

**EFFECTO DE LA NISINA SOBRE *Staphylococcus aureus* AISLADO
EN QUESO COSTEÑO COMERCIALIZADO EN EL MUNICIPIO
DE MONTERÍA**



**AUTOR:
DORIA ESPITIA MARÍA ALEJANDRA
HODEG PEÑA VANESSA**

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE INGENIERÍA
PROGRAMA DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS
BERASTEGUI
2015**

**EFFECTO DE LA NISINA SOBRE *Staphylococcus aureus* AISLADO
EN QUESO COSTEÑO COMERCIALIZADO EN EL MUNICIPIO
DE MONTERÍA**



AUTOR:

**DORIA ESPITIA MARÍA ALEJANDRA
HODEG PEÑA VANESSA**

DIRECTOR

MSc. BEATRIZ ÁLVAREZ BADEL

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE INGENIERÍA
PROGRAMA DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS
BERASTEGUI**

2015

RESPONSABILIDAD DEL AUTOR

La responsabilidad ética, legal y científica de las ideas, conceptos y resultados del proyecto serán responsabilidad de los autores.

Artículo 61, acuerdo N°093 del 26 de Noviembre del 2002 del Consejo Superior

NOTA DE ACEPTACIÓN

Jurado: Yenis Patrana Puche

Jurado: Margarita Arteaga Márquez

DEDICATORIAS

A DIOS quien me dio la fe, la fortaleza, y la salud para culminar este trabajo.

A mis PADRES por su apoyo incondicional, por sus consejos, motivación constante, por los valores inculcados, y sobre todas las cosas por su amor infinito.

A mi compañera y amiga VANESSA por tu fe y porque nunca dudaste que se lograría este triunfo, Te quiero mucho.

A mi tutora BEATRIZ ÁLVAREZ por su gran apoyo para la culminación de nuestros estudios profesionales y para la elaboración de este trabajo.

Finalmente a todos y cada una de las personas que formaron parte en todos estos años de formación.

Con todo mi cariño... Alejandra

A DIOS y a la VIRGEN que me acompañan en cada paso que doy. En sus manos mi futuro.

A mi fortaleza y ejemplo, mis PADRES, mi más grande regalo de amor; Gracias por sus esfuerzos, amor incondicional, confianza y apoyo en cada reto emprendido. Debo a ustedes todo lo que soy.

A la profesora BEATRIZ y mi gran amiga ALEJANDRA, que fueron mi compañía, sostén, aliento. Gracias por todo lo aprendido y construido en

este tiempo, sin su esfuerzo, dedicación, tiempo y conocimiento no se hubiera alcanzado esta meta. En mi corazón por siempre.

A mi ALMA MÁTER y todos los profesores, compañeros, funcionarios y trabajadores que hacen parte de ella, les debo mi formación y muchas de las cosas que son parte de mí hoy en día. GRACIAS UNICOR.

GRACIAS TOTALES Vanessa

AGRADECIMIENTOS

A DIOS por guiarnos de su mano hasta el final de la meta.

A nuestros PADRES por su apoyo y entrega. Son nuestro mayor ejemplo.

A nuestra directora BEATRIZ ALVAREZ BADEL por brindarnos orientación y enseñanza. Gracias por creer en nosotras.

Al INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL TRÓPICO, al GRUPO DE INVESTIGACIONES MICROBIOLOÓGICAS Y BIOMEDICAS DE CÓRDOBA y al LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA, en cabeza de sus directores. Gracias por sus valiosos aportes.

A los compañeros del Laboratorio de Investigación de Microbiología de Alimentos CRISTIAN y LILI; GRACIAS TOTALES. Y a todos aquellos amigos, estudiantes y funcionarios, que de alguna forma contribuyeron a la culminación de este trabajo.

Vane y Aleja

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 INOCUIDAD EN LOS ALIMENTOS	3
2.1.1. Enfermedades transmitidas por alimentos	4
2.2 Género <i>Staphylococcus</i>	4
2.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	5
2.3. QUESOS.....	6
2.3.1. Queso costeño	6
2.3.1.1 Calidad microbiológica del queso costeño	7
2.3.1.2 Microorganismos del queso	8
2.3.1.3 Antecedentes de <i>S. aureus</i> en queso costeño.....	8
2.4 CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA (CMI)	9
2.5 NISINA	10
2.5.1 Antecedentes de nisina en quesos	11
2.6 PRUEBAS SENSORIALES	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN	13
3.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	13

3.2.1 Recolección de muestras de queso costeño	13
3.2.1.2 Preparación de la muestra y aislamiento de <i>S. aureus</i>	14
3.3 SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>S. aureus</i>	14
3.4 DETERMINACIÓN DE LA CMI DE LA NISINA SOBRE LAS CEPAS DE <i>S. aureus</i> AISLADO DE QUESO COSTEÑO	15
3.4.1 Patrón 0,5 de McFarland y preparación del inculo	15
3.4.2 Aplicación de CMI	16
3.5 EVALUACIÓN DE LA NISINA EN LA ELABORACIÓN DE QUESO COSTEÑO	17
3.6 APLICACIÓN DE PRUEBA TRIANGULAR.....	18
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
4.1 AISLAMIENTO, SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>S. aureus</i> A PARTIR DE QUESO COSTEÑO.....	19
4.2. DETERMINACIÓN DE LA CMI SOBRE CEPAS DE <i>S. aureus</i> AISLADO EN QUESO COSTEÑO	21
4.2.1 Curva de letalidad	22
4.3 EVALUACIÓN DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NISINA EN LA ELABORACIÓN DE QUESO COSTEÑO.	25
4.4 APLICACIÓN DE PRUEBA TRIANGULAR EN EL QUESO COSTEÑO TRADICIONAL Y EL QUESO COSTEÑO ELABORADO CON NISINA	33
5. CONCLUSIONES	35
6. RECOMENDACIONES	36
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

LISTA DE TABLAS

Tabla N°1. Requisitos microbiológicos del queso fresco.....8

Tabla N°2. Preparación de las distintas concentraciones de nisina para la determinación de CMI16

Tabla N°3: Preparación de las concentraciones de nisina empleadas en la construcción de la curva de letalidad.

Tabla N°4 Concentraciones de nisina utilizadas en los diferentes tratamientos empleados para la elaboración de queso costeño tradicional y con adición de nisina.

Tabla N°5. Tasa de letalidad y tiempo de reducción de la población de *S. aureus* para las concentraciones de nisina evaluadas.....25

Tabla N° 6: Características fisicoquímicas de la leche cruda.....25

Tabla N°7: Promedios de recuentos de *S. aureus* en UFC/g para los diferentes tratamientos evaluados, en el tiempo de 0 y 24 horas.....26

Tabla N°8: Análisis de varianza para recuento de *S. aureus* en los diferentes tratamientos aplicados al tiempo de 0 horas de almacenamiento.....28

Tabla N°9: Análisis de varianza para recuento de *S. aureus* en los diferentes tratamientos aplicados al tiempo de 24 horas de almacenamiento.....28

Tabla N° 10: Comparación de medias por test de Duncan para el promedio del recuento de *S. aureus* de los lotes a las 0 horas de almacenamiento.....30

Tabla N° 11: Comparación de medias por test de Duncan para el promedio del recuento de *S. aureus* de los lotes a 24 horas de almacenamiento.....31

