

Procedimientos para determinar la potencia y tiempo de exposición al horno microondas para recalentamiento del arroz y sus efectos sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Salmonella choleraesuis*

Persia Y*, Valdez C*, Madera O*, Quiñones Z^o y Reyes J^o

RESUMEN

Introducción: El crecimiento de las bacterias en alimentos, en especial en aquellos que son recalentados o manejados de manera inadecuada, es un tema de gran relevancia a nivel mundial. La *Salmonella* es una bacteria que habitualmente es encontrada en enfermedades adquiridas por comida contaminada. A su vez, la *E. coli* es la bacteria más frecuente de las infecciones extra intestinales y las infecciones intestinales de niños y adultos mayores que se encuentran en un estado de malnutrición notable. El Horno Microondas (HM) consta de ondas electromagnéticas que operan a nivel infrarrojo, las cuales sirven para diversas tareas de la vida cotidiana, tales como: recalentamiento de alimentos, esterilización, pasteurización, etc. Su efecto protector ante enfermedades transferidas por alimentos aún está siendo investigado con estudios que reportan una eliminación incompleta de las mismas, mientras que otros han logrado la eliminación total.

Objetivos: Se utilizó el arroz como muestra de alimento y las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella choleraesuis* para estudiar el efecto que tiene el Horno Microondas en el crecimiento de estas bacterias en el arroz con la finalidad de proponer medidas de prevención a enfermedades transmitidas por los alimentos, específicamente del arroz.

Métodos: Este fue estudio experimental con la participación de 40 unidades experimentales. Estas, previamente fueron inoculadas con *Escherichia coli* y *Salmonella choleraesuis* y almacenadas por 24 horas. Luego fueron expuestas a 4 combinaciones potencia-tiempo, 270W y 450W por 15 y 30 segundos. Además, hubo un grupo control. Se determinó el número de bacterias inoculadas, así como también la temperatura y el número de unidades formadoras de colonia (UFC) en las unidades experimentales y el grupo control (no expuesto) luego de cada exposición.

Conclusiones: El HM tiene un gran potencial en reducir la carga bacteriana de los alimentos, incluso hasta niveles indetectables, indicando que es un herramienta útil a la hora de prevenir las enfermedades transmitidas por los alimentos.

Palabras claves: Microondas, arroz, bacterias, infección, contaminación, gastroenteritis, salmonelosis, diarrea, enfermedades transmitidas por los alimentos, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*, esterilización, desinfección, irradiación, recalentamiento, crecimiento bacteriano.

INTRODUCCIÓN

El crecimiento de las bacterias en alimentos, en especial en aquellos que son recalentados o manejados de manera inadecuada, es un tema de gran relevancia a nivel mundial. La Food and Drug Administration (FDA) ha publicado el Bad

asociadas a los alimentos, y donde la FDA “reglamenta su existencia” (1). La *Salmonella* es una bacteria que habitualmente es encontrada en enfermedades adquiridas por comida contaminada (2-3). A su vez, la *E. coli* es la bacteria más frecuente de las infecciones extra intestinales y las infecciones intestinales de niños y adultos mayores que se encuentran en un estado de malnutrición notable (3).

* Estudiante PUCMM

^o Docente PUCMM

Bug Book, donde se encuentran datos sobre los agentes infecciosos y las enfermedades

El HM consta de ondas electromagnéticas que operan a nivel infrarrojo, las cuales sirven para

diversas tareas de la vida cotidiana, tales como: recalentamiento de alimentos, esterilización, pasteurización, etc. (4). El porcentaje de hogares con HM varía desde un 92% en EEUU (5) a 1% (6) en los bateyes dominicanos. Su efecto protector ante enfermedades transferidas por alimentos aún está siendo investigado con estudios que reportan una eliminación incompleta de los mismos, mientras que otros han logrado la eliminación total.

