Ltd.
- Granum, P., & Lund, T. (1997). *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Lett.* 157(2), 223-8.
- Guinebretière, M.H., & Nguyen-The, C. (2003). Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini puree processing plant, differentiated by two PCR-based methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* (43), 207–215.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2003.tb01060>.
- Haque, A., & Russell, N. (2005). Phenotypic and genotypic characterization of *Bacillus cereus* isolates from Bangladeschi rice. *International Journal of Food Microbiology.* (98), 23.
- Hernández, C., (2012). Tecnología de cereales. Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD). (1).
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. [ICONTEC]. (2006). NTC: 4679. Método horizontal para el recuento de *Bacillus cereus* Técnica de recuento de colonias. Colombia.

- Instituto Nacional de Salud [INS]. (2010). Boletín epidemiológico para protocolo de vigilancia y control de enfermedades transmitidas por alimentos. Grupo de vigilancia y control de factores de riesgo ambiental. (p. 10).
- Instituto Nacional de Salud [INS]. (2011). Perfil de riesgo *Bacillus cereus* en alimentos listos para el consumo no industrializados. Unidad de evaluación de riesgos para la inocuidad de los alimentos.
- Jaquette, C., & Beuchat, L. (1993). *Survival and Growth of Psychrotrophic Bacillus cereus in Dry and Reconstituted Infant Rice Cereal*. *Journal of food microbiology*.
- Katia, Rouzeau-Szynalski. Katharina, Stollewerk. Ute, Messelhäusser & Monika Ehling-Schulz. (2020). Why be serious about emetic *Bacillus cereus*: Cereulide production and industrial challenges. *Food Microbiology*. (85), 103279.
- Krause, N., Moravek, M. Dietrich, R. Wehrle E. Slaghuis, J. & Märtilbauer, E. (2010). Performance characteristics of the Duopath Cereus Enterotoxins assay for rapid detection of enterotoxinogenic *Bacillus cereus* strains. *Int J Food Microbiol*. 144(2), 322-6.
- Kim, B., Bang, J., Kim, H., Kim, Y., Kim, B.S., Beuchat, L.R., & Ryu, J.H. (2014). *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in Korean rice: prevalence and toxin production as affected by production area and degree of milling. *Food Microbiol*. (42) 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.02.021>.
- Kwang Se Lee, Younseong Song, Chi Hyun Kim, Yong Tae Kim, Taejoon Kang, Seok Jae Lee, Bong Gill Choi, Kyoung G. Lee, Development of zinc oxide-based sub-micro pillar arrays for on-site capture and DNA detection of foodborne pathogen, *Journal of Colloid and Interface Science*, Volume 563, 2020, Pages

54-61, ISSN 0021-9797,

(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979719314675>)

- Lake, B., Hudson, A. & Cressey, P. Risk Profile. (2009). *Bacillus spp* in rice. Christchurch. Mols M, Pier I, Zwietering. M, Abee T. The impact of oxygen availability on stress survival and radical formation of *Bacillus cereus*. International Journal of Food Microbiology. (135), 303-11.
- Luu-Thi, H., Khadka, D.B., & Michiels, C.W. (2014). Thermal inactivation parameters of spores from different phylogenetic groups of *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.* (189), 183–188. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.027>.
- Martinez, J. (2008). Desarrollo de métodos rápidos para el control del *Bacillus cereus* en alimentos. [Tesis Doctoral, Universidad de Valencia-España] Archivo digital.
- Molino de martillos. (Fotografía). <https://www.interempresas.net>.
- [https://www.prillwitz.com.ar/\\_molienda\\_de\\_granos\\_y\\_pellets\\_o\\_cubitos](https://www.prillwitz.com.ar/_molienda_de_granos_y_pellets_o_cubitos).
- Morfología de *Bacillus cereus* <https://www.alamy.es/la-bacteria-bacillus-cereus-equipo-de-ilustracion-estos-son-bacilos-gram-positivos-en-forma-de-varilla-de-bacterias-productoras-de-esporas-que-son-a-menudo-dispuestas-en-cadenas-streptobacilli-algunas-cepas-pueden-causar-intoxicacion-alimentaria-image279151102.html>
- Ntuli, Víctor. Mekbib, Sissay. Ntseliseng, Molebatsi. Makotoko, Makotoko. Chatanga, Peter. Asita, Asita. (2013). Microbial and Physicochemical Characterization of Maize and Wheat Flour from a Milling Company, Lesotho. (15), 11-9.
- Okinaka, R.T., & Keim, P. (2016). The Phylogeny of *Bacillus cereus* sensu lato. *Microbiol. Spectr.* <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0012-2012>.
- Okstad, O., Kolsto, A. (2011). Genomics of *Bacillus* Species. Springer, editor. Genomics of Foodborne Bacterial Pathogens New York. (p. 29-53).