LISTA DE FIGURAS

- Gráfico N°1:** Curva de letalidad *S. aureus* frente a la nisina en UFC/mL vs tiempo en horas para: ½ CMI, CMI, 2xCMI y 4xCMI.....22
- Gráfico N°2:** Número de células sobrevivientes (Log UFC/mL) vs el tiempo en horas.....23
- Gráfico N°3:** Promedio del *S. aureus* para las concentraciones de nisina y control en los tiempos de almacenamiento.....33
- Gráfico N° 4:**Diagrama de dispersión de medias para los lotes A, B y C en el recuento al tiempo de cero horas.....55
- Gráfico N° 5:**Diagrama de dispersión de medias para los lotes A, B y C en el recuento del tiempo 24 horas.....55

LISTA DE ANEXOS

Anexo A: Listado distribuidoras oficiales de queso Costeño en el municipio de Montería. Cámara de Comercio de Montería.....	47
Anexo B: Diagrama de flujo proceso de elaboración de queso costeño.....	48
Anexo C: Formato de evaluación: Prueba Triangular.....	49
Anexo D: Número mínimo de juzgamientos correctos para establecer significancia en distintos niveles probabilidad para la prueba triangular (una cola, $p = 1/3$).....	50
Anexo E: Aislamiento e identificación de <i>S. aureus</i> para 3 de las comercializadora estudiadas.....	51
Anexo F: Anexo F: <i>Resultados</i> PCR para la detección del gen <i>Nuc</i> de <i>S. aureus</i> .	
Anexo G: <i>Resultados CMI para ensayo N° 1 concentraciones de nisina de 100, 200, 500,1000, 1500, y 2000 UI/mL</i> Anexo H: Preparación de las distintas concentraciones de nisina para la determinación de CMI 2 ^{do} ensayo...	
.....	54
Anexo I: Resultados CMI para ensayo N° 2 concentraciones de nisina de 500, 625, 750, 875,1000 y 11250 UI/mL.....	

Anexo J: Diagrama de dispersión de los recuentos de *S. aureus* en los tiempos de almacenamiento 0 y 24 horas.....55

Anexo K: Resultados catadores no entrenados en prueba triangular...56

RESUMEN

La nisina es una bacteriocina reconocida como GRAS (Generally recognized as safety) desde 1988 por la FDA, es producida por *Lactococcus lactis subsp lactis* e inhibe el crecimiento de microorganismos Gram - positivos como *Staphylococcus aureus*; es una alternativa como antimicrobiano natural en matrices alimentarias para disminuir la carga microbiana durante los procesos de elaboración. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la nisina a través de la técnica de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) sobre *S. aureus* aislado del queso costeño comercializado en queseras oficialmente registradas en el municipio de Montería – Córdoba. Se evaluó el poder antimicrobiano de la nisina mediante la técnica CMI modificada de Taroco *et al.* (2003) sobre cepas de *S. aureus* aisladas de queso costeño obtenido de 9 comercializadoras registradas en el Municipio de Montería. Luego de determinar la CMI, se elaboraron en la Planta Piloto del Programa de Ingeniería de Alimentos de la Universidad de Córdoba 9 lotes de queso costeño, 3 de ellos fueron elaborados de forma tradicional (control), 3 lotes con nisina a 500UI/Kg de queso y por último 3 más con nisina a 625UI/Kg de queso. A todos los quesos costenos elaborados se les determinó *S. aureus* según Holguín *et al.* (1998), en tiempo 0 y a las 24 horas de almacenamiento; se estableció un diseño completamente al azar con 57 unidades experimentales para los dos tiempos de almacenamiento. Se realizó una prueba triangular con panel de 40 catadores para determinar diferencias sensoriales entre el queso costeño tradicional y con adición de nisina. Se determinó que el queso costeño

comercializado en el municipio de Montería – Córdoba, presenta contaminación por *S. aureus*; la CMI de nisina sobre las cepas de *S. aureus* fue de 500 UI/mL. En la incorporación de la nisina en la elaboración del queso costeño se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de los tratamientos con nisina y el control (queso sin nisina), se observó que la nisina tras 24 horas redujo de 2.3 ciclos logarítmicos para concentración de 500UI/Kg y 1.9 ciclos logarítmicos para 625UI/Kg. La concentración de 500UI/Kg, no representa diferencia en las propiedades sensoriales del producto con relación al producto convencional. Se concluye que la nisina a 500UI/mL inhibe al *S. aureus* aislado del queso costeño comercializado en el municipio de Montería- Córdoba.

Palabras Claves: Bacteriocinas, Concentración Mínima Inhibitoria, matriz alimentaria.



ABSTRACT

Nisin is a bacteriocin recognized as GRAS (Generally Recognized as safety) by the FDA in 1988, it is produced by *Lactococcus lactis* subsp *lactis* and inhibits the growth of Gram - positive and *Staphylococcus aureus*; it is an alternative as natural antimicrobial in food to reduce the microbial load during the manufacturing process matrices. The aim of this study was to evaluate the effect of nisin through the technique of minimum inhibitory concentration (CMI) of *S. aureus* isolated from "costeño" cheese marketed in officially registered in the city of Monteria - Cordoba. The antimicrobial power of nisin was assessed using the modified technique Taroco WCC *et al.* (2003) on *S. aureus* strains isolated from "costeño" cheese obtained 9 traders registered in the city of Monteria. After determining the CMI, they were developed in the Pilot Plant Program of Food Engineering at the University of Córdoba 9 lots of "costeño" cheese, 3 of them were made in the traditional way (control), 3 lots with nisin to 500UI/Kg cheese and finally three more nisin to 625UI/Kg cheese. All "costeño" processed cheese *S. aureus* were determined according Holguin *et al.* (1998), at time 0 and 24 hours of storage; a completely randomized design with 57 experimental units for both established storage times. A triangular test was conducted with panel of 40 tasters to determine sensory differences between traditional "costeño" cheese and adding nisin. It was determined that the "costeño" cheese marketed in the city of Monteria - Cordoba, presented by *S. aureus*

contamination; the CMI of nisin on *S. aureus* strains was 500 UI/mL. The incorporation of nisin in the development of “costeño” cheese statistically significant differences between treatments counts nisin and control (cheese without nisin) were found that nisin was observed after 24 hours decreased from 2.3 log units for concentration 500UI/Kg and 1.9 log units for 625UI/Kg. The concentration of 500UI/Kg makes no difference in the sensory properties of the product relative to the conventional product. It is concluded that nisin to 500UI/mL inhibits *S. aureus* isolated from “costeño” cheese marketed in the city of Córdoba Montería-.

Keywords: Bacteriocins, Minimum Inhibitory Concentration, Food Matrix.

1. INTRODUCCIÓN

La producción de leche en Colombia según Fedegán (2014), para el año 2014 fue de 6573 millones de litros, de los cuales, aproximadamente el 20% fueron procesados por la industria en la fabricación de quesos. Se destaca que el departamento de Córdoba es considerado zona ganadera por excelencia; por lo que de acuerdo a la Encuesta Nacional Agropecuaria del 2013, en el departamento se estimó una producción de 2.537.163 litros diarios, de los cuales 1.576.595 se destinaron a la industria de alimentos (ENA 2013).

El queso costeño consumido en Córdoba se prepara con leche cruda sin ningún tipo de conservante, convirtiéndolo en un producto con alto riesgo de contaminación en su fabricación; por ello es vector de bacterias productoras de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) como *Staphylococcus aureus*, *Listeria Monocytogenes*, *Brucella spp*, *Salmonella spp.* y *Mycobacterium spp.*, entre otras (Cortecero y Benítez 2011). Para plantear una alternativa ante este problema de salud pública, se estudiará el efecto antimicrobiano del conservante natural “nisina” mediante la aplicación de la técnica CMI sobre cepas de *S. aureus* aislado de queso costeño comercializado en el municipio de Montería – Córdoba. *S. aureus* es una bacteria gram- positiva, anaerobio facultativo, formador de esporas no esféricas que pertenece al género *Staphylococcus*, se agrupa en racimos, con colonia con pigmento dorado, amarilla y algunas veces blanca, produce enterotoxina estafilocócica (SE) y es responsable de casi todos los casos de envenenamiento alimenticio por estafilococo (Montville y Matthews 2008).