La reducción de la población bacteriana mediante el HM ha sido propuesta anteriormente. Se han encontrado resultados favorables sobre alimentos como: huevos (7), carnes (3, 8-11), frutas (12-13), vegetales (4, 14) e incluso moldes dentales de yeso (15). Al nunca haberse realizado un experimento en el que se exponga el arroz al HM, el cual con mucha frecuencia se ingiere de forma recalentada en la República Dominicana, es de vital importancia desarrollar un estudio que utilice el arroz y las bacterias más comunes, como son la *E. coli* y la *Salmonella spp.*, que mida las dosis de irradiación necesarias para reducir la población bacteriana en el mismo, que traiga beneficio a los particulares, establecimientos públicos de comida y al sector turístico.

MÉTODOS

El estudio realizado tiene un diseño analítico, experimental, no aleatorizado tipo ensayo pre clínico para establecer la potencia-tiempo y temperatura de exposición óptimos que reducen el crecimiento de *E. coli* y *Salmonella choleraesuis* a menos de 1×10^4 UFC/mL, al recalentar arroz en el horno microondas. Se eligió este tipo de estudio porque se realizó un experimento con la muestra inoculada con bacterias y se controlaron los factores ambientales para que la muestra del grupo control y experimental tuviesen la mayor similitud posible, para así

poder reducir al mínimo la posibilidad de obtener resultados alterados.

Para el cálculo de la muestra, se tomó el método utilizado en la mayor parte de las investigaciones realizadas a la fecha, las cuales realizan una cantidad determinada de repeticiones para cada exposición (normalmente 2 o 3). La forma de calcular el total de unidades experimentales fue mediante un modelo factorial, y al total de este cálculo se le agregó 8 controles (1 por cada grupo de exposiciones, por bacteria) (4, 7, 8, 16, 17). El modelo utilizado es 2×4 , lo que significa que todos los grupos de exposiciones (4) se realizaron tanto para *E. coli* como para *S. choleraesuis*. Los grupos de exposiciones utilizados fueron los siguientes:

- 270W x 15 seg
- 270W x 30 seg
- 450W x 15 seg
- 450W x 30 seg
- Control

Se calculó un total de 40 unidades experimentales, incluyendo los controles, para la realización de esta investigación. Para ver una representación del cálculo de las unidades experimentales, vea la Figura 1.

Cabe destacar que en el proceso de selección de unidades experimentales de este estudio no se presentan criterios de inclusión definidos en un acápite aparte, ya que las mismas fueron creadas por los investigadores bajo los mismos criterios y rigores.

Criterios de exclusión:

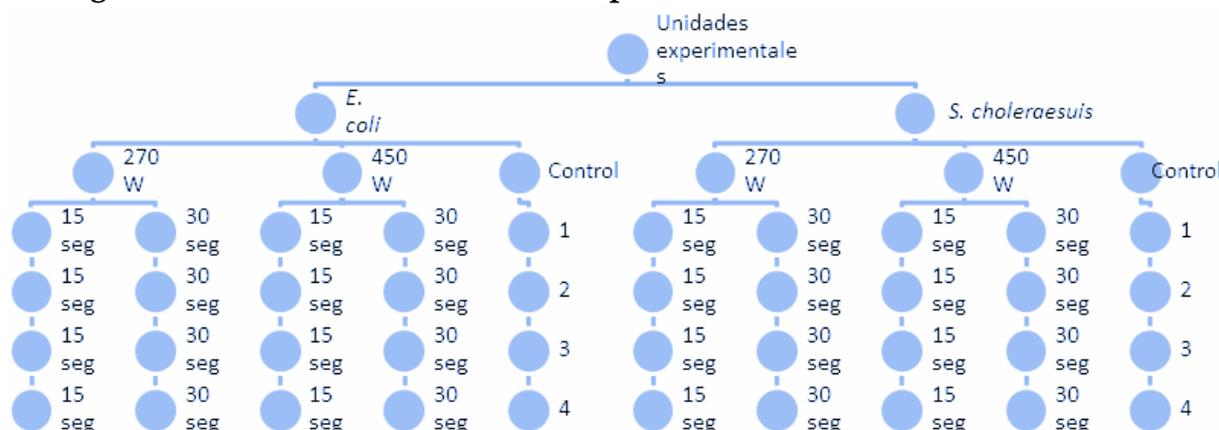
- Contaminación (cualquier tipo de contacto con superficies, sustancia o instrumentos no estériles) de los cultivos bacterianos o muestras de arroz por violación de la esterilidad (7).
- Tiempo transcurrido entre la cocción del arroz y la exposición mayor a 28 h (8).

