



PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL

**AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN DE BACTERIAS ACIDOLACTICAS CON
CAPACIDAD ANTAGONICA A PARTIR DE PRODUCTOS CÁRNICOS
MADURADOS ARTESANALMENTE**

DIANA MILENA GAITÁN VACA

Director:

ANDREA CAROLINA AGUIRRE

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial

para optar por el título de Microbiólogo Industrial

BOGOTÁ D.C.

NOVIEMBRE DE 2013

**AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN DE BACTERIAS ACIDOLACTICAS CON
CAPACIDAD ANTAGONICA A PARTIR DE PRODUCTOS CÁRNICOS
MADURADOS ARTESANALMENTE**



DIANA MILENA GAITÁN VACA

APROBADO

INGRID SCHULER
Bióloga Ph.D.
Decana Académica

JANETH ARIAS PALACIOS
Bacterióloga MSc.
Directora de carrera

**AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN DE BACTERIAS ACIDOLACTICAS CON
CAPACIDAD ANTAGONICA A PARTIR DE PRODUCTOS CÁRNICOS
MADURADOS ARTESANALMENTE**



DIANA MILENA GAITÁN VACA

APROBADO

ANDREA CAROLINA AGUIRRE
Bacterióloga MSc.
Director

ADRIANA PAEZ MORALES
Microbióloga Industrial MSc.
Jurado

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque la tesis no contenga ataques personales contra persona alguna, antes bien se ve en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de Julio de 1946

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco al laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Universidad Javeriana, por abrir un cupo para desarrollar mi trabajo en ese lugar, así mismo a mis profesores y compañeros de laboratorio por su colaboración y los consejos brindados.

A mi directora de tesis Andrea Carolina Aguirre por su dedicación y aporte de conocimientos y sin duda alguna por la confianza en mí para llevar a cabo este trabajo y lograr los resultados obtenidos.

A mi jurado Adriana Paez por hacer parte de este proyecto y por su dedicación.

A mis abuelos por depositar su confianza en mí y permitirme llevar a cabo esta carrera, a mi familia entera por estar siempre conmigo, a mis padres y hermana, porque sin el apoyo de ellos la felicidad no sería completa.

A mi novio Anderson por siempre estar pendiente de mí y ayudarme en todo momento, por sus aportes, su incondicional amor y sin duda por ocupar un espacio muy importante en mi corazón.

A mis amigos y amigas de la Universidad por los momentos y las experiencias vividas.

A Dios por permitirme llevar a cabo este logro y por permitirme muchos más.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Bacterias Ácido Lácticas (BAL).....	4
2.1.1 Antecedentes y características generales	4
2.1.2 Potencial antimicrobiano.....	8
2.1.3 Inhibición frente a patógenos de importancia en alimentos (<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> y <i>L. monocytogenes</i>)	9
2.2 Bacteriocinas.....	11
2.2.1 Antecedentes: definición	11
2.2.2 Características bioquímicas: clasificación.....	11
2.2.3 Producción, biosíntesis y secreción	13
2.2.4 Modo de acción	13
2.3 Importancia y utilidad de las BAL.....	14
2.3.1 Biopreservación	14
2.4 Las BAL en la carne y en productos cárnicos	16
3. OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo General	17
3.2 Objetivos específicos	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS	18
4.1 Recolección de muestras	18
4.2 Procesamiento de muestras y siembra inicial	18
4.3 Siembra de colonias presuntivas BAL.....	18
4.4 Realización de pruebas bioquímicas preliminares.....	18
4.5 Realización de pruebas de antagonismo.....	19
4.6 Actividad de Sobrenadante.....	19
4.7 Conservación de cepas con capacidad antagónica.....	20
4.8 Identificación bioquímica por medio de Kit API® 50 CH.....	20
4.9 Cinética de crecimiento.....	20
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
5.1 Aislamiento e identificación microscópica y macroscópica de BAL a partir de productos cárnicos madurados artesanalmente.....	22

5.2 Identificación bioquímica preliminar de las cepas aisladas.....	23
5.3 Pruebas antagónicas frente a <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> por medio de la técnica de difusión en pozo.	24
5.4 Identificación preliminar de cepa ChS2 por medio de API® 50 CHL	28
5.5 Cinética de crecimiento de cepa ChS2 (<i>Weissella viridescens</i>)	31
6. CONCLUSIONES	35
7. RECOMENDACIONES	36
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
9. ANEXOS	48

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vía metabólica utilizada por las bacterias ácido lácticas homofermentativas, fermentación láctica. Fuente Parra (2010).....	6
Figura 2. Vía metabólica utilizada por las bacterias ácido lácticas heterofermentativas, fermentación heteroláctica. Fuente Parra (2010).....	7
Figura 3. Mecanismo de acción de las bacteriocinas por formación de poros en la membrana bacteriana. Fuente (Moll 1999).....	14
Figura 4. Cocos y bacilos Gram positivos no esporulados. A. Cepa Cb1, B. cepa Ln2, C. cepa ChS2. Fuente: Autor.....	23
Figura 5. Actividad antagónica cepa ChS2 – <i>E. coli</i> . Vista anterior (1) y posterior (2). A. Disco de antibiótico de Gentamicina (control positivo), B. Sobrenadante puro de la cepa ChS2 (halo de inhibición) y C. Solución salina estéril (control negativo). Fuente: Autor...	25
Figura 6. Identificación por API® 50 CHL (bioMérieux, Inc., Haazelwood Missouri, EEUU.). Fuente: Autor.....	29
Figura 7. Cinética de crecimiento en caldo MRS correspondiente a la cepa ChS2 que presentó actividad antagónica frente a <i>E. coli</i> . Fuente: Autor.....	31
Figura 8. Cinética de orden 1, dónde μ_x representa la velocidad específica de crecimiento y t_d representa el tiempo de duplicación. Fuente: Autor.....	32

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las bacteriocinas propuesto por Klaenhammer 1993, con modificaciones posteriores. Fuente: Autor.....	11
Tabla 2. Productos analizados, nomenclatura y tinción de Gram correspondiente. Fuente: Autor.....	22

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Rótulo de codificación de muestras de productos cárnicos madurados artesanalmente.....	48
Anexo 2. Curva Patrón de Peso Seco.....	49
Anexo 3. Construcción de la Curva Patrón de Peso Seco.....	50
Anexo 4. Análisis de Software apiweb - API 50 CHL.....	51

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar el efecto antagonico de Bacterias Acido Lácticas (BAL) aisladas a partir de productos cárnicos madurados artesanalmente frente *S. aureus*, *E. coli* y *Listeria monocytogenes*, se aislaron e identificaron microscópicamente y bioquímicamente 15 cepas identificadas preliminarmente como BAL. Al realizar las pruebas antagonicas se encontró actividad antagonica de la cepa ChS2 frente a *E. coli*, mediante la producción de una sustancia inhibitoria difusible en medio MRS, adicionalmente, se realizó una identificación bioquímica de la cepa ChS2 por medio de la batería bioquímica API® 50 CHL, la cual arrojó como resultado con un 70% de identificación a *Weissella viridescens*. Con el fin de determinar el comportamiento y las fases de crecimiento de la cepa identificada se llevó a cabo un cultivo discontinuo en el cual se observó una fase de adaptación (0-1 h), exponencial (1 – 14 h) y estacionaria (14-17 h). Los parámetros cinéticos calculados según la ecuación de orden 1 arrojaron valores de velocidad específica de crecimiento (μ_x) de $0,10714 \text{ h}^{-1}$ y un tiempo de duplicación (td) correspondiente a 6,44788 h.

Los resultados obtenidos en esta investigación, demuestran el gran potencial biotecnológico que podría tener el género *Weissella*, así como sus metabolitos extracelulares, como bioprotectores de alimentos, como antagonistas de actividad microbiana de cepas patógenas y alteradoras de productos cárnicos, entre otros, teniendo en cuenta que hasta el momento no se ha reportado actividad probiótica de la misma ni estudios acerca de las bacteriocinas que produce.

1. INTRODUCCIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El grupo de las bacterias lácticas o bacterias del ácido láctico (BAL) fue definido por Orla-Jensen (1924) y reúne varios géneros caracterizados por su capacidad de fermentar los glúcidos produciendo ácido láctico.

Las bacterias lácticas se caracterizan por ser bacterias Gram-positivas generalmente inmóviles, no esporuladas, catalasa-negativas, oxidasa negativas, generalmente nitrato reductasa negativas; anaerobias facultativas o microaerófilas, capaces de fermentar tanto en aerobiosis como en anaerobiosis (Bouix 2000).

Las BAL son conocidas por su capacidad como microorganismos probióticos, que pueden inhibir el crecimiento bacteriano por la producción extracelular de ácidos orgánicos, peróxido de hidrogeno, diacetilo, antibióticos y bacteriocinas, una gran cantidad de las BAL más reconocidas pertenecen al género de los *Lactobacillus* spp. (Gómez 1999, Cabeza 2005).

La capacidad antagónica de las BAL, y por ende de los *Lactobacillus* spp. es atribuida a sus productos metabólicos, ya que al fermentar los hidrocarburos producen una amplia variedad de sustancias con acción antimicrobiana como el ácido láctico, ácido acético, ácido butírico, peróxido de hidrógeno, diacetilo y péptidos de bajo peso molecular llamados bacteriocinas. Sin embargo también se puede dar una actividad por la competencia por los nutrientes del ambiente en que se encuentran (Elegado *et al* 2004, Estrada 2005, Yousef 2008, Cástulo *et al* 2008, Todorov *et al* 2010).

Además es sabido por investigaciones previas que las BAL pueden presentar actividad antagónica al enfrentarlas a cepas patógenas como *Salmonella enteritidis* (Rodríguez 1997, Gómez 1999). Existen muchos mecanismos por los cuales un microorganismo puede presentar una interacción negativa con otros, competencia por espacio, nutrientes, una tasa de crecimiento mayor o incluso una forma más eficaz de captar alimentos. Con respecto a las BAL su actividad antagónica o antimicrobiana ha sido atribuida a la producción y acumulación de los productos de la fermentación como ácido láctico, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno. Además otro factor al cual es atribuida esta característica es la producción de bacteriocinas (Yousef 2008). Las bacteriocinas son sustancias extracelulares diferentes a los antibióticos, que son producidas de forma natural por algunas especies bacterianas como *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Alicyclobacillus acidoterrestris* y *Streptococcus thermophilus* estas bacteriocinas exhiben una actividad inhibitoria frente a diferentes especies alterantes o patógenas (Cabeza 2005,

Rojas 2008). Se han obtenido diferentes bacteriocinas producidas por BAL, y estas presentan espectros de inhibición específicos por algunos microorganismos, estas son usadas para inhibir el crecimiento de bacterias indeseables específicas y para inhibir el crecimiento de microorganismos degradadores de alimentos y patógenos como *Listeria* entre otros (Vasek 2008).

Por lo tanto el presente proyecto pretende aislar a partir productos cárnicos madurados artesanalmente Bacterias Acido Lácticas que tengan efecto antagónico contra patógenos tales como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en carne roja, los cuales presentan factores de virulencia determinantes en los consumidores, ya que los patógenos a través de los años se han convertido en un problema de salud pública debido a los factores de virulencia que están presentes en estos, y su alto espectro que conlleva a que varios alimentos puedan ser contaminados; a esto también está asociado las malas prácticas de manufactura que permiten que patógenos como *Escherichia coli* se desarrolle en alimentos cotidianos como los derivados cárnicos, lácteos, y derivados del huevo; si bien son alimentos que mundialmente son comercializados y consumidos por la población.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Bacterias Ácido Lácticas (BAL)

2.1.1 Antecedentes y características generales

El concepto de bacterias lácticas como un grupo de microorganismos surgió a mediados del siglo XIX con la significativa contribución de Louis Pasteur, quien en el año de 1857 demostró que los procesos fermentativos (fermentación láctica, alcohólica o butírica) eran causados por distintos tipos de microorganismos. Posteriormente en 1873, Lister aisló el primer cultivo puro de un microorganismo y lo denominó *Bacterium lactis*. En 1884, Hueppe denominó “*Milchsauerbacillus*” a la flora microbiana responsable de la acidificación y coagulación de la leche. Luego a finales del siglo XIX Weigmann propuso el término “*Bacterium acidi lactici*” e introdujo el empleo de cultivos iniciadores en la elaboración de quesos y de leche agria en las industrias alimentarias de las ciudades de Kiel y Storch (Copenhague), lo que representó el comienzo de la era industrial de las fermentaciones como procesos controlados o dirigidos (Bibel 1988).

Hoy en día las bacterias ácido lácticas (BAL) se definen como microorganismos Gram-positivos, cuya característica distintiva es la producción de ácido láctico como principal producto del metabolismo fermentativo de los carbohidratos. En general, las BAL son microorganismos de morfología bacilar o cocoide, que se caracterizan por ser no esporulados, microaerófilos o anaerobios facultativos que carecen de complejos citocromos y catalasa sensu stricto (Monroy 2009). Las BAL además pueden sobrevivir y desarrollarse en presencia de pH bajo, debido a que cuentan con un sistema de transporte simultáneo de ácido láctico y de protones al exterior celular, que contribuye con la homeostasis del pH interno y origina energía (Vásquez 2009).

Son microorganismos quimioorganotróficos y debido a su limitada capacidad biosintética son muy exigentes nutricionalmente y requieren factores de crecimiento complejos como aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas (Parra 2010). Los carbohidratos fermentables y alcoholes pueden ser empleados como fuentes de energía para producir ácido láctico principalmente y otros productos como acetato, etanol y dióxido de carbono (Savado 2006).

En cuanto a la clasificación taxonómica de las BAL, estas pertenecen al phylum Firmicutes que comprende alrededor de 20 géneros, dentro de los cuales se encuentran los cuatro géneros tradicionales: *Streptococcus* (actualmente subdividido en *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* y *Enterococcus*), *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, a los que se han sumado otros géneros como: *Weissella*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus* y *Carnobacterium*. (Cintas *et al* 2001, Rojas y Vargas 2008).