La nisina tiene muchas ventajas sobre otros conservadores de alimentos, tales como, ausencia de toxicidad, se inactiva naturalmente por las enzimas del tracto digestivo, estabilidad al calor a bajo pH, ausencia de color, no produce cambios en las características organolépticas de los alimentos (Sierra Lopera 2012). Su uso en productos lácteos se permite en más de 50 países (Gálvez *et al* 2007), es altamente utilizada para la conservación de productos lácteos, cárnicos, comidas en lata, cerveza, vinos y alimentos de origen vegetal (Broughton 2008), siendo una excelente alternativa para inhibir crecimiento de *S. aureus* en el queso costeño. Esta bacteriocina tiene una amplia historia de uso seguro en alimentos y se ha documentado su efectividad en contra de agentes patógenos gram- positivos y microorganismos deteriorativos (Aymerich *et al.* 2008).

La seguridad y estabilidad en la composición microbiológica de la mayoría de los alimentos, es de suma importancia, por esto el afán de descubrir e implementar diversos métodos de conservación que garanticen a la población el consumo de alimentos inocuos.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 INOCUIDAD EN ALIMENTOS

La inocuidad de los alimentos puede definirse como el conjunto de condiciones y medidas necesarias durante la producción, elaboración, almacenamiento, distribución y preparación de los alimentos para asegurar que, una vez ingeridos no representen un riesgo apreciable para la salud. La Inocuidad como atributo de calidad permite dar garantía al consumidor de que el alimento no genere peligros al consumidor, ya sea microbiológica, física o químicamente (Mc Allister 2009). Dentro del concepto de inocuidad es necesario referirse a los llamados peligros como: agentes biológicos, químicos, físicos que pueden afectar la salud. Para asegurar la inocuidad del queso y otros productos derivados de la leche, se requiere una evaluación de los peligros y sus métodos de control, requiriéndose la utilización de Buenas Prácticas de Manufactura- BPM- y los sistemas de gestión de calidad como el Sistema HACCP y las normas ISO 9000, ISO 22000 y la GFSI (Castillo y Chaves 2008).

La inocuidad de los alimentos engloba acciones encaminadas a garantizar la máxima seguridad posible de los alimentos. Las políticas y actividades que persiguen dicho fin deberán de abarcar toda la cadena alimenticia, desde la producción al consumo. Por lo anterior esta se considera una responsabilidad conjunta del gobierno, la industria y los consumidores, en donde el gobierno cumple la función de eje de esta relación al crear las condiciones ambientales y el marco legislativo (reglamentos y directrices)

necesarios para regular las actividades de la industria alimentaria considerando el interés de todos (Arispe y Tapia 2007).

2.1.1 Enfermedades transmitidas por alimentos

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS 2002), las enfermedades transmitidas por alimentos se definen como «El conjunto de síntomas originados por la ingestión de agua y/o alimentos que contengan agentes biológicos (p. ej., bacterias o parásitos) o no biológicos (p. ej., plaguicidas o metales pesados) en cantidades tales que afectan la salud del consumidor en forma aguda o crónica, a nivel individual o de grupo de personas» (FAO; OMS 2005).

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) son un tema de preocupación mundial expandida y creciente en salud pública, pueden generarse a partir de un alimento o de agua contaminada. Son llamadas así porque el alimento actúa como vehículo de transmisión y se presentan por la presencia de microorganismos dañinos y sustancias tóxicas. (Bayona 2009). La OMS ha notificado a estos microorganismos como los principales patógenos (*Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *E coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Toxoplasma gondii*) (FAO, 2005).

2.2 Género *Staphylococcus*

El género *Staphylococcus* incluye actualmente 42 especies diferentes. Las bacterias pertenecientes a este género se caracterizan por ser cocos (bacterias de forma esférica) Gram-positivas, de 0,5 a 1,5 μm de diámetro, agrupadas en forma de racimo. Algunas de ellas forman parte de la flora microbiana normal de la piel y mucosa en humanos y otras se encuentran sólo entre la flora de animales mamíferos y aves. Por lo

general, cada especie tiende a ocupar una localización anatómica específica en el huésped que coloniza (Pahissa 2009).

Los estafilococos son bacterias inmóviles, no forman esporas generalmente no poseen cápsula y salvo raras excepciones son anaerobias facultativas. Por lo común, no requieren medios enriquecidos para crecer, aunque algunas cepas excepcionales necesitan la presencia de CO₂ o factores de enriquecimiento como hemina y menadiona para su desarrollo. La mayoría de las especies producen catalasa, una enzima que permite desdoblarse el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en H₂O y oxígeno libre. Esta característica se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus* (catalasa positivo) de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*, que no producen esta enzima (catalasa negativos) (Cervantes *et al* 2014).

2.2.1 *Staphylococcus aureus*

S. aureus es una bacteria Gram - positiva, anaerobio facultativo, formador de esporas no esféricas que pertenece al género *Staphylococcus*, se agrupa en racimos, de colonia con pigmento dorado, amarilla y a veces blanca; el *S. aureus* produce enterotoxina estafilocócica (SE) y es responsable de casi todos los casos de envenenamiento alimenticio por estafilococo (Montville y Matthews 2008).

El crecimiento y la supervivencia de *S. aureus* dependen de un número de factores ambientales tales como la temperatura, la actividad de agua (Aw), el pH, la presencia de oxígeno y la composición de los alimentos. Estos parámetros de crecimiento físicos varían para diferentes cepas de *S. aureus* (Stewart 2003).

El rango de temperatura para el crecimiento del *S. aureus* es de 7 - 48 ° C, con un óptimo de 37°C. Es resistente a la congelación y sobrevive bien en

los alimentos almacenados por debajo de -20°C , sin embargo, se reduce a temperaturas de entre -10 y 0°C . El crecimiento de *S. aureus* se produce en el intervalo de pH de 4,0 - 10,0 con un óptimo de 6 - 7 (Dos Santos 2007).

Su metabolismo es oxidativo / fermentativo, es catalasa positivo y puede metabolizar una gran variedad de carbohidratos en condiciones aeróbicas, con la subsecuente liberación de ácido, principalmente ácido acético. Los alimentos contaminados con esta cantidad de bacterias, no presentan ninguna diferencia perceptible. En la actualidad existen varios métodos convencionales y rápidos disponibles para la detección e identificación de *S. aureus* en muestras de alimentos y en muestras procedentes de listeriosis animal. En Colombia se detecta mediante prueba de coagulasa positiva por medio de recuento en placa y confirmación con prueba de catalasa (Stewart 2003).

2.3 QUESO

Producto obtenido por coagulación de la leche, crema de leche, de la crema de suero, del suero de mantequilla o de la mezcla de alguno o todos estos productos por la acción del cuajo u otros coagulantes aprobados (Resolución 02310 de 1986). El queso, es un alimento preparado con materiales biológicos (leche, cuajo y microorganismos), es un producto en continua modificación. Sus características finales dependen en gran parte de las condiciones en que se produce y almacena, y para lograrlas se requiere un periodo madurativo menos largo (Frankel 2008).

2.3.1 Queso costeño

El queso costeño como su nombre lo indica se produce principalmente en los departamentos de la Costa Caribe, en donde, por la alta temperatura

ambiental, le agregan un alto contenido de sal para garantizar una mayor vida útil. El Queso costeño es una variedad de queso blando no madurado, es decir fresco que se prepara con leche, cuajo y sal. Con un porcentaje de sal del 3%, sin aditivos especiales, obtenidos por coagulación enzimática; su apariencia externa es de color crema, sin brillo y de superficies irregulares. La apariencia interna presenta una textura abierta, de consistencia dura y seca que no se desbarata fácilmente (Gómez 2005).