- Tiempo de incubación luego de la exposición mayor a 28 h (9).
- Temperatura del arroz mayor a 40°C al momento de la inoculación (3).

Todo el proceso de recolección de datos fue llevado a cabo en los laboratorios de Ciencias

Básicas de la Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra, y en el Laboratorio Clínico de la Clínica Unión Médica del Norte. Para trabajar en estas instalaciones se obtuvieron permisos a través de cartas firmadas y selladas por los encargados de los mismos.

Figura 1: Distribución de unidades Experimentales. El total fue de 40 muestras



En cuanto a las consideraciones éticas, los acápites contenidos en el informe de Belmont no eran aplicables para fines de esta investigación, debido a que este informe fue consolidado con el fin de proteger a los seres humanos en la investigación biomédica; recordar que en esta investigación se trabajó con bacterias y arroz, y no con seres humanos, por lo que no fue necesario hacer ajustes al protocolo con el fin de proteger estos organismos no humanos.

En esta investigación se recurrió a la utilización de un formulario como método de recolección y organización de datos. Este formulario consiste en tres secciones: los datos generales de la muestra, mediciones basales y hallazgos postexposición. La primera sección de este consta de 6 numerales específicos para cada muestra, los cuales son: código de la muestra, especie de bacteria, fecha y hora de inoculación, fecha y hora de exposición, fecha y hora de determinación del crecimiento bacteriano

postexposición e investigador responsable de esa muestra.

En la segunda sección, que corresponde a las mediciones basales, contiene 5 numerales: tiempo de almacenamiento, la cantidad inoculada, la potencia-tiempo a la que se sometió la muestra, sobre exposición y contaminación. En el tercer acápite (los hallazgos postexposición) comprendió de 5 numerales expuestos a continuación: crecimiento bacteriano postexposición, temperatura final alcanzada por la muestra, reducción del crecimiento, porcentaje de reducción y determinación de la efectividad de la irradiación (si la exposición fue efectiva o no).

El procedimiento de recolección de datos se dividió en 3 fases: preparación, experimental y postexposición. La fase de preparación consistía en: la realización de todas las medidas de asepsia y antisepsia de los investigadores, los cuales trabajaron en todo momento con

mascarilla y guantes de látex (cambiando los guantes luego de manipular cada unidad experimental). Además se tomó medidas de higiene con equipos con los que se iba a trabajar (incluyendo mesas, asas bacteriológicas, placas de Petri, etc.).

Para los materiales termorresistentes utilizaron un autoclave para su esterilización; los termolábiles los desinfectaron con solución sporox y las superficies con alcohol al 95%. La preparación de los medios de cultivo selectivos para cada bacteria (Agares MacConkey y Salmonella-Shigella para *E. coli* y *S. choleraesuis*, respectivamente) y la preparación del arroz blanco (guiándose de una receta tradicional dominicana para su preparación, y utilizando una arrocera eléctrica) se incluyen en esta fase. Luego de preparar el arroz, el mismo se separó en placas de petri pequeñas con 5-6 g de arroz dentro de ellas. Las bacterias obtenidas fueron cultivadas en su medio y luego almacenadas en caldo soja triptona (CST) para mantener su población.