Las BAL también pueden clasificarse de acuerdo a la fermentación de la lactosa en: homofermentativas (producen solamente ácido láctico) y heterofermentativas (producen ácido láctico y otras sustancias). Dichas bacterias también pueden ser mesófilas o termófilas dependiendo de su temperatura de crecimiento (Bertrand *et al* 2003).

El grupo homofermentativo compuesto por *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*, llevan a cabo la vía metabólica de Embden-Meyerhoff-Panas (**Figura 1**). Con un porcentaje de conversión del 85% las BAL homofermentativas toman una mol de glucosa y la transforman en dos moles de ácido láctico con la ayuda de enzimas como la aldolasa y la hexosa isomerasa, sin embargo, cabe mencionar que dichas bacterias carecen de la enzima fosfoctolasa, enzima que constituye una vía esencial para la metabolización de hexosas y pentosas (Hernández *et al* 2007).

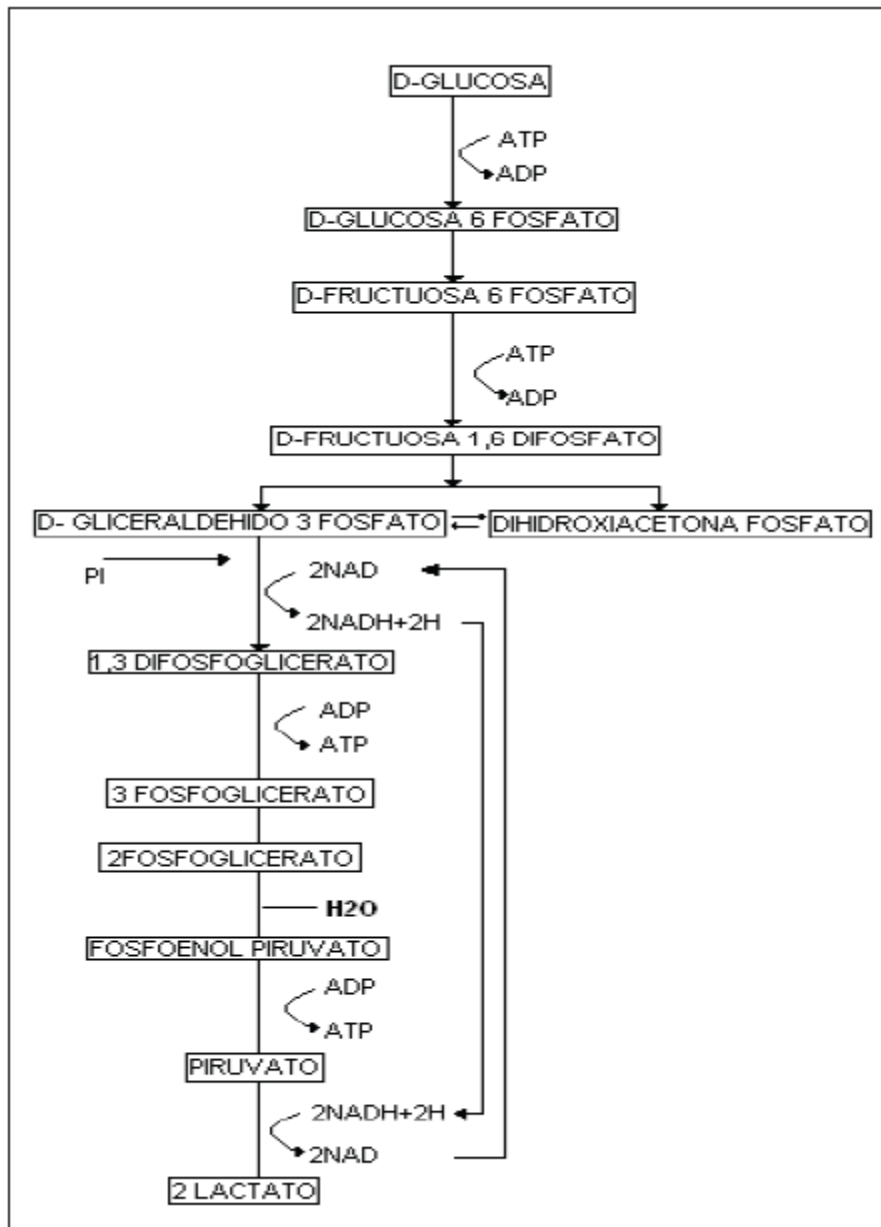


Figura 1. Vía metabólica utilizada por las bacterias ácido lácticas homofermentativas, fermentación láctica. Fuente Parra (2010).

En contraste las bacterias heterofermentativas tienen una conversión de solamente el 50% de ácido láctico al fermentar una mol de glucosa para producir una mol de ácido láctico, una mol de etanol y una mol de dióxido de carbono, y así solamente producir la mitad de energía a partir de glucosa. Este grupo contiene la enzima fosfoacetolasa, pero carece de aldolasa y hexosa isomerasa; así que utilizan la vía de la hexosa monofosfato de la pentosa (**Figura 2**). En este grupo se encuentran géneros como *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* (Gálvez 2007).

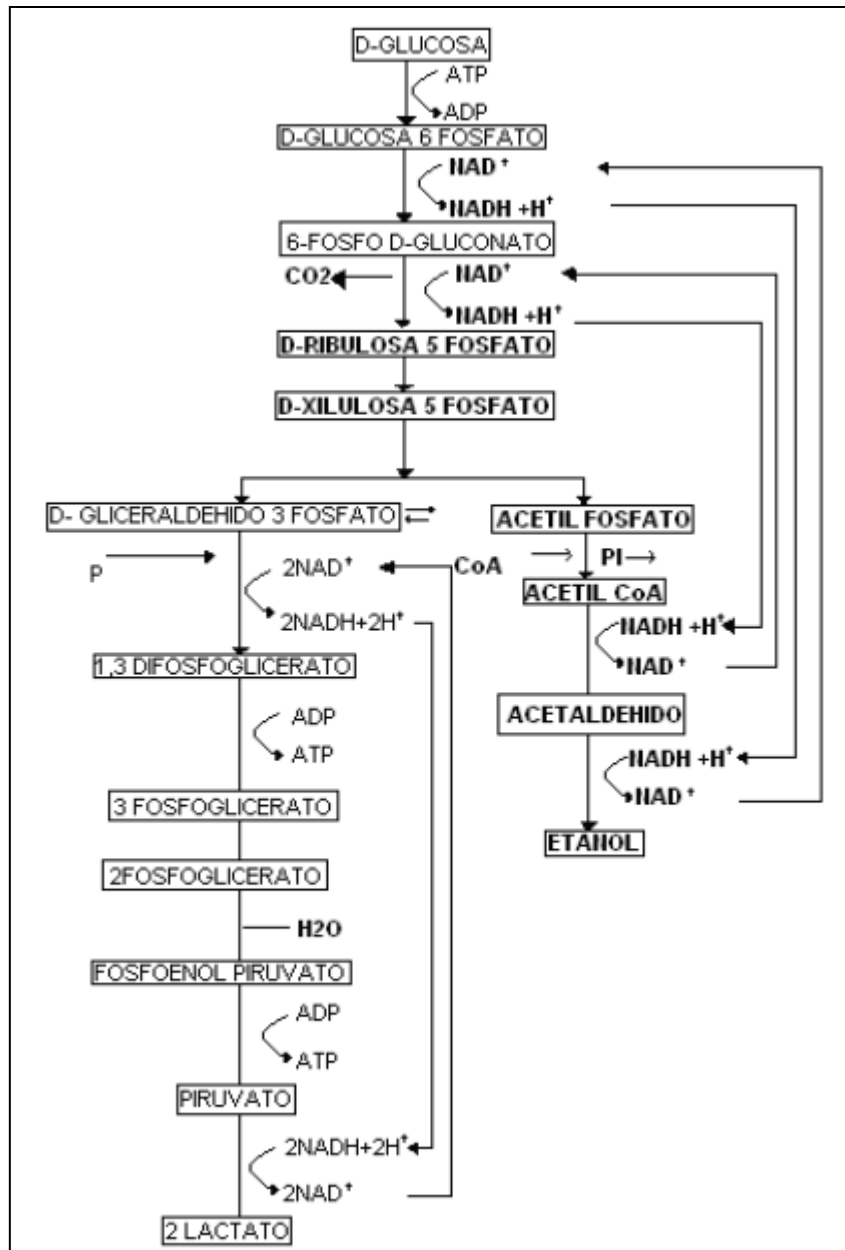


Figura 2. Vía metabólica utilizada por las bacterias ácido lácticas heterofermentativas, fermentación heteroláctica. Fuente Parra (2010).

Las bacterias también se clasifican en mesófilas cuando su temperatura ideal de crecimiento se encuentra entre 20-25°C y su tiempo de incubación se encuentra entre 18-20 horas. Dentro de este grupo se encuentran géneros como *Lactococcus lactis* subs *lactis*, *Lactococcus lactis* subs *cremoris* y *Leuconostoc mesenteroides* subs *cremoris*. Y en termófilas cuando su temperatura ideal de incubación se encuentra entre 40-45°C y su tiempo de incubación se encuentra ente 2-4 horas, se encuentran géneros como *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus acidophilus* (Blanco *et al* 2006).

2.1.2 Potencial antimicrobiano

Bajo el término antibiosis se engloban todas aquellas asociaciones entre microorganismos en las que al menos uno de ellos se ve desfavorecido (Babel 1977).

Las primeras observaciones de antibiosis microbianas realizadas por Pasteur y Joubert (1877) permitieron vislumbrar las posibilidades terapéuticas de los fenómenos de antagonismo. Posteriormente, Rogers (1928) identificó una sustancia de naturaleza peptídica (nisina), producida por *S. lactis*, que inhibía a microorganismos Gram positivos, incluyendo patógenos y alterantes de alimentos. Debido a que la cepa productora era utilizada como cultivo iniciador en la producción de derivados lácteos se plantearon nuevas aplicaciones, no sólo con fines terapéuticos, del antagonismo microbiano. De hecho, la fermentación (proceso de transformación biológica de los alimentos) es una de las técnicas más antiguas utilizadas para aumentar el período de consumo de alimentos perecederos (Mckay 1990). De las muchas especies microbianas que se encuentran inicialmente en el alimento crudo o materia prima, solamente unas pocas están dotadas de las capacidades fisiológicas necesarias para multiplicarse masivamente en las condiciones que rodean al alimento. Así pues, las bacterias lácticas llegan a proliferar en la mayoría de estos hábitats, constituyendo un claro ejemplo de antagonismo microbiano.

La capacidad de producir grandes cantidades de ácidos (láctico, acético) por fermentación de los carbohidratos presentes y la consecuente caída del pH son los factores primarios en los que se basa la actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas. Este efecto es muy importante ya que los hábitats de estas bacterias, en especial los alimentos no procesados, poseen una alta actividad de agua (AW) y son muy ricos en nutrientes, por lo que la proliferación bacteriana se ve muy favorecida (Daeschel 1989). Los ácidos lipofílicos son capaces de atravesar la membrana plasmática en su forma no disociada e interferir con las funciones básicas del metabolismo celular, disminuyendo el pH interno de la célula. Así se explica el amplio rango de microorganismos inhibidos, con la única excepción de los organismos acidodúricos como levaduras, hongos y las propias bacterias lácticas.

Sin embargo, el complejo sistema antagonista de las bacterias lácticas no sólo se basa en la producción de ácidos sino que también participan activamente otros metabolitos inhibitorios que, a pesar de ser sintetizados en menor cantidad, contribuyen significativamente a los fenómenos de antibiosis. Entre ellos cabe destacar la producción de H_2O_2 y otros derivados del metabolismo del O_2 ($O^{\cdot -}$, OH^{\cdot}), CO_2 , compuestos aromáticos

(diacetilo, acetaldehído), derivados deshidratados del glicerol (reuterina), benzoato, enzimas bacteriolíticas, bacteriocinas y antibióticos (Lindgren 1990, Piard 1991, 1992). Por otro lado, la competencia por sustratos esenciales, la acumulación de D-aminoácidos, el descenso del potencial de óxido-reducción y la coagregación también participan activamente en la acción inhibitoria (Castellano *et al* 2008).

Han sido muchas las estrategias desarrolladas por la industria alimentaria para explotar convenientemente el potencial antimicrobiano de las bacterias lácticas en todas sus facetas (Parra, 2010). Actualmente, existe un creciente interés por la utilización de las bacteriocinas como agentes antimicrobianos. La producción de estas sustancias inhibitorias de naturaleza proteica parece ser un fenotipo muy extendido dentro de las bacterias lácticas y se ha establecido, en muchas ocasiones, su implicación directa en la inhibición específica de microorganismos patógenos y/o alterantes asociados a los alimentos (O'Sullivan 2002).

2.1.3 Inhibición frente a patógenos de importancia en alimentos (*E. coli*, *S. aureus* y *L. monocytogenes*)

En busca de nuevas herramientas para controlar la presencia de patógenos en alimentos, se ha encontrado que muchas bacterias ácido lácticas secretan pequeños péptidos con actividad antimicrobiana, llamadas bacteriocinas. Además de secretar estas sustancias antimicrobianas, las BAL tienen la capacidad de inhibir patógenos a través de compuestos como ácido láctico, diacetilo y peróxido de hidrógeno (Rodríguez 2002). El efecto antimicrobiano de los ácidos orgánicos radica en la disminución del pH, así como la forma no disociada de las moléculas, dicho pH bajo provoca la acidificación del citoplasma de la célula, mientras que el ácido no disociado, siendo lipofílico, puede difundirse pasivamente a través de la membrana. El ácido no disociado actúa en el colapso del gradiente de protones electroquímico, o mediante la alteración de la permeabilidad de la membrana de la célula que da como resultado la interrupción de sistemas de transporte de sustrato (Ammor *et al* 2006). El diacetilo es producido por la mayoría de las cepas de BAL mediante la fermentación del citrato. Este compuesto inhibe el crecimiento de las bacterias Gram negativas por reacción con la utilización de la arginina (Daeschel 1998). El peróxido de hidrógeno es uno de los principales metabolitos producidos por los Lactobacilos durante su crecimiento, el cual puede ser generado a través de diferentes mecanismos. Usualmente es producido por la reducción directa del oxígeno, a través de una reacción catalizada por la α -glicerolfostato oxidasa o por la lactato oxidasa (Mital 1995). La acumulación de peróxido

de hidrógeno en el medio de crecimiento se debe a que los Lactobacilos no poseen la enzima catalasa (Daeschel 1998). Esta acumulación puede alcanzar niveles capaces de inhibir el crecimiento de otros microorganismos, ya que el H₂O₂ es un compuesto citotóxico debido a su capacidad para generar radicales hidroxilo activos, los cuales tienen un efecto fuertemente oxidante (Mital 1995). Otro efecto producido por el peróxido de hidrógeno es la destrucción de las estructuras básicas de las proteínas de las células (Lindgren 1990).