Tradicionalmente la elaboración del queso ha estado sujeta a técnicas artesanales y rudimentarias donde predominan las malas condiciones higiénicas en toda la línea de producción. Lo anterior conlleva a la obtención de un queso con altos niveles de contaminación microbiológica que atentan contra la salud de los consumidores (Carrascal *et al* 2006).

2.3.1.1 Calidad microbiológica del Queso Costeño

De acuerdo a la NTC 750 del 2009, este producto es un queso fresco y debe contar con los parámetros microbiológicos que se describen en la tabla N°1.

Tabla N° 1: Requisitos microbiológicos del queso fresco

REQUISITOS				
Exámenes de rutina	n	M	M	c
Coliformes, UFC/g (30°C)	3	1000	5000	1
Coliformes, UFC/g(45°C)	3	50	100	1
Recuento de mohos y levaduras/g	3	500	5000	1
Análisis especiales	n	M	M	c
Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positiva. UFC/g	3	100	1000	1
Detección de Salmonella/25g	3	Ausente	-	0
Detección <i>Listeria Monocytogenes</i> /25g	3	Ausente	-	1

Fuente: Instituto Colombiano de Normas Técnicas NTC 750

2.3.1.2 Microorganismos del queso

La microflora del queso está constituida por la propia de la leche, los gérmenes acidificantes y los cultivos puros adecuados para cada variedad de queso inoculado en el momento apropiado. En los quesos fabricados con leche cruda, ésta constituye el origen fundamental de la microflora; el cuajo sobre todo cuando se adiciona en polvo, aporta una escasa carga microbiana (Gil 2010). La Flora patógena incluye *S. aureus*, *Streptococcus spp*, *Salmonella sp*, *Escherichia coli*, *Campylobacter sp*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringes*, *Brucella sp*, *Mycobacterium tuberculosis* y *L. monocytogenes*. Todos ellos excepto los esporulados y los enterococos se destruyen por la pasteurización (Gil 2010).

2.3.1.3 Antecedentes de *S. aureus* en queso

La intoxicación alimentaria estafilocócica es producida por el consumo de alimentos contaminados con enterotoxinas estafilocócicas producidas por cepas de *S. aureus* constituyéndose en una de las principales enfermedades alimentarias a nivel mundial. En Europa el *S. aureus* fue el responsable del 5,1% de las enfermedades transmitidas por alimentos durante 1993 y 1998 (Vanegas *et al*, 2008), también se encontraron cifras en Latinoamérica entre el año 1993 y 2002 que reportaron 719 brotes debido a infección estafilocócica afectando 27693 personas de las cuales 3 fallecieron (Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis 2002).

Cuando se consumen alimentos contaminados con *S. aureus* dichas enterotoxinas causan gastroenteritis, estimulan el peristaltismo intestinal y ejercen un efecto sobre el sistema nervioso central que se manifiesta por

náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, cefalea y sudoración. (Márquez y García 2007). Los principales agentes causales de enfermedades transmitidas por alimentos en Colombia son *Salmonella sp* y *S. aureus* los cuales ocupan los primeros lugares de los reportes anuales de la red de vigilancia en salud pública. En el 2000 se reportaron un total de 34 brotes, ocupando los primeros lugares de notificación localidades como Kennedy, Teusaquillo y Engativá (Bogotá). Según datos de la Secretaria Distrital de la Salud los grupos de alimentos implicados con intoxicaciones por *Staphylococcus spp* son los lácteos (46%) y preparados con carne (37%) (Vanegas *et al* 2008).

2.4 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

Las técnicas de dilución en caldo o agar, se pueden utilizar para medir cuantitativamente la actividad "in vitro" de un antimicrobiano frente a un cultivo bacteriano. Estos métodos se basan en la preparación de una serie de tubos o placas con caldo o agar, respectivamente, a los cuales se les agrega el antimicrobiano estudiado en distintas concentraciones. Luego se inoculan cada uno de los tubos o las placas con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio (Malbrán 2001).

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de un agente antimicrobiano es la mínima concentración del agente que inhibe la multiplicación y producción de un crecimiento visible de una cepa bacteriana. CMI es un método cuantitativo que utiliza diluciones seriadas del antimicrobiano en el medio (Cavaliere *et al.* 2005). La lectura e interpretación de la CMI corresponde a la mínima concentración de bactericida en donde no se observa desarrollo (turbidez), la CMI se expresa en µg/mL (Taroco *et al.* 2003).

2.5 NISINA

La nisina es una sustancia polipeptídica producida por *Lactococcus lactis* a partir de una fermentación en medio lácteo modificado. Presenta actividad antimicrobiana contra un rango limitado de bacterias Gram-positivas, particularmente sobre aquellas formadoras de esporas. La molécula es acídica y por tanto exhibe su mayor estabilidad bajo condiciones ácidas. Es también más soluble a pH bajo (González *et al.* 2003).

Las bacteriocinas pueden servir como barreras bactericidas y ayudar a reducir el espectro de microorganismos que pudieran desarrollarse en el alimento. El efecto de distintos factores físico-químicos sobre la actividad de una bacteriocina no sólo tiene el fin de caracterizarla, sino que también sirve para inferir su posible aplicación industrial, ya que las altas temperaturas y las amplias variaciones de pH son, entre otras, algunas de las condiciones que debe resistir una bacteriocina para ser útil como potencial agente inhibidor de microorganismos no deseados en procesos alimenticios (fermentaciones de leche, maduración de quesos, curado de encurtidos, etc.) (Rojas y Vargas 2008).

2.5.1 Antecedentes de Nisina en quesos

En quesos de pasta hilada, adicionando el antimicrobiano nisina en concentraciones de 500 UI/g después de la maduración de la cuajada, se controla el crecimiento de la bacteria *S. aureus* hasta siete días después de su fabricación (Maldonado y Llanca 2007). De la misma forma la adición de nisina a la leche empleada para la elaboración de quesos blandos, resultó ser eficaz para inhibir el crecimiento de bacterias coliformes y *S. aureus* (Castro *et al* 2009).

Utilizando concentraciones de 10.0 y 16.7 mg/kg de leche, se evaluó el efecto inhibitorio de la nisina sobre poblaciones de *S. aureus*, coliformes totales, *Escherichia coli*, *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes* en queso blanco tipo "telita". Las dos concentraciones mostraron un efecto bactericida sobre *S. aureus* a las dos semanas de almacenamiento (Márquez y García 2007).

Lo anterior permite concluir que la nisina como bioconservante es capaz de mantener productos lácteos con buena calidad microbiológica.

2.6. PRUEBAS SENSORIALES

La evaluación sensorial de alimentos es una disciplina científica usada para evocar, medir, analizar e interpretar reacciones hacia las características de los alimentos y materiales (Fermín *et al* 2009). Las pruebas sensoriales se clasifican en tres tipos principales, pruebas afectivas, descriptivas y discriminativas, dentro de esta última se encuentra la prueba triangular, dicho tipo de análisis sensorial, consiste en presentar al catador tres muestras codificadas convenientemente, de las cuales dos son iguales y la tercera es diferente. El catador debe identificar cual es la muestra distinta. La posibilidad de una respuesta correcta por el azar es de 1 en 3 (33.3%). Los resultados se interpretan según las tablas de Roessler y otros que nos indican la cantidad de respuestas correctas necesarias para obtener diferencias con diferentes grados de significancia (Arias 2009).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Tipo de investigación

Este trabajo estuvo sujeto a una investigación de tipo experimental, ya que se estudia el efecto de la Nisina sobre el *S. aureus* aislado de queso costeño comercializado en el municipio de Montería – Córdoba.