La fase experimental incluye: la inoculación del arroz con las bacterias cultivadas para luego determinar la población de las mismas que crecieron en él (cuantificadas en Unidades Formadoras de Colonias) y el proceso de exposición en el cual se introdujeron las unidades experimentales y se irradiaron a la combinación potencia-tiempo de exposición correspondiente (asimismo el control fue introducido pero no irradiado para simular el mismo ambiente de los grupos experimentales).

Para poder inocular una población bacteriana cuantitativamente muy similar en cada una de las muestras de arroz, todas las muestras de una bacteria fueron tomadas del mismo cultivo en medio CST y se siguieron los siguientes pasos:

1. La población bacteriana inoculada al arroz fue determinada al agitar hasta homogeneizar cada probeta de 50mL (luego de 24h de incubación para *E. coli* y 48h para *Salmonella choleraesuis*) y tomar 1 mL del medio CST con una jeringa (graduada a intervalos de al menos 0.1 mL) para hacer 5 diluciones seriadas (1 mL de solución con bacterias en 9 mL de solución salina estéril al 0.9%).
2. Luego de la quinta dilución, con una jeringa nueva se tomó 0.1 mL del quinto, tercero y primer tubo de la serie de dilución, se inocularon y esparcieron con un esparcidor de vidrio (previamente flameado y dejado enfriar al menos 15 segundos), en agar selectivo para cada bacteria e identificado con el código de la muestra y el factor de dilución correspondiente.
3. A estas unidades experimentales destinadas al conteo bacteriano del inóculo, que fue incubada por 24 h (para *E. coli*) o 48 h (para *Salmonella*) a 37°C, se les realizó un conteo bacteriano mediante un cuantificador de colonias, eligiendo el agar del factor de dilución que contuviera entre 25 y 350 UFC. El número de UFC presentes fue utilizado para calcular la población del inóculo mediante la siguiente fórmula (18).

$$\text{UFC/ml} = \frac{\text{No. de colonias en el agar}}{\text{Factor de dilución total}} \text{ mL}$$

El factor de dilución en esta investigación
Corresponde a 1×10^{-2} , 1×10^{-4} ó 1×10^{-6} .

4. Al mismo tiempo que se tomaban las unidades experimentales para realizar las diluciones seriadas para el cultivo y cuantificación pre exposición, se toma también, para cada unidad experimental, 1 mL del contenido homogeneizado de la probeta para inocular en 3 puntos distintos de la muestra de 5-6 g de arroz contenida en placas de Petri y se procedió a

tapar e incubar bajo las condiciones y tiempo mencionadas anteriormente.

El método de exposición fue llevado a cabo de la siguiente manera:

Al tomar las placas de Petri con 5-6g de arroz previamente inoculada e incubada con su respectiva bacteria, se procedió a colocar por separado cada una de las unidades experimentales de ambos grupos en el centro del piso de la cámara de cocción del HM. Previamente se revisó de que la temperatura en el centro del HM esté en menos de 35°C para evitar un la alteración de los resultados debido a la temperatura elevada. En el caso del grupo control, estas solo fueron inoculadas e introducidas en la cámara de cocción (luego de que la temperatura fue menor a 35°C) por 15 o 30 seg, mas no fueron irradiadas con las ondas electromagnéticas porque el HM estaba apagado.

Dependiendo en cual grupo experimental se encuentre la unidad experimental, el HM fue programado a una potencia-tiempo específica, y por lo tanto la muestra fue sometida a distintas potencia-tiempo de exposición, como se muestra a continuación:

- Exposición 1: 270W por 15 seg
- Exposición 2: 270W por 30 seg
- Exposición 3: 450W por 15 seg
- Exposición 4: 450W por 30 seg
- Exposición 5: 0W por 15-30 seg (grupo control, introducido en la cámara de cocción pero no irradiado).

Inmediatamente sonaba el temporizador del horno microondas, luego de concluido el tiempo de exposición, se sacaba la muestra del HM, se tomaba la temperatura final alcanzada por la muestra (con la utilización de un termómetro infrarrojo (Nubee, modelo NUB850H),

apuntando al centro de la muestra y a una distancia de 5cm).