Los alimentos cárnicos constituyen uno de los principales vehículos de enfermedades transmitidas por alimentos, como consecuencia de un manejo deficiente durante su procesamiento. En el siglo XXI, las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) siguen constituyendo uno de los principales problemas para la salud pública.

Listeria monocytogenes es un patógeno emergente de gran importancia en salud pública debido a que dentro de las ETA's es el que causa mayor mortalidad (del 20 al 30% en individuos sanos y del 70% en pacientes inmunocomprometidos) (INS 2013). Una de sus principales características es la capacidad de adaptarse y sobrevivir en plantas de alimentos, convirtiéndose en un foco silencioso de contaminación (Rivera 2007). En Colombia no es obligatoria su búsqueda en carnes crudas, pero se está implementando su detección en plantas de procesamiento como un mecanismo de control indirecto del patógeno.

Escherichia coli es un patógeno emergente en humanos transmitido por alimentos, asociado a casos esporádicos y a brotes de diarrea con o sin sangre, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH). La principal vía de transmisión son los alimentos contaminados, como por ejemplo, carne molida, productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos, hamburguesas, embutidos fermentados, morcilla, leche no pasteurizada, yogur, quesos, mayonesa, papas, lechuga, brotes de soja y alfalfa, jugos de manzana no pasteurizados y agua, entre otros (Blanco *et al* 2004, Oteiza 2006).

Staphylococcus aureus es el agente etiológico más frecuente entre las intoxicaciones de origen alimentario (Le Loir 2003). Su presencia en alimentos procesados se debe a la contaminación introducida por los manipuladores, por inadecuadas prácticas de manufactura o por la utilización de materia prima contaminada (Figuroa *et al* 2002). Sus enterotoxinas son el principal factor de virulencia y su detección puede realizarse por ELISA, aunque sólo es posible detectar el pool de enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED y SEE (Manfredi 2010).

2.2 Bacteriocinas

2.2.1 Antecedentes: definición

Las bacteriocinas son péptidos con actividad antimicrobiana producidos por síntesis ribosomal y son segregadas por un gran número de bacterias para inhibir el crecimiento de otros microorganismos competidores (Joerger 2003, Papagianni 2003, Katikou *et al* 2005, Motta 2008).

En la naturaleza existe una enorme diversidad de bacteriocinas que han sido encontradas en casi todas las especies bacterianas examinadas hasta la fecha, y aún dentro de una especie podrían producirse diferentes tipos de bacteriocinas (Ennahar 2000, Cintas *et al* 2001, Joerger 2003). Dentro de las bacterias Gram positivas, las bacterias lácticas son un grupo especialmente rico en cepas productoras de bacteriocinas, De Vuyst y Vandame (1994) citan hasta 89 bacteriocinas diferentes en función de sus características bioquímicas, estructura primaria, determinantes genéticos, rango de microorganismos inhibidos, modo de acción, etc.

Todo ello ha llevado a redefinir el concepto de bacteriocina como agentes antimicrobianos de naturaleza peptídica cuya síntesis no es letal para la célula productora (Konisky 1982).

2.2.2 Características bioquímicas: clasificación

Tabla 1. Clasificación de las bacteriocinas propuesto por Klaenhammer, 1993, con modificaciones posteriores. Fuente: Autor.

Tipo de bacteriocina	Características	Ejemplo
I	Péptidos pequeños activos a nivel de membrana y que contienen algunos aminoácidos poco comunes como lantionina, b-metil-lantionina y dihidroalanina que se forman debido a modificaciones posteriores al proceso de la traducción.	Nisina

I A	Péptidos elongados y catiónicos que actúan a nivel de membrana, requieren la presencia de dos péptidos para ejercer su actividad antimicrobiana total.	Lactocina S y Nisina Z
I B	Péptidos globulares e hidrófobos que actúan como inhibidores enzimáticos.	-
II	Bacteriocinas lineales y no modificadas postraduccionalmente. Son péptidos pequeños y termoestables, que actúan a nivel de la membrana plasmática.	Pediocina PA-1
II A	Péptidos activos contra <i>Listeria</i> , tienen la secuencia consenso en la región N-terminal TGNGVXC	Pediocina PA-1 y Sakacina P
II B	Formadores de complejos para la formación de poros que consisten de dos péptidos diferentes. Ambos péptidos son necesarios para una mejor actividad antimicrobiana	Lactococcina G y Plantaricinas EF y JK
II C	Péptidos pequeños, termoestables, no modificados y que se transportan mediante péptidos líder	Divergicina A y Acidocina B
III	Bacteriocinas de elevado tamaño molecular y termolábiles	Helveticina J. V, Acidofilicina A y Lactacinas A y B
IV	Péptidos con una parte proteica y una o más fracciones lipídicas necesarias para su actividad biológica. Por tanto, esta clase incluye bacteriocinas que se consideran como glicoproteínas	Lactocina S y Mesenterocina 52
V	Bacteriocinas de estructura circular y no modificadas postraduccionalmente	Enterocina AS-48 y la Gasericina A

Se han reportado diferentes metodologías para detectar y caracterizar las bacteriocinas, basándose, la mayoría, en la difusión de las mismas a través de un medio de cultivo sólido para inhibir el desarrollo de un microorganismo sensible distribuido homogéneamente en él (ensayo de difusión en Agar). Sin embargo, cuando se desea conocer la capacidad bactericida que estas sustancias podrían tener, resulta de mayor utilidad e interés determinar la cinética de muerte celular del microorganismo sensible a través de técnicas con cultivos mixtos (co-cultivos), o con cultivos adicionados con el sobrenadante libre de células (SLC) obtenido de un cultivo de la bacteria bacteriocinogénica, en el que se encuentran los

compuestos con actividad antimicrobiana (González *et al* 1993, Kociubinski 1996, Simonetta 1997, Ross 2007 y Muller 2009).

2.2.3 Producción, biosíntesis y secreción

El término bacteriocinogenicidad está definido como la capacidad de las bacterias de sintetizar y eliminar al exterior proteínas antagónicas de otros microorganismos, por lo que se podría deducir que las BAL tienen esta característica bien definida. La producción de las bacteriocinas ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma, guardando relación directa con la biomasa producida (Vázquez *et al* 2009). Las bacteriocinas de bacterias lácticas son generalmente estables a pH ácido o neutro, indicando una adaptación al entorno natural de las bacterias que las producen. Además algunos extractos de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis* presentan estabilidad al calentamiento a 50 y 80°C, propiedad que es importante para asegurar el control de microorganismos en algunos procesos de la industria alimentaria (Gutiérrez 2005).

La secreción de las bacteriocinas a través de la membrana citoplasmática se produce por la actividad de transportadores específicos de tipo ABC (Marugg *et al* 1992, Stoddard *et al* 1992, Fremaux 1993). Estos complejos proteicos presentan dos dominios claramente diferenciados: un dominio de unión a ATP en el extremo carboxilo, donde se genera la energía necesaria para el transporte mediante la hidrólisis de ATP y una región hidrofóbica e integrada en la membrana en el extremo amino que reconoce y transporta el sustrato (Fath 1993). Los transportadores ABC de las bacteriocinas de la clase II contienen, además, un dominio con actividad proteolítica en su región amino que reconoce específicamente la secuencia consenso Gly-2-Gly-1 (Havarstein *et al* 1995). Por lo tanto, estos transportadores tienen una doble función: translocar la bacteriocina al exterior y actuar como peptidasas específicas.

2.2.4 Modo de acción

Las bacterias Gram positivas se caracterizan por poseer un alto contenido en lípidos aniónicos en su membrana. El modo de acción propuesto para las bacteriocinas es una unión inicial a la membrana bacteriana por atracción electrostática entre los lípidos cargados negativamente y las bacteriocinas con su carga neta positiva localizada fundamentalmente en uno de sus extremos (extremo C-terminal de la nisina, extremo N-

terminal de la pediocina). A continuación se produciría la inserción de las bacteriocinas en la bicapa lipídica, en el caso de la nisina esta inserción se realiza por su extremo N-terminal (Moll 1999) y en el caso de la pediocina, a través de su α -hélice transmembranal del extremo C-terminal (Ennahar 2000). De este modo se forman poros en la membrana bacteriana (**Figura 3**), la cual queda permeabilizada, la célula empieza a perder iones y metabolitos fundamentales para su supervivencia y eventualmente se produce la muerte bacteriana.

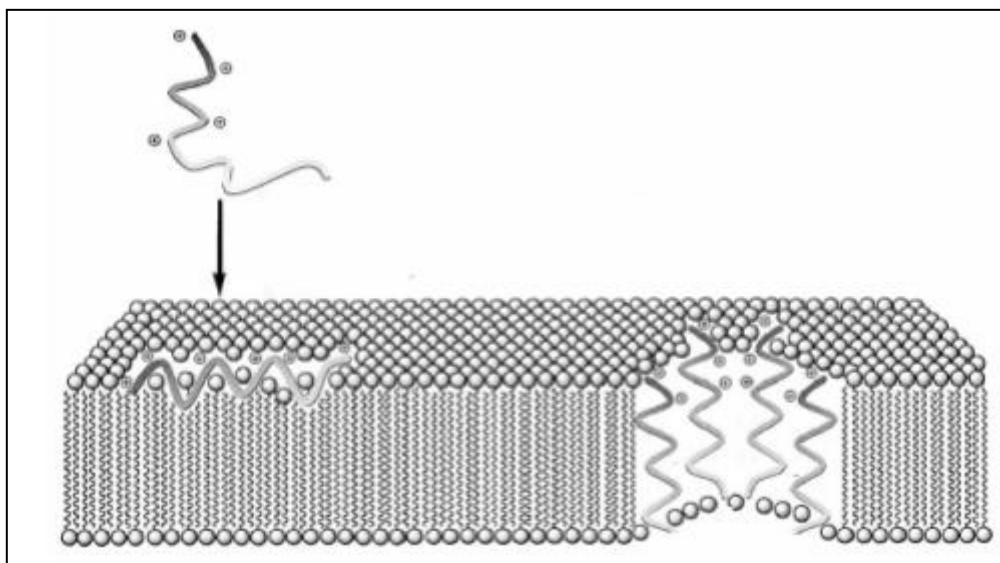


Figura 3. Mecanismo de acción de las bacteriocinas por formación de poros en la membrana bacteriana. Fuente (Moll 1999).

2.3 Importancia y utilidad de las BAL

2.3.1 Biopreservación

La biopreservación se refiere a la extensión de la vida útil de los alimentos y el aumento de la seguridad microbiológica usando una microflora natural o controlada y sus productos antibacteriales (Lewus 1991, Hugas 1998). La biopreservación puede ser aplicada en alimentos y específicamente en cárnicos por cuatro métodos básicos (Hugas 1998, Chen 2003):

- 1) Añadiendo un cultivo puro BAL viables productoras de bacteriocina. De esta manera se ofrece una forma directa de incorporar las bacteriocinas en el alimento, dependiendo su éxito de la habilidad del cultivo para crecer y producir bacteriocina

en el alimento bajo condiciones ambientales y tecnológicas (temperatura, pH, aditivos, entre otros). En el caso de la carne, (que es un alimento que no puede ser sometido a pasterización antes de la adición de las cepas iniciadoras), los cultivos biopreservadores o fermentadores deben ser capaces de competir con la microflora natural, no debe tener ningún impacto sobre las propiedades fisicoquímicas y organolépticas del alimento y no debe producir gas ni exopolisacáridos para evitar el abombamiento del empaque debido a la acumulación de gases y a la formación de viscosidades en las superficies de la carne (Castellano *et al* 2008).

- 2) Añadiendo bacterias ácido lácticas mesófilas como una protección contra el abuso de la temperatura. En este caso la cepa bioprotectora se mantendrá en una concentración inicial en condiciones frías. Bajo condiciones de abuso de temperatura, la cepa crecerá competitivamente frente a la bacteria patógena evitando los peligros a la salud. En condiciones de abuso de temperatura el cultivo protector puede incluso actuar como el deteriorante predominante, asegurando que las bacterias patógenas no crezcan y que el alimento se deteriore para que no sea consumido (Gálvez 2007).
- 3) Añadiendo preparaciones de bacteriocina cruda (extracto crudo), licor fermentado o concentrados obtenidos por el crecimiento de BAL productoras de bacteriocina en sustrato complejo. Este método evita el uso de compuestos purificados que pueden tener regulación legal y ahorra costos en la purificación de cada compuesto (Vásquez 2009).
- 4) Adicionando sustancias antagónicas puras o semipuras como las bacteriocinas producidas por BAL. Al usar este método la dosis de bacteriocina es más precisa y por ende más predecible. Sin embargo la aplicación se limita de acuerdo a la regulación de cada país concerniente a aditivos en alimentos (Hugas 1998).

Las dos primeras metodologías podrían denominarse métodos *in situ* de biopreservación (por inoculación del alimento con la cepa productora de bacteriocina en condiciones que favorezcan su producción); mientras que las dos últimas serían metodologías *ex situ* (donde la bacteriocina es producida por fuera del alimento en condiciones controladas y luego aplicada al alimento). En el caso de usar sustancias antagónicas puras o semipuras, es necesario utilizar técnicas de precipitación de la proteína adaptadas a las condiciones de cada laboratorio, debe inicialmente estandarizarse la producción y precipitación de la bacteriocina, hasta garantizar su reproducibilidad antes de la aplicación en alimentos para asegurar una cantidad adecuada con suficiente poder inhibitorio (Fiorentini *et al* 2001).