3.2 Población de estudio

Se estudiaron 9 muestras de queso costeño, las cuales se obtuvieron de las diferentes comercializadoras de queso costeño del municipio de Montería Córdoba – Colombia (Anexo A), tomadas de forma aleatoria del universo presente en cada establecimiento. Todas las muestras fueron procesadas por duplicado.

3.2.1 Recolección de muestras de queso

Se recolectaron muestras de 250 gramos de queso, obtenidas en las comercializadoras, las cuales fueron guardadas en bolsas plásticas estériles con sello hermético debidamente rotuladas con código de identificación y fecha, mantenidas en caja de material isotérmico (contenido en cubos de hielo) desde el momento de la colecta hasta el momento de la preparación de la muestra, que se realizó en el Laboratorio de Microbiología y Biotecnología de Alimentos de la Universidad de Córdoba sede Berástegui.

3.2.1 Preparación de la muestra y aislamiento de *S. aureus*

De cada muestra fueron pesadas asepticamente, 10 gramos de queso, se trituraron y adicionaron a bolsa “whirl pak” con 90 mL de agua peptonada estéril al 0,1%, a fin de obtener una dilución inicial 10^{-1} , la muestra se procesó hasta lograr homogenizarla con ayuda de un Stomacher (1-4 min) (Universidad de Córdoba 2010).

Para el aislamiento de *S. aureus*, se realizó siembra mediante extensión en superficie, sobre placas con agar salado de manitol por duplicado. Éstas se incubaron por un período de 24 a 48 horas a 37° C (Universidad de Córdoba 2010).

3.3 Selección e identificación de *S. aureus*: Caracterización de la morfología celular, colonial, y bioquímica.

Se tomaron entre 3-5 UFC características: redondas, rodeadas de una zona amarilla brillante, típica de cepas de *S. aureus* crecidas sobre agar salado de manitol. Se sometieron las colonias características a pruebas bioquímicas confirmativas para identificar el género y especie en estudio, dentro de las cuales se incluyeron: morfología bacteriana, por tinción de Gram (Manual de Microbiología General de la Universidad de Córdoba 2010), prueba de catalasa (Elmer y Koneman 2006) y coagulasa (Holguín *et al.* 1998). De igual forma realizo confirmación de *S aureus*, por **PCR**, técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en 3 de las cepas obtenidas (Brakstad O *et al* 1992). El procedimiento fue realizado en el laboratorio de Investigación del Grupo de Investigaciones Microbiológicas y Biomédicas de Córdoba GIMBIC del Programa de Bacteriología de la Universidad de Córdoba.

Las cepas confirmadas como *S. aureus* se almacenaron en cepario a temperatura de 2 a 4 °C en el laboratorio de Microbiología y Biotecnología de la Universidad de Córdoba, las cuales fueron activadas en caldo nutritivo y luego sembradas en agar Baird Parker (BPA) para la aplicación de la prueba de CMI.

3.4 Determinación CMI de la nisina sobre las cepas de *S. aureus* aislado de Queso Costeño

3.4.1 Patrón 0,5 de McFarland y preparación del inóculo

La escala de McFarland es utilizada como patrón de turbidez para estandarizar la densidad en preparaciones de microorganismos. La escala de 0,5 fue preparada añadiendo ácido sulfúrico (0,18M) 99,5 mL a una solución acuosa de cloruro de bario (0,048M) 0,5 mL que equivale a $1,5 \times 10^8$ UFC/ml (NCCLS 2003), al patrón obtenido se le realiza control de calidad a través de la medida de absorbancia a 625 nm, el cual debe estar en un rango de 0,08 a 0,12.

Para la preparación del inóculo se tomaron una serie de tubos a los cuales se les añadió 5 mL de caldo Mueller Hilton (MH). A partir de un cultivo de 24 a 48 horas del microorganismo fueron tomadas 3 colonias morfológicamente similares con asa bacteriológica y se suspendieron en cada uno de los tubos, se incubaron a 37°C durante 1 hora. Después de la incubación por medio del parámetro de absorbancia y turbidez del patrón (escala 0,5 de McFarland), se realizaron mediciones de absorbancia utilizando espectrofotómetro en cada uno de los tubos, turbidez con turbidímetro ajustando con caldo MH y control visual comparando el patrón con cada uno de los tubos, utilizando una hoja blanca con línea negra en la mitad como contraste. Los tubos que presentaron la medida de

absorbancia y turbidez dentro del rango establecido se consideraron estandarizados en la escala 0,5 McFarland con aproximadamente $1,5 \times 10^8$ células/mL (Taroco *et al* 2003).

3.4.2 Aplicación de CMI

Para determinar la concentración más baja de nisina que puede inhibir el crecimiento visible de *S. aureus* aislado de muestras de queso costeño, se partió de una solución madre, que se obtuvo de diluir 1 gramo de nisina en 100 mL de HCl al 0,02N, esta solución contenía $1,0 \times 10^4$ UI/mL con pH cercano a 2,0 el cual se le ajusto el pH a 3.21 con NaOH al 0,5 N. A partir de la solución madre de nisina y diluyendo en caldo MH se prepararon 6 tubos (Tabla 2) conteniendo 1 mL en concentraciones de 100, 200,500, 1000, 1500, y 2000 (UI/mL), los cuales fueron utilizados inmediatamente para el ensayo (Vignolo *et al* 2000). Dos tubos fueron utilizados como control, a estos no se le adicionó solución madre de nisina sino 1 mL de caldo MH. Seguidamente a cada uno de los tubos de la serie y a un tubo de los tomados como control se le agregó 10 µl del inóculo preparado con *S. aureus*, obteniendo una serie de 8 tubos, 6 con las concentraciones de nisina evaluadas, un tubo como control de crecimiento del microorganismo y un tubo como control del medio MH (sin agente antimicrobiano y sin microorganismo); el ensayo se realizó por duplicado, finalmente los tubos se colocaron a 37°C por 24 horas en incubadora con agitación a 182 rpm.

Tabla N°2: Preparación de las distintas concentraciones de nisina para la determinación de Concentración Mínima Inhibitoria.

Concentración (UI/MI)	Solución Madre 10.000 UI/mL (µL)	Caldo MH (µL)	Total (mL)
100	0.010	0.990	1
200	0.020	0.980	1
500	0.050	0.950	1
1000	0.100	0.900	1
1500	0.150	0.850	1
2000	0.200	0.800	1

3.4.3. Curva de letalidad

Para realizar la curva de letalidad de *S. aureus* aislado de muestras de queso costeño frente a la nisina, se siguió el procedimiento descrito en el numeral 3.4.2, para preparar las concentraciones descritas en la tabla 3.

Tabla N°3: Preparación de las concentraciones de nisina empleadas en la construcción de la curva de letalidad.

Concentración (UI/MI)	Solución Madre 10.000 UI/mL (µL)	Caldo MH (µL)	Total (mL)
250	0.025	0.975	1
500	0.050	0.950	1
1000	0.100	0.900	1
2000	0.200	0.800	1

Posteriormente, se sembró el contenido de los tubos en placas de agar Baird Parker a diferentes tiempos 0, 2, 4, 8, 20 y 24 horas de incubación. Para determinar el número de colonias. El ensayo se realizó por triplicado

(Ramírez y Marín 2009). Los resultados fueron reportados en UFC/mL para cada concentración en cada tiempo. Se graficó recuento (UFC/mL) vs tiempo (horas) en Microsoft Excel 2010.