- Patrick, Kindle. Danai, Etter. Roger, Stephan. & Sophia Johler. (2019). Population structure and toxin gene profiles of *Bacillus cereus* sensu lato isolated from flour products. *Food Microbiology*. (366), 20.
- Peng, H., Ford, V. Frampton, E. Restaino, L. Shelef, L. & Spitz, H. (2001). Isolation and enumeration of *Bacillus cereus* from foods on a novel chromogenic plating medium. *Food Microbiol.* 18(3), 231-8.
- Rosenquist, H., Smidt, L., Andersen, S., Jensen, G., & Wilcks, A. (2005). Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready to eat food. *FEMS Microbiology Letters*. (p. 129-36).
- Raddadi, N., Rizzi, A. Brusetti, L. Borin, S. & Tamagnini, I. Daffonchio D. (2010). *Bacillus* molecular Detection of Foodborne Pathogens. Boca Raton. *FL: Taylor & Francis Group*. (p. 129-44).
- Ruiling, Lv. Mingming, Zou<sup>1</sup>. Thunthacha, Chantapakul<sup>1</sup>. Weijun, Chen<sup>1</sup>. Aliyu, Muhammad. Jianwei, Zhou<sup>1</sup>. Tian, Ding. Xingqian. & Donghong, Liu<sup>1</sup>. (2019). Effect of ultrasonication and thermal and pressure treatments, individually and combined, on inactivation of *Bacillus cereus* spores. *Applied Microbiology and Biotechnology*. (103). 2329-2338.
- Sánchez, J., Correa, M. Castañeda-Sandoval, LM. (2016). *Bacillus cereus* un patógeno importante en el control microbiológico de los alimentos. 34(2): 230-242.
- Sarah Azinheiro, Krishna Kant, Mohammad-Ali Shahbazi, Alejandro Garrido-Maestu, Marta Prado, Lorena Dieguez. (2020). A smart microfluidic platform for rapid multiplexed detection of foodborne pathogens, *Food Control*, Volume 114, 107242, ISSN 0956-7135, (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713520301584>)

Stenfors Arnesen, L., Fagerlund, A. & Granum, PE. (2008). from soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Rev.* 32(4), 579-606.

Sarrías, J., Valero, M., & Salmeron, M.C. (2010). Elimination of *Bacillus cereus* contamination in raw rice by electron beam irradiation. (20), 327-32.

Seguridad alimentaria de Nueva Zelanda. [NZFSA]. *Bacillus cereus*. 2010. p. 1-3.

Stetten, F., Francis, K., Lechner, S., Neuhaus, K., & Scherer S. (1998). Rapid discrimination of psychotolerant and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting of 16s Rdna. *Journal of microbiological Methods.* (34), 99-106.

Tanque de almacenamiento (Fotografía)

<http://www.grupolassen.com/catalogo/categoria/tanques>.

Zhaohui, Qiao. Yingchun, Fu. Chunyang, Lei. Yanbin, Li. (2020). Advances in antimicrobial peptides-based biosensing methods for detection of foodborne pathogens: A review, *Food Control.* (112), 0956-7135. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713520300323>).