En la fase postexposición se inocularon las bacterias obtenidas de las unidades experimentales irradiadas en agar selectivo (realizando diluciones seriadas para obtener valores logarítmicos y facilitar el conteo), y se procedió a almacenarlos para luego cuantificar el crecimiento bacteriano utilizando un contador de colonias.

Para la inoculación de las bacterias se utilizaron métodos de esterilidad para lograr el menor sesgo posible:

1. Se tomó los 5-6 g de arroz al salir del HM (por separado tanto al grupo experimental como al control) para ser homogeneizado con 10 mL de CST durante 30 minutos.
2. Se colocó en su agar respectivo (MacConkey o SS) dependiendo del grupo experimental que se estaba trabajando, en base a la bacteria (*E. coli* o *Salmonella choleraesuis*) y con la utilización del método de diluciones seriadas (haciendo 5 diluciones; 1 mL de solución con bacterias en 9 mL de solución salina estéril al 0.9%, tomando en cuenta como primera dilución a la toma de 1 mL del homogenizado) con el homogeneizado obtenido del control o del experimental.
3. Luego de la última dilución (5^{ta} dilución seriada) se tomó 0.1 mL del quinto, tercer y de la serie de dilución, y fueron esparcidos en sus respectivos agar selectivos con la utilización de un esparcidor de vidrio (previamente flameado y dejado enfriar al menos 15 segundos).
4. Luego de preparada cada placa de Petri, fueron luego colocadas tapadas en la incubadora por 24 horas (para *E. coli*) o 48 horas (para *Salmonella choleraesuis*) a 37°C como método de

almacenamiento post-exposición de las unidades experimentales (14).

El conteo bacteriano se realizó eligiendo el agar del factor de dilución que contuviera entre 25 y 350 UFC determinado mediante un cuantificador de colonias luego de la incubación, utilizando el mismo método que se empleó antes de la exposición de la muestra utilizando la fórmula (1):

$$\text{UFC/ml} = \frac{\text{NO. de colonias en el agar}}{\text{Factor de dilución total}} \times \text{mL}$$

Se obtuvo el permiso necesario para recolectar datos en el Laboratorio Clínico de la Clínica Unión Médica del Norte.

Los datos recogidos a través del instrumento de recolección de datos fueron almacenados de manera digital (para facilitar su organización, disponibilidad y análisis). Estos registros fueron tabulados en una hoja de cálculos de Microsoft Excel 2013 (versión 15.0.4420.1017), conteniendo una columna para cada ítem del instrumento y una fila para cada muestra. Posteriormente los datos fueron analizados con el software SPSS (versión 20).

El análisis de datos fue realizado por separado para las bacterias de este estudio (*Escherichia coli* y *Salmonella choleraesuis*). Todos los cálculos fueron realizados con un nivel de confianza de 95% y significancia de 5%. Para cada cruce de variables lo primero que se realizó fue la obtención de los estadísticos descriptivos para cada caso, seguido de la prueba Shapiro-Wilk para determinar si existe una distribución normal de los datos analizados. Luego de contar con la información de normalidad, y en base a los tipos de variables que se cruzan, se eligió la prueba (paramétrica en caso de distribución

normal o no paramétrica si no tenía una distribución normal) que mejor aplicara.