3.5 Evaluación de diferentes concentraciones de nisina en la elaboración de queso costeño

Para la realización de este estudio se prepararon un total de 9 lotes de queso costeño crudo de acuerdo al procedimiento descrito en el Anexo B; empleando 3 partidas de leche cruda que se identificaron como A, B, y C. La leche de vaca utilizada como materia prima fue obtenida del Programa de Bovinos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Córdoba. La leche fue filtrada, y se evaluó su calidad por medición de pH por valoración potenciométrica, determinación de acidez y recuento de *S. aureus* por triplicado según Holguín *et al* (1998). Para el proceso de elaboración de los quesos se ajustó la temperatura en un rango de 33 a 35 ° C y se adicionó CaCl₂ (20 g/100 L de leche), se adicionó cuajo líquido Milkset (10 mL /100 L de leche). Después el gel de paracaseinato fosfato cálcico fue cortado con una lira, generando cuadros de 1 a 2 cm aproximadamente, la cuajada, se dejó en reposo por cinco minutos para darle más firmeza y luego se desuero por gravedad. Se adicionó sal directamente a 2,5% aplicando un ligero amasado. La "cuajada" previamente salada se separó en 3 lotes de 500 gramos cada uno; A dos de ellos se les adicionó nisina distribuida de forma homogénea en la cuajada. Al lote A se le agregó 15,62 mg de nisina/Kg o 625 UI/Kg, al lote B se le agregó a una concentración de 12,5 mg de nisina /Kg ó 500UI/Kg y al lote C no se agregó nisina y se utilizó como control. En la tabla 4 se relacionan los 9 tratamientos utilizados en el estudio. Se procedió al moldeado final y prensado. De cada uno de los lotes, se tomaron

muestras de quesos que se almacenaron a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$, y analizaron a los tiempos 0 horas, y 24 horas de almacenamiento. Se les determinó el recuento de *S. aureus* por triplicado según Holguín *et al* (1998).

Tabla N°4 Concentraciones de nisina utilizadas en los diferentes tratamientos empleados en la elaboración de queso costeño tradicional y con adición de nisina.

Tratamientos	Concentración de nisina/Kg de queso
AI	625 UI/Kg
AII	625 UI/Kg
AIII	625 UI/Kg
BI	500 UI/Kg
BII	500 UI/Kg
BIII	500 UI/Kg
CI	0 UI/Kg
CII	0 UI/Kg
CIII	0 UI/Kg

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), con 57 unidades experimentales; evaluados y analizados a través de software estadístico R Project versión 3.1.1, con licencia gratuita, los resultados se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), y un test de comparación de medias de Duncan a un nivel de confianza del 95%, con el fin de determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de *S. aureus* encontrados en las muestras de queso sin nisina y los quesos elaborados con las concentraciones de nisina ensayadas.

3.5.1 Aplicación de prueba triangular al queso costeño tradicional y el queso costeño elaborado con nisina

Se realizó prueba triangular para el cual se utilizaron 40 catadores no entrenados, divididos en dos sesiones, con edades comprendidas entre los 19 y 45 años, todos estudiantes y funcionarios del programa de Ingeniería de Alimentos; se evaluó si existían diferencias sensorialmente significativas entre el queso costeño y el queso costeño con adición de una concentración de 500UI de nisina (12,5 mg/Kg de queso) a su formulación, dicha concentración se utiliza porque de acuerdo con el Codex Alimentarius, en su norma estándar para quesos es la concentración máxima permisible (Sierra Lopera 2012). En el Anexo C se presenta la ficha utilizada para la evaluación sensorial de los quesos. Las hojas de respuestas fueron organizadas y analizadas en el programa Excel versión 2010; los resultados se tabularon de acuerdo al número de aciertos y desaciertos obtenidos por los catadores, dichos número de aciertos se compararon con la tabla: Número Mínimo de Juzgamientos Correctos para establecer significancia en distintos niveles de probabilidad para la prueba triangular (una cola, $p = 1/3$) (Anexo D)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento, selección e identificación de *S. aureus* a partir de queso costeño

En todas las muestras obtenidas de las 9 comercializadoras de queso costeño estudiadas se aisló *S.aureus*. En total se obtuvieron 18 cepas con colonias características de *S. aureus* (redondas, rodeadas de una zona amarilla brillante). En el anexo E se aprecia que las cepas aisladas caracterizadas de acuerdo a su morfología celular, colonial, y bioquímica corresponden a *S. aureus*; de los resultados obtenidos por PCR se identificaron que las tres cepas estudiadas contienen el gen de identificación que codifica a *S. aureus* (Anexo F).

Los resultados obtenidos durante esta investigación, revelan que la población cordobesa consumidora de queso costeño se encuentra expuesta a posibles intoxicaciones por *S. aureus*; en este sentido se puede decir que la presencia de este microorganismo es ocasionada por la presencia del mismo en la leche cruda y/o malas prácticas higiénicas en la manipulación, venta y distribución de dicho producto.

Los resultados se asemejan a la investigación realizada por Vanegas *et al* (2008), en donde se encontró que de todas las muestras de quesos distribuidos en tiendas, plazas de mercado y ventas callejeras en Bogotá (n=13) se recuperaron 50 cepas de *S. aureus* coagulasa positivo, dichos resultados eran de esperarse, debido a que las condiciones de

comercialización de las muestras, no cumplieran con condiciones necesarias establecidas en la resolución 2674 de 2013, el producto se comercializaba sin envoltura, solo cubiertos por una bolsa plástica o en hojas de plátano, mantenidos bajo condiciones inadecuadas de temperatura, entre otros factores. Es necesario mencionar que la mayoría de las comercializadoras de queso costeño en el municipio de Montería presentaron condiciones insuficientes en el control de la distribución, almacenamiento y venta del producto; y sólo en pocos establecimientos se conserva el producto en refrigeración, lo que permite afirmar que las condiciones en las cuales se distribuye y almacena este producto afectan directamente la calidad microbiológica del queso y se puede inferir que durante la manipulación de la materia prima o su procesamiento no se implementaron buenas prácticas de manufactura (BPM). La fuente de contaminación por *S. aureus* en quesos artesanales puede originarse de piel, boca o fosas nasales de personas que manipulan el alimento y las materias primas (Vanegas *et al* 2008).

En otras investigaciones realizadas por Acosta (2010), de cepas de *S. aureus* aisladas de quesos artesanales e industriales se observó que los quesos con mayor recuento de *S. aureus* fueron quesos costeños blandos (88%), seguidos por los quesos semiduros (12%), ambos de origen artesanal, es decir elaborados con leche cruda, los resultados no solo relacionan al proceso de elaboración del producto, sino también a la distribución, almacenamiento, transporte y malas condiciones de refrigeración que se asocian como factores de riesgos en brotes e intoxicaciones.

4.2 Determinación de la CMI sobre cepas de *S. aureus* aislado de queso costeño

A través de la aplicación de CMI sobre las cepas de *S. aureus* se observó que la concentración de 500 UI/mL inhibió a *S. aureus*, ya que luego de 24 horas de incubación con agitación el tubo preparado con dicha concentración no presentó turbidez, contrario a lo ocurrido en los tubos con concentraciones de 100 y 200 UI/mL (Anexo G), en los cuales se podía evidenciar crecimiento visible del microorganismo (turbidez). Para confirmar los resultados y utilizando el procedimiento de preparación inicial se decide ampliar el rango de concentraciones entre 500 y 1125 UI/mL (Anexo H) en donde se observa que a 625 UI/mL la nisina logra inhibir el crecimiento de *S. aureus* (Anexo I). La forma en que la Nisina ejerce su letalidad es formando poros en la membrana citoplasmática, a través de una interacción con un componente precursor de la pared celular, denominado lípido precursor (Gravesen *et al.* 2004). Los resultados obtenidos se comparan con otras investigaciones; según Maldonado y Llanca (2007) los niveles de nisina requeridos para reducir significativamente la carga de *S. aureus*, ocurren a partir de 500 UI/mL con disminución de 3,09 Log (UFC/mL).