Adicionalmente se debe garantizar la actividad de cada extracto o de la bacteriocina e incluso puede llegar a ser necesario determinar la concentración mínima inhibitoria contra patógenos. La utilización de estos sistemas de biopreservación requiere en cualquier caso estudios preliminares para determinar el comportamiento de las bacterias en el medio de cultivo en que se desarrolla (curvas de crecimiento), y la estandarización de las técnicas para lograr producirlas en cantidades suficientes (Vásquez 2009).

2.4 Las BAL en la carne y en productos cárnicos

Para incrementar la vida útil de carnes, en los últimos años han surgido diversas alternativas a los métodos tradicionales de conservación. Se han empleado cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) seleccionadas para conservar carne debido a la producción de agentes antimicrobianos, como ácidos orgánicos o a compuestos como peróxido de hidrógeno, diacetilo, acetaldehído y bacteriocinas entre otros (Caplice 1999, Minor 2002), los cuales inhiben el crecimiento de la flora patógena y evitan efectos negativos sobre las propiedades funcionales como el color, la textura y el sabor.

El uso de estas BAL constituye una herramienta importante, ya que ayuda a reducir costos de producción y procesamiento como los debidos a la refrigeración y congelación de la carne y sus diferentes derivados, mientras se mejora su calidad organoléptica y microbiológica al tiempo que reduce el uso de conservantes y aditivos artificiales (Jurado 2009). Además de traer ciertas ventajas, pues el efecto en las características sensoriales es considerado “oculto” o no percibido durante la maduración, debido al bajo contenido de hidratos de carbono y la fuerte capacidad amortiguadora de la carne (Vásquez 2009).

Estas bacterias no producen un cambio drástico de las características sensoriales en comparación a los cambios que tienen lugar en la leche y hortalizas fermentadas. No obstante cuando se van a utilizar cepas bioprotectoras en carnes y sus derivados, los cultivos microbianos deben cumplir características importantes como mantener su efecto inhibitorio a bajas temperaturas y causar un efecto insignificante en el pH de la carne (Castellano *et al* 2008).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar el efecto antagónico de Bacterias Acido Lácticas aisladas a partir de productos cárnicos madurados artesanalmente frente *S. aureus*, *E. coli* y *Listeria monocytogenes*.

3.2 Objetivos específicos

- Obtener un extracto antimicrobiano con capacidad antagónica frente a patógenos de importancia en carnes rojas.
- Identificar bioquímicamente la(s) Bacteria(s) Acido Láctica(s) que presenten efecto antagónico frente a los patógenos evaluados.
- Evaluar la cinética de crecimiento de las cepas que presentes afecto antagónico.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Recolección de muestras

Se realizaron muestreos aleatorios de productos cárnicos madurados artesanalmente (Chorizo, Cábano, Salchichas, Longaniza, etc.) en distintas locaciones de la ciudad de Bogotá en Junio, Agosto, Septiembre, Octubre y Diciembre de 2012, preferiblemente en lugares de expendio informal, con un almacenamiento al aire libre y sin ningún proceso de empaquetado ni rotulado, introduciendo las muestras en bolsas Ziploc® estériles. Cada muestra se rotuló y se codificó según el procedimiento del (**Anexo 1**).

4.2 Procesamiento de muestras y siembra inicial

El procesamiento de las muestras de cárnicos madurados artesanalmente se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Pontificia Universidad Javeriana.

Se preparó un volumen de 90mL de Agua Peptonada, se pesaron 10g del cárnico madurado artesanalmente y se introdujeron en el volumen previamente preparado. Después de 15 minutos se realizaron siembras tanto en profundidad (1mL) como en superficie (0.1mL) inicialmente en Agar Suero de Naranja suplementado con leche descremada y luego en Agar MRS. Se incubaron de 12 a 24 horas a 37°C.

4.3 Siembra de colonias presuntivas BAL

Se realizó una observación de microscopia de las colonias resultantes de las cuales solo se utilizaron las microscópicamente correspondientes a cocos y bacilos Gram positivos, las cuales fueron sembradas en Agar MRS para su respectiva incubación en un ambiente de microaerofilia.

4.4 Realización de pruebas bioquímicas preliminares

Teniendo ya las cepas purificadas se procedió a la realización de pruebas de Catalasa y Oxidasa para confirmar que las cepas nativas aisladas fueran Bacterias Ácido Lácticas (esperando resultados negativos en ambas pruebas).

Para la prueba de catalasa, se transfirió parte del centro de una colonia a la superficie de un portaobjetos de vidrio, luego se agregó una gota de peróxido de hidrógeno al 3% y se observó la formación de burbujas. Para la prueba de la citocromo oxidasa, se dispersó una colonia con el asa sobre tiras comerciales Bactident® Oxidasa (MacFaddin 2003, Koneman 2008)

4.5 Realización de pruebas de antagonismo

Con aquellas cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) que se comprobó la acción antagonica en la prueba de antagonismo indirecto; a partir de un vial de cada cepa se realizó un inóculo correspondiente al 10% del Volumen Efectivo de Trabajo (VET) en caldo TSA + (extracto de levadura) para *Listeria monocytogenes* y caldo nutritivo para *E. coli* y *S. aureus*, se dejaron en periodo de incubación durante 12h a 37°C bajo condiciones de aerobiosis y agitación constante 150 r.p.m. Las condiciones de crecimiento para *E. coli* y *S. aureus* fueron 4 horas a 35°C +/- 2°C. A partir de los cultivos de las BAL, transcurrido el periodo de incubación el cultivo fue centrifugado a 5000g a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante se separó del pellet celular a un nuevo tubo estéril para ajustar pH a 6.5 (Usando NaOH 0.1 - 1N). Posteriormente se filtró mediante membranas Millipore ® de 0.22µm con el fin de separar todas las células presentes en el sobrenadante.

Paralelo a este procedimiento en una caja con Agar TSA se adicionó el microorganismo patógeno (*Listeria monocytogenes*, *E. coli* y *S. aureus*) como se describió anteriormente para la conformación del césped. Las placas se dejaron secar 30 minutos en cabina de flujo laminar. Posteriormente se incorporó el sobrenadante obtenido anteriormente. Se depositaron 20µl sobre el agar. Se utilizó como control positivo Gentamicina y como control negativo solución salina estéril (0,85% p/v).

Las cepas de los microorganismos patógenos fueron proporcionadas por el Cepario de Bacterias de la Pontificia Universidad Javeriana.

4.6 Actividad de Sobrenadante

Al sobrenadante obtenido anteriormente se le realizaron diluciones con buffer fosfato 0.05M (0,5:1, 1:2, 1:4, 1:8 1:16) y se sembraron 20µl sobre cajas de Agar TSA. Las cajas fueron incubadas a 37°C durante 24-48h (Tagg 1976).

4.7 Conservación de cepas con capacidad antagónica

Se llevó a cabo el crecimiento de las cepas en Erlenmeyer de 250mL con un volumen de 20mL de caldo MRS, se llevó a incubación a 37°C por 24 horas, luego del cual a cada Erlenmeyer se le adiciono un volumen de 8mL de Glicerol (25% v/v), posteriormente se depositó un volumen de 1,5mL en tubos Eppendorf y se llevó a congelación a una temperatura de -20°C en el banco de cepas del Laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Pontificia Universidad Javeriana.

4.8 Identificación bioquímica por medio de Kit API® 50 CH

Se probó la capacidad de fermentar carbohidratos por medio del Kit de prueba API® 50 CHL (bioMérieux, Inc., Hazelwood Missouri, EEUU.) el cual es un sistema estandarizado de ensayos bioquímicos para el estudio del metabolismo de 49 carbohidratos usado para la identificación de *Lactobacillus* en 48 horas. Para la preparación del estuche, se realizó una suspensión bacteriana en solución salina, se estandarizó el inóculo en 10⁸ unidades McFarland y se procedió a la inoculación de cada una de las pruebas bioquímicas con una posterior adición de parafina líquida para proveer el ambiente microaerófilico, para incubarse durante 18 a 24 horas, posteriormente se llevó a cabo la interpretación de los resultados de cada prueba, para obtener un bionúmero (de 7 números) el cual fue comparado con las tablas y software del equipo API® 50 CHL apiweb (bioMérieux, Inc., Hazelwood Missouri, EEUU.) (**Anexo 4**).

4.9 Cinética de crecimiento

Para establecer la cinética de crecimiento de la(s) bacteria(s) ácido láctica(s) con capacidad antagónica se realizó un preinóculo a partir de una colonia previamente crecida y aislada en agar MRS en un Erlenmeyer con 60 ml de caldo MRS, en condiciones microaerófilicas de 6-8 horas, 37°C, 120 r.p.m. Luego el preinóculo (manteniendo la relación del 10%) se distribuyó en 3 Erlenmeyer de 250ml conteniendo cada uno 200 ml de caldo MRS. El crecimiento se llevó a cabo durante 24 horas a 37°C y 120rpm en condiciones de microaerofilia, la biomasa fue cuantificada por medio de espectrofotometría a una OD540 cada hora durante 24h, en un espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 60. Como blanco se utilizó caldo MRS estéril y los datos obtenidos para cada una de las réplicas se promediaron para establecer la curva de crecimiento. Previo al procedimiento de curva de

crecimiento se llevó a cabo una curva patrón de peso seco (**Anexo 2**), siguiendo a cabo la siguiente metodología: Se obtuvo una suspensión concentrada del microorganismo a evaluar (absorbancia mayor a 1,5 a una longitud de onda de 540nm para bacterias), se lavó tres veces con solución isotónica (0,85% de NaCl) centrifugando a 2250g por 20 minutos, para retirar el medio. Se marcó y se dejó secar durante 8 horas a 105°C, 20 tubos de vidrio 16x150mm, luego se pesaron los tubos en balanza analítica Adventurer TM OHAUS manipulándolos con pinzas. Se transfirieron 10ml por tubo de la solución de células concentrada a 10 tubos de vidrio 16x150mm secos y se transfirieron 10ml de solución isotónica a 10 tubos de vidrio 16x150mm.

Se llevaron todos los tubos al horno de convección a 105°C aproximadamente por 10 días hasta que el líquido se evaporo, finalmente se pesaron los tubos en balanza analítica Adventurer TM OHAUS. Para la construcción de la curva se llevó a cabo el procedimiento especificado en el (**Anexo 3**).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Aislamiento e identificación microscópica y macroscópica de BAL a partir de productos cárnicos madurados artesanalmente

Luego de realizar las siembras de cada uno de los productos analizados, se encontró la presencia de diferentes morfologías de cocos y bacilos Gram positivos no esporulados (**Figura 4**), los cuales fueron evidenciados por medio de tinción de Gram y contrastados con lo propuesto por Orla-Jensen (1924) quien reporto que las bacterias lácticas se caracterizaban por ser cocos o bacilos Gram-positivos generalmente inmóviles y no esporulados. Se observaron bacilos cortos y alargados, algunos agrupados en cadenas de no más de 4 bacilos y cocos en racimos, cadenas y tétradas. En cuanto a la observación macroscópica de las colonias de BAL, en su mayoría se observaron colonias pequeñas de color blanco cremoso. Las cepas aisladas de las muestras se organizaron bajo la siguiente nomenclatura (**Tabla 1**).

Tabla 2. Productos analizados, nomenclatura y tinción de Gram correspondiente. Fuente: Autor.

Muestra	Nomenclatura	Tinción de Gram
Chorizo	C2 (-1)	Cocos y Bacilos Gram positivos
Salchicha 1	S1A	Cocos Gram positivos
Salchicha 2	S2A	Cocos Gram positivos
Cábano	Cb1	Cocos Gram positivos
Longaniza	Lg1	Bacilos Gram positivos
Chorizo 1	CH1	Bacilos Gram positivos
Chorizo 2	CH2	Cocos y Bacilos Gram positivos
Chorizo pequeño	Chp	Bacilos Gram positivos
Chorizo blando	CB	Bacilos Gram positivos
Chorizo seco	CS1	Cocos Gram positivos
Chorizo seco 2	ChS2	Bacilos Gram positivos
Longaniza	Ln2	Bacilos Gram positivos

Chorizo	C13	Cocos Gram positivos
Chorizo	ChEs	Bacilos Gram positivos
Génova	GV	Bacilos Gram positivos

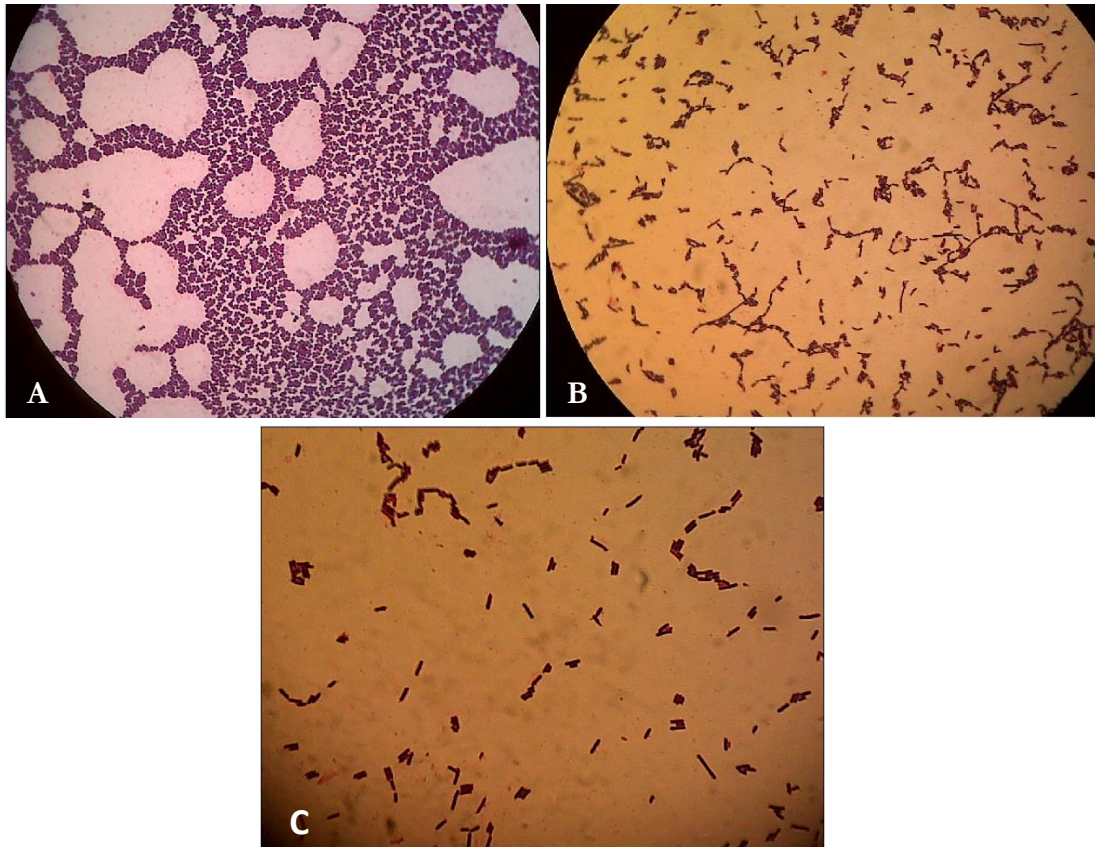


Figura 4. Cocos y bacilos Gram positivos no esporulados. A. Cepa Cb1, B. cepa Ln2, C. cepa ChS2. Fuente: Autor.