A continuación se muestran los cruces de variables realizados:

1. Potencia-tiempo vs exposición efectiva. Para este cruce de variables se utilizó Chi², ya que estamos cruzando dos variables cualitativas, la de potencia-tiempo con 5 categorías, mientras que la exposición efectiva contiene dos categorías. La prueba de normalidad indicó que no existe una distribución normal, por lo que Chi² (que se puede utilizar para muestras paramétricas como no paramétricas) es ideal para este cruce.
2. Potencia-tiempo vs crecimiento bacteriano postexposición. Al momento de realizar este cruce de variables, se tomó en cuenta que los valores no están distribuidos de manera normal, por lo que se debió utilizar una prueba no paramétrica. La prueba no paramétrica, que es capaz de analizar los datos de una variable cualitativa con 5 categorías (potencia-tiempo) y una variable cuantitativa (crecimiento bacteriano postexposición) es la prueba de Kruskal-Wallis, por lo que esta fue utilizada para realizar este análisis de relación entre variables.
3. Potencia-tiempo vs temperatura postexposición. El análisis de normalidad de los valores dentro de estas variables, fue positivo, según el test de Shapiro-Wilk, por lo que se requiere de una prueba paramétrica. La prueba paramétrica que es capaz de relacionar una variable cualitativa categórica (potencia-tiempo) y una cuantitativa (temperatura postexposición) es la prueba de ANOVA (Analysis Of Variance), por lo que esta fue utilizada para este cruce. En este cruce de variables, al existir una distribución normal, se usó la prueba T student de un factor, que es una prueba paramétrica,

para ver la diferencia entre el tiempo entre los grupos de misma potencia.

4. Temperatura postexposición vs número de bacterias postexposición. La relación existente entre estas dos variables cuantitativas fue determinada a través de la prueba de correlación de Spearman, debido a que la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk indicó que no existía una distribución normal de los componentes dentro de esta. La correlación de Spearman es la indicada porque es una prueba no paramétrica que estudia la relación entre dos variables cuantitativas.
5. Temperatura postexposición vs exposición efectiva: Al momento de realizar este cruce de variables se tomó en cuenta que los valores están distribuidos de manera normal. Lo anteriormente mencionado junto a que el cruce es entre una variable cuantitativa (temperatura postexposición) y una cualitativa dicotómica (exposición efectiva) marcó la pauta de que la prueba estadística indicada era la Prueba T de un factor.

DISCUSIÓN

La metodología expuesta en este artículo explica los pasos a llevar a cabo para investigar la relación entre la potencia-tiempo de exposición del arroz al HM, la temperatura final alcanzada por las unidades experimentales y el crecimiento bacteriano postexposición. El diseño

de esta metodología se realizó tomando en cuenta los distintos trabajos previos publicados en revistas internacionales y seleccionando de ellas todo lo necesario para diseñar de manera adecuada todos los procedimientos.

Al comparar esta metodología con la de otros investigadores, se puede recalcar que algunas de las investigaciones se basaron en determinar los efectos que tienen las ondas microondas en sí sobre la viabilidad de las bacterias (19, 20), mientras que otras, tal como en este diseño metodológico, se enfocaron en la relación de la temperatura final alcanzada y el crecimiento bacteriano (12, 21).

Las ventajas de esta metodología es que reúne las características más relevantes de las distintas investigaciones, como también un alimento de consumo masivo en República Dominicana (arroz) y 2 de las 5 bacterias que están relacionadas con mayor frecuencia a las enfermedades transmitidas por alimentos (22). Como punto débil del procedimiento expuesto está que no se miden los efectos no térmicos del HM sobre el crecimiento bacteriano, al igual que se utilizó una masa muy pequeña de arroz, por debajo de lo que normalmente es consumido por una persona durante el almuerzo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Montilla Moros MdC, Scorza JV, Rojas EM. Reducción de flora contaminante en alimentos mediante tratamiento con microondas. *Rev. Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel"*. 2010; 41(2): 46-51.
2. Centers for Disease Control and Prevention. Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food – Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 1996–2010. *Morbidity*

and *Mortality Weekly Report*. 2011; 60(22):749-755.

3. Jamshidi A, Ghasemi A, Mohammadi A. The effect of short-time microwave exposures on *Salmonella typhimurium* inoculated onto chicken drumettes. *Journal of Veterinary Research*. 2009; 10(4):378-382.