Se concluye que las concentraciones de 500 y 625 UI/mL de nisina logran inhibir el crecimiento del microorganismo *S. aureus*, estas dos concentraciones fueron las utilizadas para la evaluación y elaboración de queso costeño con adición de nisina a su formulación. Según Castro *et al* (2009) la nisina posee una naturaleza peptídica que permite la degradación por las enzimas digestivas, la bacteriocina es capaz de frenar el crecimiento de microorganismos gram – positivos, entre ellos el *S. aureus*.

4.2.1 Curva de letalidad

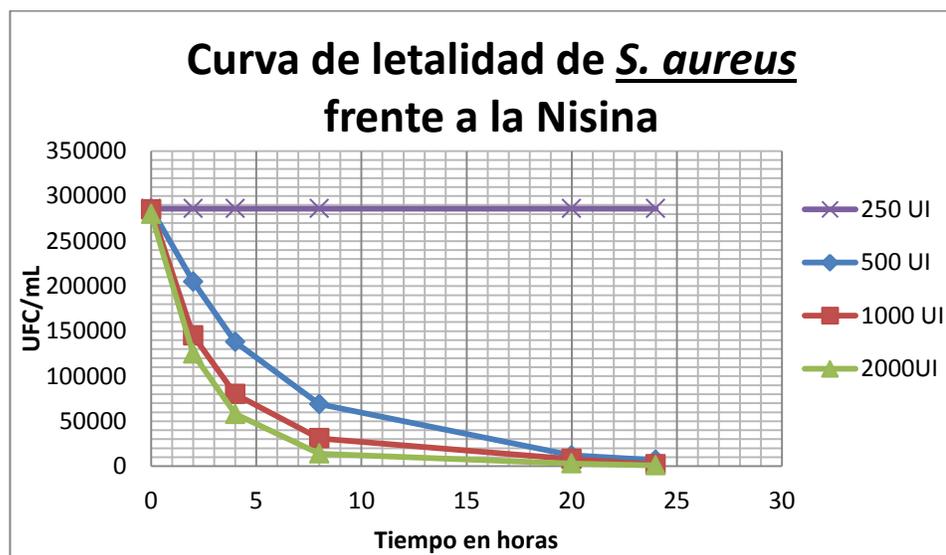


Gráfico N°1: Curva de letalidad: Recuento de *S. aureus* frente a la Nisina en UFC/mL vs tiempo en horas para: $\frac{1}{2}$ CMI, CMI, 2xCMI y 4xCMI.

En el gráfico N°1 se presentan los resultados obtenidos en la curva de letalidad realizada, donde se observa que la concentración de nisina está relacionada con el efecto inhibitorio, ya que para concentraciones de 500, 1000 y 2000 UI/mL, se observa que la población bacteriana disminuye, mientras que para valores 250 UI/mL no se presenta ningún efecto, es decir, que cuando se disminuye la concentración de nisina, el efecto inhibitorio desaparece; A través de la curva se logra visualizar la dinámica sobre la relación entre la concentración de nisina y su actividad bactericida (Ramírez y Marín 2009), por lo que es necesario graficar el logaritmo del número de células sobrevivientes (UFC/mL) versus el tiempo.

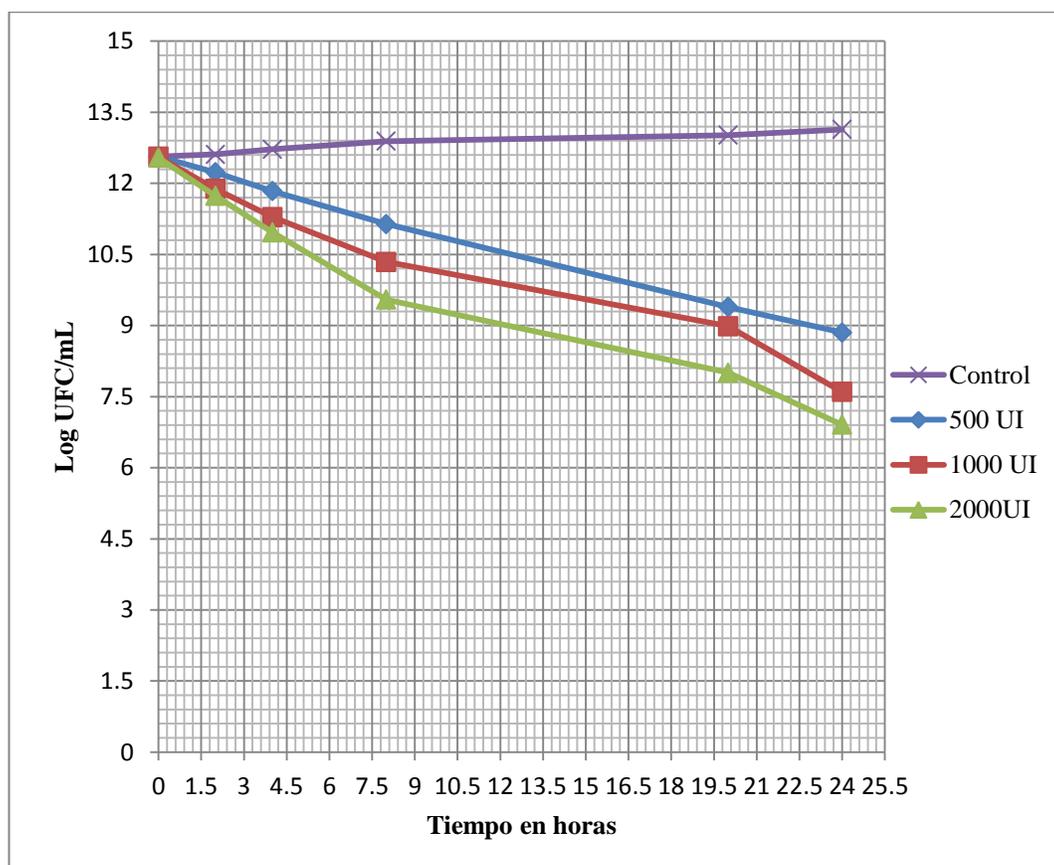


Gráfico N°2: Número de células sobrevivientes (Log UFC/g) vs el tiempo en horas.

El gráfico N° 2 permite apreciar el tiempo en que la concentración es bactericida, es decir el tiempo en el que el descenso de UFC es de 3 Log con respecto al tiempo inicial (Ramírez *et al* 2009). Para la concentración de 2000 UI /mL ó 4xCMI es de 7,5 horas aproximadamente; en el mismo sentido el gráfico permite observar cuando la concentración alcanza su mayor acción para la CMI hallada, 500UI/mL, es 20 horas, en este tiempo la nisina posee su mayor acción bactericida. Por medio de los resultados se puede afirmar que a las 24 horas de incubación la nisina a una concentración de 500UI/mL logra una disminución significativa de la carga bacteriana de 3,7 Log (UFC/mL), se resalta que las concentraciones evaluadas superiores a la CMI no logran llevar los

recuentos de *S. aureus* a cero. Estos resultados se soportan en la investigación realizada por Maldonado y Llanca (2007), quienes revelaron que los niveles requeridos de nisina para reducir significativamente la carga de *S. aureus* en queso de mano ocurren a partir de 500 UI/mL presentando una disminución significativa de la carga bacteriana de 3.09 Log (UFC/mL) concluyendo que la nisina es capaz de ejercer un efecto bactericida e inhibir el crecimiento del *S. aureus* y que esta disminución se encuentra directamente relacionada con la concentración del antimicrobiano.