5.2 Identificación bioquímica preliminar de las cepas aisladas

Las cepas aisladas de los productos cárnicos madurados artesanalmente fueron identificadas con el uso de pruebas bioquímicas de catalasa y oxidasa, con el fin de determinar la presencia o ausencia de citocromos en los microorganismos aislados, debido a que autores como Charteris *et al* 2001 reportan que las BAL carecen de sistemas de transporte de electrones funcionales ligados a citocromos, en adición a esto, Axelsson 1993 reporta que este complejo solo se encuentra en microorganismos aerobios por la presencia

de oxígeno como catalizador de la reacción, supuesto que concuerda con lo obtenido en la investigación, al encontrar resultados negativos para ambas pruebas (**Tabla 2**).

Tabla 3. Pruebas bioquímicas de catalasa y oxidasa de las cepas aisladas de productos cárnicos madurados artesanalmente. Fuente: Autor.

Nomenclatura	Catalasa	Oxidasa
C2 (-1)	Negativa	Negativa
S1A	Negativa	Negativa
S2A	Negativa	Negativa
Cb1	Negativa	Negativa
Lg1	Negativa	Negativa
CH1	Negativa	Negativa
CH2	Negativa	Negativa
Chp	Negativa	Negativa
CB	Negativa	Negativa
CS1	Negativa	Negativa
ChS2	Negativa	Negativa
Ln2	Negativa	Negativa
C13	Negativa	Negativa
ChEs	Negativa	Negativa
GV	Negativa	Negativa

5.3 Pruebas antagónicas frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* por medio de la técnica de difusión en pozo.

E. coli, una de las tres cepas patógenas estudiadas, fue sensible a la acción de los sobrenadantes generados a partir de la cepa ChS2, perteneciente al grupo de quince cepas de bacterias ácido lácticas nativas aisladas de productos cárnicos madurados artesanalmente

(Figura 5), sin embargo, no se obtuvo ningún resultado positivo frente a *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*.

Según los resultados de la presente investigación, la bacteria nativa ácido láctica presente en el producto cárnico madurado artesanalmente produjo una sustancia que inhibió el crecimiento de *E. coli*. Autores como Työppönen 2003 reporta que al contrario de las bacterias Gram positivas, las bacterias Gram negativas además de poseer una membrana interior poseen una membrana exterior a través de la cual las bacteriocinas que poseen características hidrofóbicas no son capaces de penetrar. Sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que la cepa láctica aislada produjo una sustancia capaz de penetrar estas dos barreras e inhibir el crecimiento de este microorganismo, haciéndolo así un candidato para ser usado a futuro como cultivo bioprotector en alimentos cárnicos madurados artesanalmente.

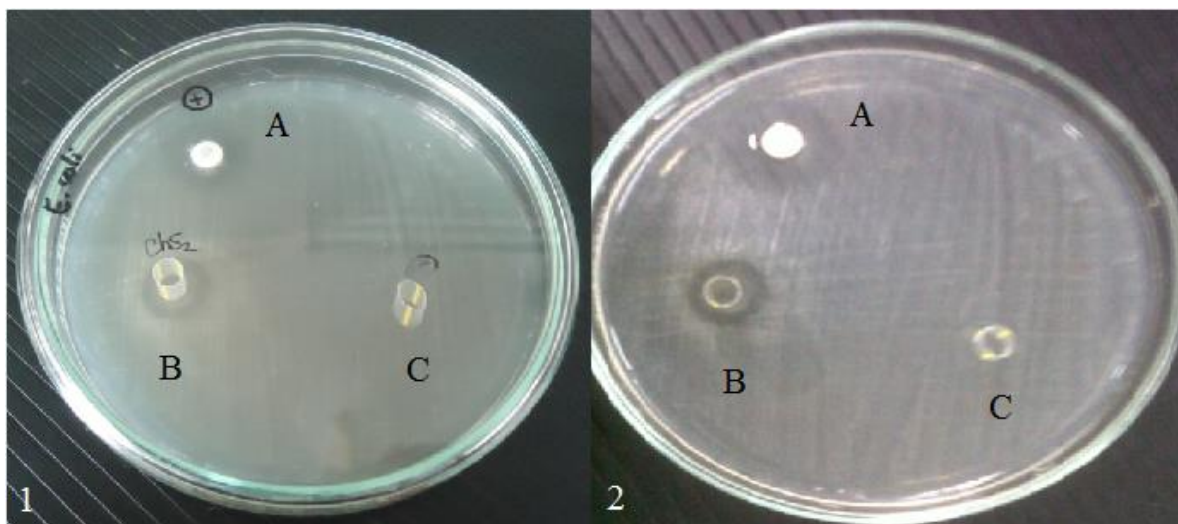


Figura 5. Actividad antagonica cepa ChS2 – *E. coli*. Vista anterior (1) y posterior (2). A. Disco de antibiótico de Gentamicina (control positivo), B. Sobrenadante puro de la cepa ChS2 (halo de inhibición) y C. Solución salina estéril (control negativo). Fuente: Autor

Incze 1998, reporta la eliminación de *E. coli* en salchichas fermentadas por bacterias ácido lácticas, mediante la disminución del pH y del AW en el proceso de envejecimiento de las salchichas. Adicionalmente, se han realizado diferentes estudios de producción, recuperación y purificación de bacteriocinas provenientes de BAL aisladas de productos cárnicos que demuestran su efectividad contra cepas de *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. aureus* (Muriana 1996, Kalmokoff 1999, Parente 1999) autores que han reportado el uso y la aplicación de la Pediocina producida por *L. plantarum* mediante la formación de poros en la membrana bacteriana, la cual queda permeabilizada, por lo tanto se produce una pérdida de

iones y metabolitos celulares fundamentales para su supervivencia y eventualmente se produce la muerte bacteriana contra microorganismos resistentes a temperaturas de refrigeración y a tratamientos con desinfectantes convencionales en la industria alimentaria.

En adición a esto, Murry 2004, en un estudio acerca de la identificación y evaluación de dos cepas de *Lactobacillus* aisladas de un alimento probiótico para pollos reporta de igual manera la inhibición en el crecimiento de principales agentes patógenos transmitidos por los alimentos asociados con las aves procesadas, los cuales pueden causar enfermedades graves e incluso la muerte en los seres humanos, tales como *E. coli*, *Salmonella* spp. y *Clostridium* spp. debido a la presencia de *L. plantarum* y *L. salivarius*, teniendo en cuenta que en la mayoría de los casos, el efecto antagonico fue debido a la disminución en el pH, por la producción de ácidos orgánicos.

Cabe resaltar que los resultados obtenidos en esta investigación corresponden a una sustancia inhibitoria difusible en el medio, la cual probablemente sea una bacteriocina, sin embargo, los resultados se encuentran sujetos a pruebas confirmatorias correspondientes. Teniendo en cuenta esto las BAL producen varios compuestos antimicrobianos clasificados como de bajo peso molecular, tales como, peróxido de hidrógeno (H₂O₂), dióxido de carbono (CO₂), diacetilo (2,3-butanodiona) (Sung Cho 2006, Ammor *et al* 2006).

A pesar de que la presente investigación no obtuvo resultados de antagonismo frente a *S. aureus*, cabe resaltar que autores como Schillinger 1989 y Friedrich-Karl 2000 reportan que un descenso rápido del pH por debajo de 5,3 resulta ser importante para la inhibición de patógenos en alimentos como *Salmonella* y *Staphylococcus aureus* si los productos cárnicos son fermentados a temperaturas superiores a 18°C y con respecto a *Listeria monocytogenes*, en otros países se han realizado estudios que demuestran la efectividad de las bacteriocinas provenientes de BAL contra cepas de *L. monocytogenes* (Cintas 1998). Recientes investigaciones han reafirmado esta propuesta de inhibición sobre líneas de productos ya contaminados, como una estrategia para evitar las pérdidas económicas en la industria de alimentos cuando se obtienen lotes con *L. monocytogenes* (Rivera 2007), hecho importante ya que al tomar las muestras para este trabajo a partir de productos cárnicos madurados artesanalmente, la mayoría de patógenos contaminantes en los alimentos son provenientes de las materias primas o de manipuladores de alimentos que están implicados en el procesamiento de estos productos, de tal manera que si el lote se encuentra contaminado, el producto final estará contaminado con dicho microorganismo, presentando así un riesgo para la salud pública.

Adicionalmente, estos resultados son coincidentes con los obtenidos por otros investigadores tales como Kociubinski 1996, Carrasco 2002 y Työppönen 2003, los cuales reportan la recuperación de Curvacina A, Sakacina A, P y K, bacteriocinas producidas por *L. curvatus* y *L. sakei*, respectivamente, aisladas de productos cárnicos y principalmente activos contra *Listeria monocytogenes* al igual que la recuperación de Pediocina PA-1/AcH producida por *P. acidilactici*, *P. parvulus* y *L. plantarum* la cual inhibe el crecimiento de *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *Clostridium perfringens* microorganismos de importancia a nivel de salud pública y de la industria de alimentos. De igual manera concuerda con lo informado por Friedrich-Karl 2000, quien reporta la inhibición de *Listeria monocytogenes*, *Bacillus* spp., *Clostridium* spp. y *Staphylococcus* spp. en alimentos cárnicos fermentados, y por Vinderola 2003, quien propone el uso de cepas de BAL productoras de sustancias antimicrobianas para prevenir la contaminación de diferentes matrices alimentarias con distintas especies de bacterias patógenas.

A pesar de que la mayoría de reportes acerca de bacteriocinas de Lactococos se aíslan a partir de productos lácteos y vegetales, se encuentran también reportes de varias cepas de *L. lactis* (productor de nisina) que fueron aisladas de embutidos fermentados, indicando así, el uso potencial de Lactococos en la fermentación de la carne. Cepas de *L. lactis* productoras de nisina aisladas de embutidos fermentados españoles (Rodríguez *et al* 1995) y de salchicha tradicional fermentada de origen tailandés (Noonpakdee *et al* 2003) fueron eficaces en la inhibición de patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*, esta inhibición según algunos autores se atribuye a la producción de ácidos orgánicos, entre ellos el láctico y a sustancias como el peróxido de hidrógeno, y bacteriocinas (Jurado 2009).

En conclusión, es importante resaltar que la mayoría de las investigaciones llevadas a cabo con respecto al aislamiento de BAL a partir de productos cárnicos obtienen como resultado el aislamiento de cepas pertenecientes a los cultivos starter agregados al inicio del proceso de elaboración del alimento, y no al aislamiento de las bacterias nativas que mediante la producción de sustancias como peróxido de hidrógeno, ácido láctico, ácido acético y bacteriocinas inhiban el crecimiento de patógenos importantes en alimentos.

5.4 Identificación preliminar de cepa ChS2 por medio de API® 50 CHL

Luego de comprobar la actividad antagónica de la cepa ChS2 contra *E. coli* se llevó a cabo una identificación por medio de la batería bioquímica API® 50 CHL (bioMérieux, Inc., Haazelwood Missouri, EEUU.) (Figura 6), luego del periodo de incubación se utilizó el software apiweb dado por la casa comercial para llegar a una identificación del microorganismo, identificado como *Weissella viridescens* con un porcentaje de identificación mayor al 70% (Anexo 4), sin embargo, los valores establecidos por BioMérieux con respecto al porcentaje de confiabilidad para hacer una prueba válida se encuentran entre el 90 al 100%. Algunos autores mencionan que este método presenta algunas limitaciones para la identificación de BAL, como son los tiempos en la lectura de las galerías y las variaciones de resultados que hay entre las lecturas. Algunas bacterias ácido lácticas necesitan más tiempo para la fermentación de algunos carbohidratos, cada cepa en particular tiene características distintivas que pueden llegar a dar identificaciones erróneas; otra limitante es la actualización de la base de datos de referencia ya que existen BAL que aún no están catalogadas o bien que presentan el mismo perfil bioquímico siendo especies diferentes (Zhong 1998, Rantsiou *et al* 2005, Vaughan 2005 y Kulwichit *et al* 2007).

Existen pocos reportes científicos de la producción de bacteriocinas por las especies del género *Weissella* (Rouse 2007, Srionnual *et al* 2007), quienes purificaron una bacteriocina producida por *Weissella cibaria* 110, microorganismo aislado de productos pesqueros tailandeses, activa contra *Lactobacillus sakei* y *Weissella paramesenteroides*.