4. Giuliani R, Bevilacqua A, Corbo MR, Severini C. Use of microwave processing to reduce the initial contamination by

- alicyclobacillusacidoterrestris in a cream of asparagus and effect of the treatment on the lipid fraction. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2009; 11(2): 328–334.
5. Rector R, Sheffield R. Understanding poverty in the united states: surprising facts about america's poor. *Background*. 2011; 2607: (3 pantallas).
6. Molina Achécar M, Ramírez N, Polanco JJ, Quiterio G, García Ronzino M. Encuesta sociodemográfica y sobre VIH/SIDA en los bateyes estatales de la Republica Dominicana 2007. Santo Domingo: CESDEM. 2007; (42 pantallas).
7. Savi GD, Bortolotto T, Simões LR, Barichello T. Elimination of salmonella enteric serovartyphimurium in artificially contaminated eggs through correct cooking and frying procedures. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2011; 31(2): 492-496.
8. Lianou A, Koutsoumanis KP. Evaluation of the effect of defrosting practices of ground beef on the heat tolerance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis*. *Meat Science*. 2009; 82(4): 461-468.
9. Rodríguez-Marval M, Geornaras I, Kendall PA, Scanga JA, Belk KE, Sofos JN. Microwave oven heating for inactivation of *Listeria monocytogenes* on frankfurters before consumption. *Food Microbiology and Safety*. 2009; 74(8): 453-460.
10. Huang L, Sites J. New automated microwave heating process for cooking and pasteurization of microwavable foods containing raw meats. *Food Engineering and Physical Properties*. 2010; 75(2): 110-115.
11. Uradziński J, Nyesvyetowa M. Survival rate of thermotolerant *Campylobacter* on poultry meat during microwave heating. *Journal of Veterinary Sciences*. 2009; 12(1): 41-44.
12. Picouet PA, Landl A, Abadias M, Castellari M, Viñas I. Minimal processing of a Granny Smith apple purée by microwave heating. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2009; 10(4): 545-550.
13. Lu Y, Turley A, Dong X, Wu C. Reduction of *Salmonella enterica* on grape tomatoes using microwave heating. *International Journal of Food Microbiology*. 2010; 145(2011):349–352.
14. Vega-Miranda B De La, Santiesteban-López NA, López-Malo A, Sosa-Morales ME. Inactivation of *Salmonella typhimurium* in fresh vegetables using water-assisted microwave heating. *Food Control*. 2012; 26(1): 19-22.
15. Bhat V, Shenoy K, Shetty S. Evaluation of efficacy of microwave oven irradiation in disinfection of patient derived dental cast. *Journal of Infection Control*. 2012; 8(3): 1-4.
16. Valero A, Cejudo M, García-Gimeno RM. Inactivation kinetics for *Salmonella Enteritidis* in potato omelet using microwave heating treatments. *Food Control*. 2014; 43: 175-182.
17. Wu Y, Yao M. Inactivation of bacteria and fungus aerosols using microwave irradiation. *Journal of Aerosol Science*. 2010; 41(7): 682–693.
18. Jett BD, Hatter KL, Huycke MM, Gilmore MS. Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria. *BioTechniques*. 1997; 23(4): 648-650.
19. Zhou BW, Shin SG, Hwang K, Ahn JH, Hwang S. Effect of microwave irradiation on cellular disintegration of Gram positive and negative cells. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010; 87: 765–770.
20. Shazman A, Mizrahi S, Cogan U, Shimoni E. Examining for possible non-thermal effects during heating in a microwave oven. *Food Chemistry*. 2007; 103(2): 444–453.
21. Hamoud-Agha MM, Curet S, Simonin H, Boillereaux L. Microwave inactivation of *Escherichia coli* K12 CIP 54.117 in a gel medium: experimental and numerical study. *Journal of Food Engineering*. 2012; 116(2): 315–323.
22. Sheen S, Huang L, Sommers C. Survival of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella* spp. on catfish fillets

exposed to microwave heating in a continuous mode. *Journal of Food Science*. 2012; 77(8): 209-214.