Espeche *et al* 2009, aislaron de muestras de leche de bovinos sanos, especies de *Weissella paramesenteroides* con efecto antagónico contra *Streptococcus dysgalactiae* ATCC 27957 y *Escherichia coli*. Pal 2009, encontró compuestos antimicrobianos no asociados a bacteriocinas con actividad antimicrobiana contra patógenos de importancia en alimentos (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*), incluyendo microorganismos Gram negativos (*E. coli*) secretados por *Weissella paramesenteroides* DFR-8; microorganismo aislado a partir de material vegetal. Aunque la investigación no hace referencia al tipo de sustancia, sus resultados demuestran que no es de naturaleza proteica, que es insensible a la actividad de enzimas proteolíticas, lipasas, amilasas y catalasas, que es un compuesto aromático de bajo peso molecular, lo que lo diferencia de las bacteriocinas. Por lo tanto estas investigaciones muestran el gran potencial que podría tener este género bacteriano como biopreservante alimentario o para la prevención y control de enfermedades en animales y

humanos, ya que no ha sido muy estudiado el aislamiento y la identificación de microorganismos nativos aislados a partir de alimentos cárnicos madurados artesanalmente para su uso en la industria de inocuidad de alimentos.



Figura 6. Identificación por API® 50 CHL (bioMérieux, Inc., Haazelwood Missouri, EEUU.). Fuente: Autor.

Por otro lado, recientemente, Ayeni *et al* 2011, plantean a *W. confusa* U17, una cepa aislada de quesos, como una BAL candidata para ser investigada y usada como posible probiótico, por su mejor habilidad de adhesión a las células gastrointestinales que otras cepas de *W. confusa*.

De igual manera, autores como Serna 2011, reportan a *Weissella confusa* como productor de una sustancia similar a una bacteriocina que presenta un efecto antimicrobiano contra *Bacillus cereus*, Chavasirikunton *et al* 2006, encontraron que algunas BAL aisladas de embutidos fermentados tropicales podían producir nuevas bacteriocinas con propiedades adecuadas para su adaptación a un lugar tropical. Ya que particularmente el clima tropical es un ambiente óptimo para la multiplicación celular, llevando a tomar conciencia sobre la necesidad de bioprotectores para alimentos en este tipo de áreas. Ellos reportaron actividad tipo bacteriocina en *W. confusa* y en *Pediococcus acidilactici* hacía *Bacillus cereus*, indicando que la actividad antagonista de *Pediococcus* sp., es común, sin embargo no es así la de *Weissella* sp.

hacia el mismo. Se encontró también que las bacteriocinas producidas por ambas cepas se pueden aplicar en un amplio rango de pH, de 4 a 6, sin embargo a pesar de que su estabilidad disminuye al aumentar la temperatura, su actividad se mantiene a la temperatura del proceso de pasteurización. Vallejo 2009, encontró sustancias tipo bacteriocinas termoestables, indicando que son péptidos de bajo peso molecular con actividad específica contra *L. monocytogenes*, propiedades que permitirían incluirlas dentro del grupo de bacteriocinas clase I o II.

Pal 2010, simplificó el medio MRS, usado comúnmente para el cultivo de las BAL y utilizado en la presente investigación, para aumentar la producción de bacteriocinas producidas por *Weissella paramesenteroides* DFR-8, la cual produce una bacteriocina termoestable y un compuesto antimicrobiano que no tenía características de bacteriocina. Al modificar la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno (7.99% Glucosa y 9% Triptona), encontró que la producción de la bacteriocina aumentaba en comparación con un medio no modificado. En la actualidad se han aumentado este tipo de estudios para optimizar la producción de las bacteriocinas.

Sin embargo, actualmente, se están llevando a cabo amplias investigaciones en el uso de BAL diferentes a las especies del género *Weissella* para la biopreservación de alimentos. Díaz *et al* 2012, de acuerdo a sus resultados de investigación sugieren el uso de *Lactobacillus plantarum* EC52 para la conservación de mezclas de carne, dado que la bacteria reduce los niveles de *L. monocytogenes* e inhibe el crecimiento de *E. coli*, lo que subsecuentemente conllevaría a una disminución de adquirir ETA's.

Se han realizado diversos estudios para identificar bacteriocinas y sustancias tipo bacteriocinas producidos por BAL en general, y darles un uso como inhibidores, estables a los tratamientos térmicos y las variaciones de pH, gracias a su propiedad inocua de poder ser degradadas por proteasas en el tracto gastrointestinal. Es por ello que los resultados obtenidos en esta investigación, comparados con el resto de las investigaciones demuestran el gran potencial que podría tener el género *Weissella*, así como sus metabolitos, como bioprotectores de alimentos, como un método para la prevención y control de enfermedades en animales y humanos, entre otros. De acuerdo con lo anterior, la capacidad antimicrobiana del género *Weissella* contra patógenos Gram negativos causales de ETA'S representa una importante alternativa de investigación como una estrategia para mejorar la calidad e inocuidad de los alimentos.

5.5 Cinética de crecimiento de cepa ChS2 (*Weissella viridescens*)

La cinética de crecimiento de la cepa ChS2 se llevó a cabo con el fin de determinar el comportamiento y las fases de crecimiento de la misma, ya que esta determinaría la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación de la cepa nativa aislada de Chorizo seco con actividad antagónica frente a *E. coli*. Los resultados obtenidos aportan conocimiento al comportamiento de la cepa en una siguiente fase conducente a la producción y caracterización de la sustancia antimicrobiana obtenida.

En la figura 7 se observa el comportamiento de la biomasa (g/L) a través del tiempo (18h) en caldo MRS. Los datos de las absorbancias obtenidas a 540nm se encuentran en el Anexo 5.

La cepa presenta un crecimiento en donde se identifica una fase de adaptación (0-1 h) exponencial (1 – 14 h) y estacionaria (14-17 h).

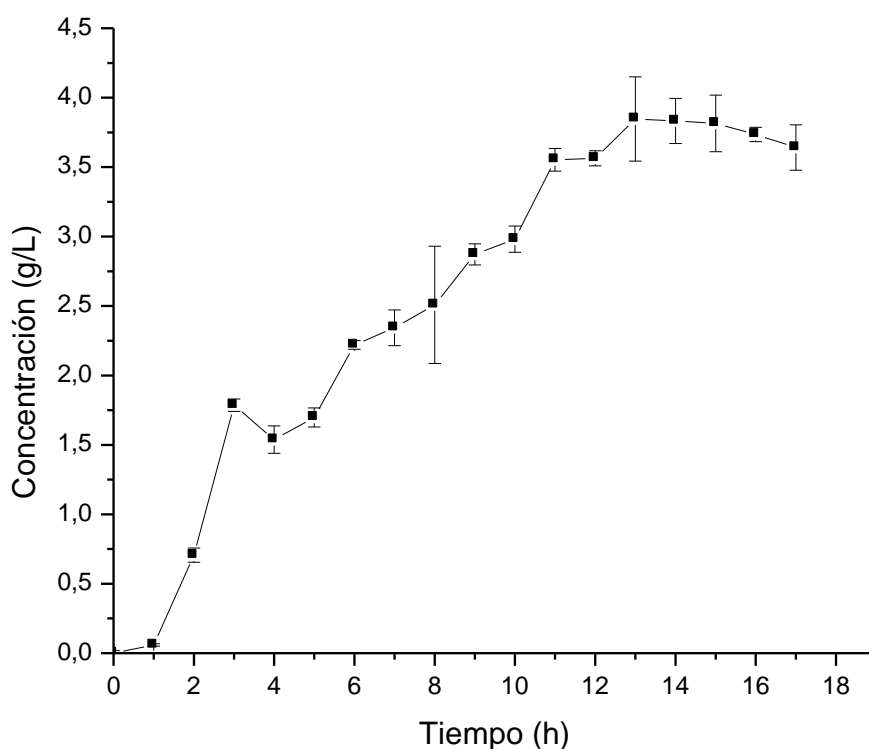
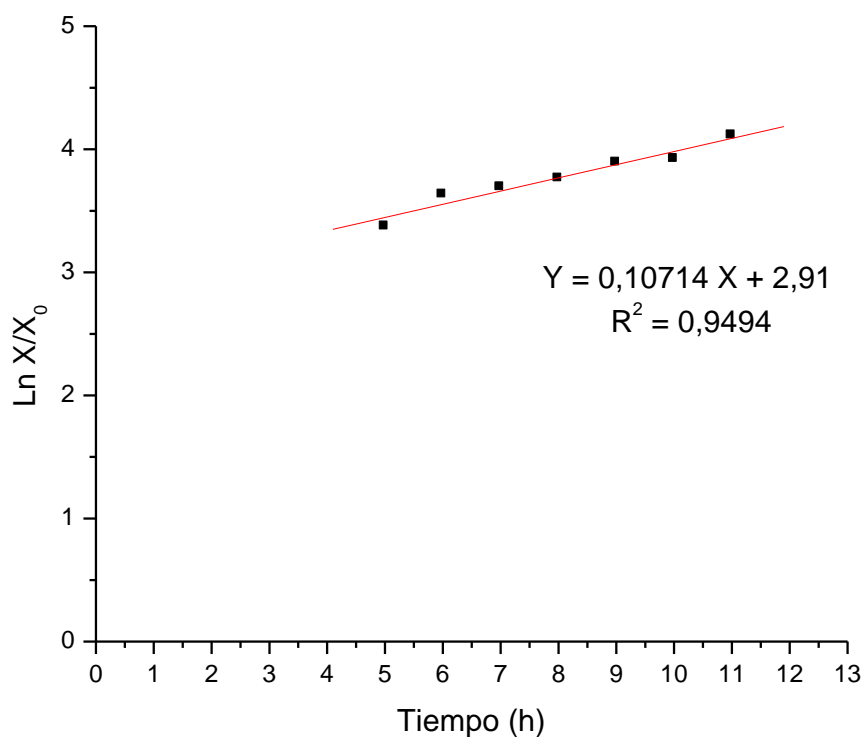


Figura 7. Cinética de crecimiento en caldo MRS correspondiente a la cepa ChS2 que presentó actividad antagónica frente a *E. coli*. Fuente: Autor.



μ_x	0,10 h ⁻¹
td	6,44 h

Figura 8. Cinética de orden 1, dónde μ_x representa la velocidad específica de crecimiento y td representa el tiempo de duplicación. Fuente: Autor.

Estudios recientes acerca de cinéticas de fermentación y acción antimicrobiana de *Weissella confusa* contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* (Serna 2010), reportan fermentaciones discontinuas llevadas a cabo por 48 horas en caldo MRS, obteniendo como resultados una fase exponencial hasta 12 horas y a partir de este tiempo el microorganismo entró en fase estacionaria, lo que concuerda con los resultados obtenidos en la cinética de crecimiento de la cepa ChS2 (**Figura 7**), de igual manera reportan una velocidad específica de crecimiento de 0,0811 h⁻¹, resultado similar al obtenido en la presente investigación (0,10714 h⁻¹) (**Figura 8**), otros estudios acerca de la comparación del comportamiento cinético de dos inóculos de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) desarrollados a partir de *Lactobacillus plantarum* A6 y de yogurt comercial, presentan velocidades específicas de crecimiento de 0,53 h⁻¹, sin embargo se ha reportado que *L. plantarum* bajo condiciones óptimas de crecimiento puede llegar a tener una velocidad específica de crecimiento mayor a 0,5 h⁻¹ (Agudelo 2010). Otros autores reportan velocidades específicas de crecimiento

desde $0,187 \text{ h}^{-1}$ hasta $0,320 \text{ h}^{-1}$ al realizar identificaciones preliminares *in vitro* de propiedades probióticas en cepas de *S. cerevisiae* en medio YPD (Rubio 2008) y en investigaciones acerca de la producción de microorganismos probióticos utilizados como aditivos para alimentos concentrados para ganado vacuno se obtuvieron velocidades de crecimiento de $0,1 \text{ h}^{-1}$ para cepas de *Lactobacillus* spp. y $0,35 \text{ h}^{-1}$ para *Bifidobacterium* spp. en medio con melaza de caña y extracto de levadura (Vargas 2004).

Con respecto al tiempo necesario para que la población doble su tamaño, para la cepa ChS2 se obtuvo un tiempo de duplicación correspondiente a 6,44788 h; autores reportan un tiempo de duplicación de 1,28 h para *L. plantarum* A6 en medio MRS (Agudelo 2010), sin embargo, para esta misma cepa se ha encontrado un tiempo de duplicación de 1,1 h en un medio con almidón (Giraud 1994), mientras que otros autores han encontrado un tiempo de duplicación de 1,98 horas en medio MRS (Rao 2004). Autores como Vargas 2004, reportan tiempos de duplicación para *Lactobacillus* spp. y para *Bifidobacterium* spp de 7,073 h y 1,98 h, respectivamente en medios con melaza de caña y extracto de levadura.

Aunque se encuentra poca información disponible de publicaciones que mencionen las condiciones de fermentación y optimización para la producción de bacteriocinas por especies de *Weissella*, es claro que se debe proporcionar un medio rico en nutrientes que cumpla con sus requerimientos nutricionales complejos. La aireación, la temperatura y el pH son reconocidos como los factores más relevantes para la producción de bacteriocinas por BAL (Papagianni 2012).

La tolerancia al oxígeno por las BAL se encuentra asociada con diferentes rutas metabólicas que conducen a diferentes rendimientos de producto, la aireación es un factor crítico para el resultado de sus fermentaciones. A pesar de que en el laboratorio son tradicionalmente consideradas como anaerobias facultativas y la mayoría de los estudios sobre sus bacteriocinas se han llevado a cabo bajo condiciones anaeróbicas, estudios han demostrado que el crecimiento en una atmósfera enriquecida de oxígeno mejora los rendimientos de producción de bacteriocinas (De Vuyst 1996).

Se ha reportado que la producción de *Weissella* A en fermentación por lotes sin control de pH y en condiciones semi-aerobias tiene un comportamiento de fermentación asociada al crecimiento (Papagianni 2011). Por lo que se puede inferir que en estas condiciones se favorece el aumento de los niveles de producción de estos metabolitos.

La mayoría de las bacteriocinas de la subclase IIa, a la cual pertenece la Weisselina A, han sido en su mayor parte estudiadas y un ejemplo de esta es la Pediocina AcH la cual es llevada a su forma activa final a través de un proceso enzimático que requiere de un descenso del pH (<4,5), estas condiciones llevan a la modificación postraduccional del péptido y su excreción se lleva a cabo incluso cuando las células han dejado de crecer (Papagianni 2012). Estudios realizados por Henderson 1992 y Lozano *et al* 1992 han demostrado de igual manera que la Pediocina PA-1 es sometida a un procedimiento similar, por lo tanto ese gradiente de disminución del pH ha sido identificado por Cabo *et al* 2001 como un parámetro crítico en la producción de Nisina por *Lactococcus lactis*. La nisina es un péptido pequeño modificado postraduccionalmente, cuya producción es también desencadenada por el descenso del pH. Por lo tanto, es muy posible que el descenso del pH provoque un proceso similar en la Weisselina A, lo que lo convierte en un sujeto importante para el desarrollo de nuevas investigaciones.

Actualmente en Colombia la producción de alimentos con probióticos es incipiente, siendo la industria de lácteos la única que los usa, debido a la facilidad para obtener crecimiento de los microorganismos en un medio láctico, sin embargo, la presente investigación en conjunto con las demás investigaciones reportadas son una muestra de que las BAL no solamente crecen apropiadamente en productos lácteos sino que pueden tener velocidades de crecimiento y rendimientos de producción de bacteriocinas apropiados en productos cárnicos madurados para así poder ser utilizados en la industria probiótica y de bioprotección de alimentos. La búsqueda de medios y condiciones de cultivo que permitan la obtención de altas densidades tanto de microorganismos como de sus productos finales de fermentación, ha sido la meta de muchas investigaciones que están interesadas en las bacterias ácido lácticas, no sólo como microorganismos iniciadores, sino también como un aditivo para aumentar la vida útil del alimento y evitar la proliferación de microorganismos patógenos. Es por esto que la eficiencia del proceso de producción de bacteriocinas y la posible aplicación en estas fermentaciones están sujetas al conocimiento de la cinética de crecimiento de las cepas utilizadas, así como del manejo y control de aspectos importantes como la aireación, la temperatura y el pH, los cuales influyen en las características de crecimiento del microorganismo e inciden notablemente en la velocidad y rendimientos asociados a la producción tanto de biomasa como de bacteriocinas.

6. CONCLUSIONES

Se encontró actividad antagónica de la cepa ChS2 aislada de chorizo (producto cárnico madurado artesanalmente) frente a *E.coli*, mediante la producción de una sustancia inhibitoria difusible en medio MRS, identificada como una posible bacteriocina.

La identificación preliminar de la cepa ChS2 por medio de API® 50 CHL arrojó como resultado con un 70% de porcentaje de identificación a *Weissella viridescens*, cepa no reportada hasta el momento con actividad probiótica y de la cual no se reportan estudios acerca de las bacteriocinas que produce.

La curva de crecimiento de la cepa ChS2 en caldo MRS presentó una fase de adaptación (0-1 h), exponencial (1 – 14 h) y estacionaria (14-17 h) y la cinética de crecimiento presentó una velocidad específica de crecimiento (μ_x) de $0,10714 \text{ h}^{-1}$ y un tiempo de duplicación (td) correspondiente a 6,44788 h.

7. RECOMENDACIONES

Realizar la amplificación del gen del ARN ribosomal 16S para identificar molecularmente la cepa ChS2 identificada preliminarmente como *Weissella viridescens*.

Identificar el gen responsable de la actividad antagónica (producción de la bacteriocina) para realizar evolución dirigida o mutagénesis.

Identificar y cuantificar la sustancia antimicrobiana obtenida.

Evaluar la sustancia antimicrobiana obtenida como una sustancia bioconservante en carnes frescas con el fin de aumentar el tiempo de vida útil en el proceso post-mortem.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agudelo C, Ortega R, Hoyos J (2010) Determinación de Parámetros Cinéticos de dos Inóculos Lácticos: *Lactobacillus plantarum* A6 Y Bacterias Ácido Lácticas de Yogurt. *Facultad de Ciencias Agropecuarias* 8(2): 8-16

Ammor S, Tauveron G, Dufour E, Chevallier I (2006) Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1—Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control* 17: 454-461

API® 50 CHL

http://www.biomerieux.com/en/search/apachesolr_search/API%2050%20CHL.

Consultado Junio 19 2013

Axelsson L (1993) Acid lactic bacteria: Classification and physiology: In: Salminen S, Von Wrigth A (Eds.) Lactic Acid Bacteria. Marcel Dekker, New York, USA, pp 1-63

Ayeni F, Sánchez B, Adeniyi B, Margolles A, Ruas-Madiedo P, Reyes-Gavilán C (2011) Evaluation of the functional potential of *Weissella* and *Lactobacillus* isolates obtained from Nigerian traditional fermented foods and cow's intestine. *International Journal of Food Microbiology* 147(2): 97-104

Babel F (1977) "Antibiosis by lactic cultures bacteria". *Journal of Dairy Science* 60: 815-821

Bertrand C, Ivanova I, Dalgalarondo M, Haertllé T (2003) Evolution of β -lactoglobulin and α -lactoalbumin content during yogurt fermentation. *International Dairy Journal* 13: 39-45

Bibel D (1988) Elie Metchnikoffs bacillus of long life. *American Society for Microbiology* 54: 661-665

Blanco M, Padola N, Kruger A, Sanz M, Blanco J, González E, Dahbi G, Mora A, Bernardez M, Echeverría A, Arroyo G, Lucchesi P, Parma A, Blanco J (2004) Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 7: 269-276

- Blanco S, Delahaye P, Fragenas N (2006) Evaluación física y nutricional de un yogurt con frutas tropicales bajo en calorías. *Revista Facultad de Agronomía* 32: 131-144
- Bouix M, Levau JY (2000) Microbiología Industrial: Los microorganismos de interés Industrial. Acubia, Zaragoza, España
- Cabeza E (2005) Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estérter para la industria láctea y cárnica. Universidad de Pamplona, Colombia
- Cabo M, Murado M, González M, Pastoriza L (2001) Effects of aeration and pH gradient on nisin production. A mathematical model. *Enzyme and Microbial Technology* 29: 264-273
- Caplice E, Fitzgerald G (1999) Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Journal of Food Microbiology* 50: 131-149
- Carrasco M, Scarinci H, Simonetta A (2002) Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from Argentinian dairy products. *Australian Journal of Dairy Technology* 57: 15-19
- Castellano P, Belfiore C, Fadda S, Vignolo G (2008) A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science* 79(3): 483 – 499
- Cástulo I, Del Campo M, Gómez H, Alaníz R (2008) Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos. *e-Gnosis* 6: 1-17
- Charteris W, Kelly P, Morelli L, Collins J (2001) Gradient diffusion antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic lactobacilli. *Journal of Food Protection* 64(12): 2007-2014
- Chavasirikunton V, Vatanyoopaisarn S, Phalakornkule C (2006) Bacteriocin-like activity from *Weissella confusa* and *Pediococcus acidilactici* isolated from traditional thai fermented sausages. *Journal of Culture Collections* 5: 64-72
- Chen H, Hower D (2003) Bacteriocins and their Food Applications. *Food Science and Food Safety* 2: 82-100
- Cintas L, Casaus M, Herranz C, Nes I, Hernández P (2001) Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Technology* 7(4): 281- 305

- Cintas L, Casaus P, Fernández F, Hernández P (1998) Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S, against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiology* 15: 289-298
- Daeschel M (1989) “Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives”. *Food technology* 43: 164-167
- Daeschel M (1998) Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservative. *Food Technology* 164-167
- De Vuyst L, Callewaer R, Crabbe K (1996) Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology* 142: 817-827
- De Vuyst L, Vandame E (1994) “Antimicrobial potential of lactic acid bacteria”. En Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and application. De Vuyst, L. y Vandame, E.J. (eds.). Chapman & Hall, Ltd. London, pp 91-142
- Díaz G, Ben N, Abriouel H, Martínez C, Gálvez A (2012) Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* by bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* EC52 in a meat sausage model system. *African Journal of Microbiology* 6(6): 1103-1108
- Elegado FB, Guerra MA, Macayan RA, Mendoza HA, Lirazan MB (2004) Spectrum of bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* BS and fingerprinting by RAPD-PCR. *International Journal of Food Microbiology* 95:11-18
- Ennahar S, Deschamps M (2000) Anti-*Listeria* effect of enterocin A, produced by cheeseisolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 88: 449–457
- Espeche M, Otero M, Sesma F, Nader-Macias M (2009) Screening of surface properties and antagonistic substances production by lactic acid bacteria isolated from the mammary gland of healthy and mastitic cows. *Veterinary Microbiology* 135: 346-357
- Estrada A, Gutiérrez L, Montoya O (2005) Evaluación *in vitro* del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus* sp. contra *Salmonella* sp. Y *Escherichia coli*. *Revista Facultad Nacional de Agricultura* 58:2601-2609

- Fath M, Kolter R (1993) "ABC transporters: bacterial exporters". *Microbiology Reviews* 57: 995-1017
- Figuroa G, Navarrete P, Caro M, Troncoso M, Gustavo Z (2002) Portación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénicos en manipuladores de alimentos. *Revista Médica de Chile* 130: 859-64
- Fiorentini A, Santanna E, Porto A, Mazo J, Franco B (2001) Influence of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* bn in the shelf-life of refrigerated bovine meat, Brazilian. *Journal of Microbiology* 32: 42-46
- Fremaux C, Anh C, Klaenhammer T (1993) "Molecular analyses of the lactacin F operon". *Applied and Environmental Microbiology* 59: 3906-3915
- Friedrich-Karl L (2000) Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science* 56: 105-115
- Gálvez H, Abriouel H, López R, Ben Omar N (2007) Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology* 120: 51-70
- Giraud E, Champalier A, Raimbault M (1994) Degradation the raw starch by a wild amyolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 60(12): 4319-4323
- Gómez S, Guzmán D (1999) Efecto antagónico de BAL autóctonas del Huila sobre *Salmonella enteritidis* aviar. Tesis de pregrado. Facultad de ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia
- González S, Apella M, Romero N, Nader de Macías M, Oliver G (1993) Inhibition of enteropathogens by lactobacilli strains used in fermented milk. *Journal of Food Protection* 56: 773-776
- Gutiérrez L, Montoya O, Ruiz S (2005) Evaluación del potencial Bactericida de los extractos de Bacterias Acido Lácticas Sobre el crecimiento *in vitro* de *E.coli*, *Salmonella* sp y *Listeria monocytogenes*. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 36: 1-6
- Havarstein L, Diep D, Nes I (1995) "A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export". *Molecular Microbiology* 16: 229-240

- Henderson J, Chopco A, Van Wassenaar P (1992) Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC1 0. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 295: 5-12
- Hernández A, Robles V, Angulo J, De la Cruz O, García J (2007) Preparation of a whey-based probiotic product with *Lactobacillus reuteri* and *Bifidobacterium bifidum*. *Food Technology and Biotechnology* 45: 27-31
- Hueppe F (1884) Milchsäurebazillus syn. Bactenium acidi lactici. *Zopf Mitt Kaiserl Gesundheitsamt* 2: 337-340
- Hugas M (1998) Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Science* 49 (1):139-150
- Incze K (1998) Dry fermented sausages. *Meat Science* 49(1): 169-177
- Instituto nacional de salud. ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS, HASTA EL PERIODO EPIDEMIOLÓGICO 13 DEL AÑO 2010. <http://www.ins.gov.co/Busqueda/results.aspx?k=ETA> Consultado el 20 de marzo de 2013.
- Joerger R (2003) Alternatives to Antibiotics: Bacteriocins, Antimicrobial Peptides and Bacteriophages. *Poultry Science* 82: 640-647
- Jurado H, Montalvo C, Ramírez C, Bolivar G (2009) Efecto de Bioconservación de Carne Molida de Cerdo, Tipo Hamburguesa con *Lactobacillus acidophilus* cepa ATCC 4356 y *Staphylococcus carnosus* NRRLO2. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 16(16): 1-10
- Kalmokoff M, Daley E, Austin J, Farber J (1999) Bacteriocin-like inhibitory activities among various species of *Listeria*. *International Journal of Food Microbiology* 50: 191–201
- Katikou P, Ambrosiadis I, Georgantelis D, Koidis P, Georgakis S (2005) Effect of *Lactobacillus*-protective cultures with bacteriocin-like inhibitory substances producing ability on microbiological, chemical and sensory changes during storage of refrigerated vacuum-packaged sliced beef. *Journal of Applied Microbiology* 99: 1303-1313
- Klaenhammer T (1993) “Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria”. *FEMS Microbiology Reviews* 12: 39-86

- Kociubinski G, Pérez P, Añón M, De Antoni G (1996) A Method of Screening for Highly Inhibitory Lactic Acid Bacteria. *Journal of Food Protection* 59: 739-745
- Koneman E (2008) Diagnóstico microbiológico texto y atlas color. Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina
- Konisky J (1982) “Colicins and other bacteriocins with established mode of action”. *Annual Review of Microbiology* 36: 125-144
- Kulwichit W, Nilgate S, Chatsuwan T, Krajiw S, Unhasuta C, Chongthaleong A (2007) Accuracies of *Leuconostoc* phenotypic identification: a comparison of API systems and conventional phenotypic assays. *BMC Infectious Diseases* 7: 69-77
- Le Loir Y, Baron F, Gautier M (2003) *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research* 2: 63-76
- Lewus C, Montville T (1991) Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 13(2): 145-150
- Lindgren S, Dobrogosz W (1990) Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews* 87: 149-164
- Lozano J, Meyer J, Sletten K, Pelaz C, Ness I (1992) Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Journal of General Microbiology* 138: 1985-1990
- MacFaddin F (2003) Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina
- Manfredi E, Leotta G, Rivas M (2010) PCR múltiple para la detección de los genes SEA, SEB, SEC, SED y SEE de *Staphylococcus aureus*. Caracterización de aislamientos de origen alimentario. *Revista Argentina de Microbiología* 42: 212-215
- Marugg J, González C, Kunka B, Ledebor A, Pucci M, Toonen M, Wlaker S, Zoetmulder L, Vanderbergh P (1992) “Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0”. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 2360-2367
- McKay L, Baldwin K (1990) “Applications for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria”. *FEMS Microbiology Reviews* 87: 3-14

meat small-scale facility 1-Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control* 17: 454-461

Minor H, Ponce E, Macías S, Guerrero I (2002) Conservación de la Carne Fresca de Cerdo por Fermentación Láctica. Efecto Sobre el Color, la Textura y la Formación de los Ácidos Grasos Libres. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 1: 72–80

Mital B, Satyendra K (1995) Anticarcinogenic, hipocholesterolemic and antagonistic activities of *Lactobacillus acidophilus*. *Critical Reviews in Microbiology* 21(3): 175-214

Moll G, Konings N, Driessen A (1999) Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 185-198

Monroy M, Castro T, Fernández F, Mayorga L (2009) Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *Contactos* 73: 63-72

Motta S, Brandelli A (2008) Evaluation of environmental conditions for production of bacteriocin-like substance by *Bacillus* sp. Strain P34. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 641-646

Muller D, Carrasco M, Tonarelli G, Simonetta A (2009) Characterization and purification of a new bacteriocin with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus plantarum* Lp 31 strain isolated from dry-fermented sausage. *Journal of Applied Microbiology* 106: 2031-2040

Muriana P (1996) Bacteriocins for control of *Listeria* spp in food. *International Journal of Food Microbiology* 59: 54–63

Murry A, Hinton A, Morrison H (2004) Inhibition of growth of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Clostridium perfringens* on chicken feed media by *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Poultry Science* 3: 603-607

Noonpakdee W, Santivarangkna C, Jumriangrit P, Sonomoto K, Panyim S (2003) Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage. *International Journal of Food Microbiology* 81: 137–145

O'Sullivan L, Ross R, Hill C (2002) Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* 84: 593-604

Orla-Jencen S (1924) La Classification des Bactéries Lactiques. *Lait* 4(36): 468-474

- Oteiza J, Chinen I, Miliwebsky E, Rivas M (2006) Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from precooked sausages (morcillas). *Food Microbiology* 23: 283–288
- Pal A, Ramana K (2009) Isolation and preliminary characterization of a nonbacteriocin antimicrobial compound from *Weissella paramesenteroides* DFR-8 isolated from cucumber (*Cucumis sativus*). *Process Biochemistry* 44: 499-503
- Pal A, Ramana K, Bawa A (2010) Simplification and optimization of deMan Rogosa Sharpe (MRS) medium for enhanced production of bacteriocin by *Weissella paramesenteroides* DFR-8. *Journal of Food Science and Technology* 47(3): 258-265
- Papagianni M (2003) Ribosomally synthesized peptides and antimicrobial properties: Biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnology Advances* 21: 465-499
- Papagianni M (2012) Effects of dissolved oxygen and pH levels on weissellin A production by *Weissella paramesenteroides* DX in fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 35: 1035-1041
- Papagianni M, Papamichael E (2011) Purification, amino acid sequence and characterization of the class IIa bacteriocin weissellin A, produced by *Weissella paramesenteroides* DX. *Bioresource Technology* 102: 6730-6734
- Parente E, Ricciardi A (1999) Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52: 628-638
- Parra R (2010) Bacterias Ácido Lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Facultad de Ciencias Agropecuarias* 8(1): 93-105
- Piard J, Desmazeaud M (1991) “Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Oxygen metabolites and catabolism end-products”. *Lait* 71: 525-541
- Piard J, Desmazeaud M (1992) “Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Bacteriocins and other antibacterial substances”. *Lait* 72: 113-142
- Rantsiou K, Drosinos E, Gialitaki M, Urso R, Krommer J, Reichardt J, Toth S, Metxopoulos I, Comi G, Cocolin L (2005) Molecular characterization of *Lactobacillus* species isolated from naturally fermented sausages produced in Greece, Hungary and Italy. *Food Microbiology* 22: 19-28

- Rao M, Pintado J, Stevens W, Guyot J (2004) Kinetic growth parameters of different amylolytic and non-amylolytic *Lactobacillus* strains under various salt and pH conditions. *Bioresource Technology* 94(3): 331-337
- Rivera C, Vanegas M (2007) Inhibición de *Listeria monocytogenes* con Bacterias Ácido Lácticas productoras de Bacteriocinas. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 12(12): 1-5
- Rodríguez J, Cintas L, Casaus P, Horn N, Dodd H, Hernández P (1995) Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from dry fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology* 78: 109–115
- Rodríguez J, Martínez I, Kok J (2002) Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 42: 91-121
- Rodríguez M, Silvera M (1997) Efecto antagónico de bacterias ácido lácticas aisladas de Cundinamarca a partir de productos artesanales frente a *Salmonella enteritidis* aviar. Tesis pregrado. Facultad de ciencias. Pontificia universidad javeriana, Colombia
- Rogers L (1928) The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Bacteriology* 16: 321-325
- Rojas C, Vargas P (2008) Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria. *Tecnología en Marcha* 21(2): 9-16
- Ross G, González S, Gusils C (2007) Caracterización de una sustancia inhibitoria tipo bacteriocina producida por *Lactobacillus salivarius* subs. *salivarius*. *Alimentación Latinoamericana* 269: 72-77
- Rouse S, Sun F, Vaughan A, Van Sinderen D (2007) High-Throughput Isolation of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria, with Potential Application in the Brewing Industry. *Journal of The Institute of Brewing* 113(3): 256–262
- Rubio A, Hernández M, Aguirre A, Poutou R (2008) Identificación Preliminar *in vitro* de Propiedades Probióticas en cepas de *S. cerevisiae*. *Revista MVZ Córdoba* 13(1): 1157-1169
- Savadogo A, Cheik Ouattara A, Bassole H, Traore S (2006) Bacteriocins and lactic acid bacteria. *African Journal of Biotechnology* 5: 678-683

- Schillinger U, Lucke F (1989) Einsatz von Milchsäurebakterien als Schutzkulturen bei Fleischerzeugnissen. *Fleischwirtschaft* 69: 879-882
- Serna L, Valencia L, Campos R (2010) Cinética de fermentación y acción antimicrobiana de *Weissella confusa* contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*. *Revista de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Antioquia* 55: 55-65
- Serna L, Valencia L, Campos R (2011) Bacterias Ácido Lácticas con Actividad Antimicrobiana contra Patógenos Causantes de Mastitis Bovina. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 9(1): 97-104
- Simonetta A, Moragues L, Frisón L (1997) Antibacterial activity of enterococci strains against *Vibrio cholerae*. *Letters in Applied Microbiology* 24: 139-143
- Sriornual S, Yanagida F, Lin L, Hsiao K, Chen Y (2007) Weissellicin 110, a Newly Discovered Bacteriocin from *Weissella cibaria* 110, Isolated from Pla-Som, a Fermented Fish Product from Thailand. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 2247-2250
- Stoddard G, Petzel J, Van Belkum M, Kok J, McKay L (1992) "Molecular analyses of the lactococcin A gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* WM4". *Applied and Environmental Microbiology* 58: 1952-1961
- Sung Cho G, Ki Do H (2006) Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from a Traditional Jeotgal Product in Korea. *Ocean Science Journal* 41(2): 113-119
- Tagg J, Dajani A, Wannamaker L (1976) Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Bacteriology Review* 40: 722-756
- Todorov SD, Rachman C, Fourrier A, Dicks LM, van Reenen CA, Prévost H, Dousset X (2010) Characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* R1333 isolated from smoked salmon. *Anaerobe* 17(1):23-31
- Työppönen S, Petäjä E, Mattila-Sandholm T (2003) Bioprotective and probiotics for dry sausages. *International Journal of Food Microbiology* 83: 233-244
- Universidad Nacional de Colombia (2002) Práctica de Fermentación. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química, Bogotá, Colombia

- Vallejo M, Olivera N, Sequeiros C, Marguet E (2009) Actividad antilisteria de bacterias ácido lácticas aisladas de peces marinos. *Analecta Veterinaria* 29(2): 19-23
- Vargas E, Gómez C, Parra M, Romero M (2004) Producción de Microorganismos Probióticos como Aditivo para Alimentos Concentrados para Ganado Vacuno (Primera Parte). *Revista de Ingeniería* 19: 1-11
- Vasek O, Martínez M, Cardozo M (2008) Antagonismo de bacterias lácticas de Corrientes y patógenos aislados de lechuga fresca, efecto de *Lactobacillus plantarum* 59b y 93b VCOR. *Comunicaciones científicas y tecnológicas* 6:1-8
- Vásquez S, Suárez H, Zapata S (2009) Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición* 36(1): 64-71
- Vaughan E, Heilig H, Ben-Amor K, De Vos W (2005) Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 477-490
- Vinderola C, Reinheimer J (2003) Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative in vitro study of probiótica characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International* 36: 895-904
- Yousef I, Lloyd B (2008) Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* sp. *tolerans* isolated from a sourdough bread culture. *International Journal of Food Microbiology* 121:112–115
- Zhong W, Millsap K, Bialkowska-Hobrazanska H, Reid G (1998) Differentiation of *Lactobacillus* species by molecular typing. *Applied and Environmental Microbiology* 64(7): 2418-2423

9. ANEXOS

ANEXO 1. Rótulo de codificación de muestras de productos cárnicos madurados artesanalmente.

Descripción de la Muestra _____

Tipo de Muestra _____

Codificación _____

Fecha de Muestreo _____

Hora toma de la Muestra _____

Hora del Análisis _____

Encargado de la toma de la muestra _____

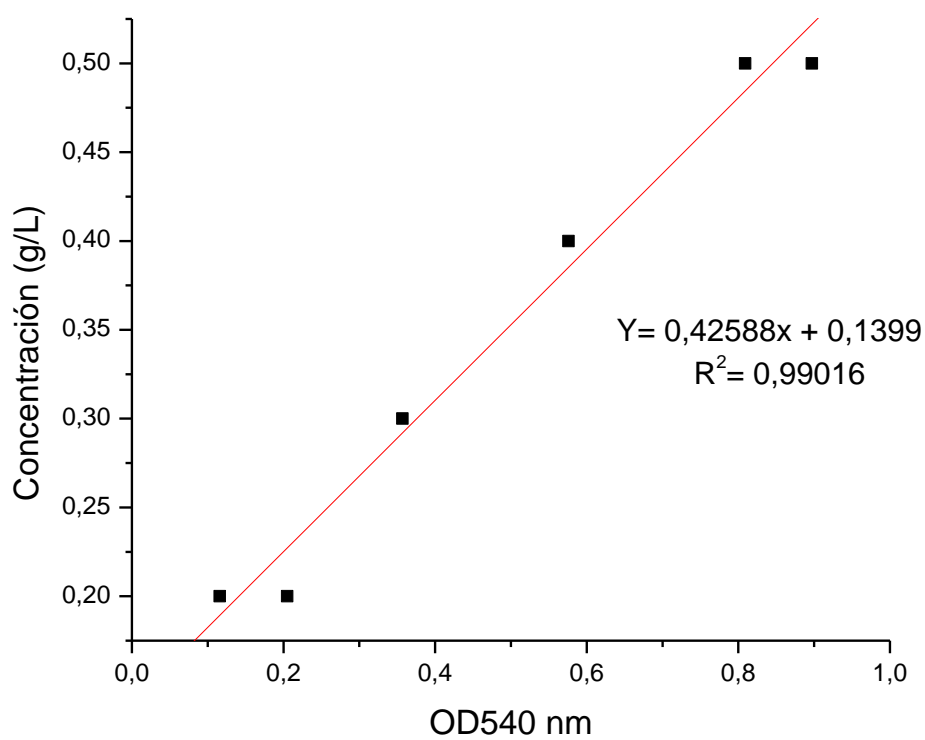
Analista(s): _____

Observaciones:

ANEXO 2. Curva Patrón de Peso Seco

Dln	Abs 540nm	Volumen de muestra (mL)	Volumen diluyente (mL)	Volumen final (mL)	Concentración final (g/L)
1/2	0,897	0,5	0,5	1	0,5
1/2,2	0,809	0,5	0,6	1,1	0,5
1/3	0,576	0,5	1	1,5	0,4
1/4	0,357	0,5	1,5	2	0,3
1/5	0,205	0,5	2	2,5	0,2
1/6	0,116	0,5	2,5	3	0,2

Tubos células	0,1138	g
Tubos S.S	0,1033	g
Concentración inicial	0,0105	g/10mL
	1,05	g/L



ANEXO 3. Construcción de la Curva Patrón de Peso Seco

(Universidad Nacional de Colombia, 2002)

- Determinar el promedio del peso de los 10 tubos que contienen las células y el de los 1 tubos que contienen la solución salina.
- Calcular la diferencia de peso entre el promedio de los tubos con células y los tubos con solución salina.
- Expresar la concentración en gramos de biomasa seca por litro de solución (g biomasa seca/L).
- A partir de la solución concentrada realizar diluciones (por triplicado) con el fin de ajustar las lecturas de absorbancia en el intervalo de 0,2 – 0,8.
- Calcular las concentraciones finales para las respectivas diluciones.
- Graficar Absorbancias promedio en función de concentración celular en gramos de biomasa seca por litro de solución (g biomasa seca/L).
- Obtener la ecuación: $ABS = m \cdot C + b$; donde m es la pendiente, C la concentración (g biomasa seca/L) y b el punto de corte con el eje Y.
- Muestra de la fermentación: Tomar 10ml de cultivo, hacer tres lavados con centrifugación a 2250g por 20 minutos cada una. Resuspender siempre a 10ml con solución salina (0,85% p/v). Agitar y leer absorbancia. Si la absorbancia es mayor a 0,8, hacer dilución y tenerla en cuenta para los cálculos de concentración por la ecuación encontrada.