La curva de letalidad permite conocer la dinámica de la relación entre la concentración y la letalidad, la cual se representa por la tasa de letalidad de cada una de las concentraciones evaluadas, dicha tasa es la pendiente de la curva y simboliza la velocidad a la que mueren las células y es medida en UFC/tiempo (Canton y Pemán 1999).

Matemáticamente es posible hallar la pendiente, como se conocen las UFC en cada tiempo y concentración, se determina el modelo matemático que mejor represente los datos obtenidos, aquí se resalta que los antimicrobianos y antibióticos pueden presentar diferentes cinéticas; Monoexponencial, exponencial y sigmoidea (Canton y Pemán 1999).

En el gráfico 2 se observa que la letalidad aumenta proporcionalmente con el tiempo de incubación, y de acuerdo con Cantón y Pemán (1999) por las características de la curva, la nisina presenta cinética monoexponencial de primer orden, cuya fórmula es $N_T = N_0 e^{-KT}$, linealizando la ecuación mediante la aplicación de logaritmos se transforma en $\ln N_T = \ln N_0 - KT$, se obtiene la tasa de letalidad (K), donde (N_T) representa el número de UFC en un determinado tiempo, depende del inóculo (N_0) y de una serie de factores que vienen determinados por una constante, K (tasa de letalidad), cuyo valor depende

de las condiciones de incubación, del medio de cultivo, de la concentración del antimicrobiano, y del microorganismo. En el presente estudio, este proceso se realiza para cada una de las concentraciones evaluadas, en la tabla N°5 se presentan las pendientes de cada ecuación obtenida, la cual corresponde a la tasa de letalidad, expresada en UFC/hora. Por medio de esta se infiere que a mayor concentración mayor es la velocidad de muerte del microorganismo.

Tabla N°5: Tasa de letalidad y tiempo de reducción de la población de *S. aureus* para las concentraciones de Nisina evaluadas

<i>Concentración UI/mL</i>	K (UFC/hora)	T_{1/2}(horas)
500	0.154	4.50095572
1000	0.184	3.76710424
2000	0.205	3.38120576

La tasa de letalidad además de facilitar el análisis del comportamiento de las diferentes concentraciones evaluadas, permite calcular el tiempo que tarda la población del microorganismo en reducirse a la mitad, a través de la aplicación de la siguiente fórmula: $T_{1/2} = \ln 2 / K$ (Canton y Pemán 1999). De las tasas de letalidad obtenidas en la presente investigación se tiene el tiempo de reducción para cada concentración (Tabla N° 5).

Dichos resultados permiten concluir que a medida que la concentración de nisina aumenta, el tiempo en que se reduce la población del microorganismo en estudio es menor.

4.3 Evaluación de diferentes concentraciones de nisina en la elaboración de queso costeño

Tabla N° 6: Características fisicoquímicas de la leche cruda

<i>Análisis</i>	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de variación (%)
<i>pH</i>	6.8	0.007	0.099
<i>Acidez % Ac. Láctico</i>	0.16	6.7E-05	0.041

Los análisis realizados a la leche utilizada en el proceso de elaboración de los quesos arrojaron valores promedios de pH de 6,8 y Acidez de 0.16 % ácido láctico, como se muestra en la tabla N° 6, de acuerdo a los parámetros establecidos en el Decreto 616 (2006) se puede afirmar que la materia prima mencionada es fisicoquímicamente apta para la elaboración de los quesos. De acuerdo a los resultados de los recuentos de *S. aureus* en la leche cruda se obtuvieron recuentos superiores a 1000 UFC/mL, dichos resultados relacionan que la elevada flora microbiana inicial del queso proviene en mayor proporción de la leche cruda, debido posiblemente a que durante el ordeño fenómenos hormonales, junto a la presión que se aplica sobre el pezón fuerza a la leche a pasar a través del orificio del mismo, el cual es una puerta de entrada de microorganismos, dentro de la microbiota habitual de la ubre incluye estreptococos, estafilococos y micrococos, *Corynebacterium spp.*, *Escherichia coli* entre otros; en este sentido es necesario mencionar que la presencia de *S. aureus* indica contaminación por manipulación o enfermedad en el bovino por mastitis (Hilpot y Nickerson 2000).

Investigaciones anteriores registran en leche cruda presencia de microorganismos patógenos (Oliver et al 2005) siendo los microorganismos encontrados con más frecuencia *Salmonella* spp, *E. Coli 0157:H7*, *Campylobacter* spp; y *S. aureus*.

Tabla N° 7: Promedios de recuentos de *S. aureus* en UFC/g para los diferentes tratamientos evaluados, en el tiempo de 0 y 24 horas.

Tratamientos	Recuento promedio 0 horas UFC/g	Recuento promedio 24 horas UFC/g
Lote A (625UI/kg de Nisina)	70	11
Lote B (500UI/kg de Nisina)	413	64
Lote C (Sin Nisina)	1669	2402

En la tabla N°7 se muestran los resultados de los recuentos en UFC/g para los tratamientos evaluados; de los tratamientos correspondientes a los lotes A y B con concentración de 625 y 500 UI/kg de nisina, se tiene que estos presentan un recuento menor de carga de *S. aureus* respecto a los resultados del lote C, tratamiento sin nisina. En los tiempos de almacenamiento evaluados 0 y 24 horas, las muestras de queso del lote C se encuentra por encima del límite máximo permisible 10^3 UFC/g de *S. aureus* de acuerdo a la legislación Colombiana para quesos frescos NTC 750, representando desde el punto de vista microbiológico que el consumo después de 24 horas de almacenamiento, representa un riesgo de intoxicación alimentaria; estos resultados se respaldan con los reportados por Martínez *et al* (2006) y Chávez y Romero (2006), lo cuales reportaron que el 100% de las muestras de queso costeño presentaron valores no permisibles en recuentos de *S. aureus*; demostrando que el queso preparado de forma artesanal está expuesto a una contaminación por este germen debido al aporte de carga microbiana de la leche cruda con que

son elaborados y a las malas prácticas de manufactura, conservación, transporte y comercialización.

La metodología que en mayor frecuencia se realiza para estos productos es la aplicación de tratamientos térmicos en la materia prima (leche), proceso considerado esencial para erradicar enfermedades transmitidas por alimentos, pero dicho tratamiento preventivo no se encuentra generalizado y no corresponde a los procedimientos tradicionales de elaboración del producto mencionado (Jiménez et al 2006), en la actualidad se conserva una preferencia al empleo de leches crudas para elaborar quesos, debido a que la aplicación de tratamientos térmicos, específicamente la pasteurización ocasiona desnaturalización de las proteínas endógenas de la leche y promueve la eliminación de microorganismos propios del área geográfica que proporcionan diferenciación del color y textura propios del queso (González 2002).

En el anexo J se presenta los diagramas de dispersión del recuento de *S. aureus* para el tiempo de 0 y 24 horas, para las concentraciones de 625 UI/Kg de producto (Lote A), 500 UI/Kg de producto (Lote B), y para el control (Lote C) respectivamente, en donde es posible apreciar diferencias en el recuento promedio de los lotes. El análisis de varianza al 95% del nivel de confianza reflejados en las tablas N° 8 y 9, establece que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), en cada uno de los tratamientos estudiados (Lotes de queso, A, B y C), para los dos tiempos de almacenamiento evaluados (tiempo 0 y 24 horas). Por ende se puede afirmar que los diferentes tratamientos aplicados en la investigación afectaron al recuento de *S. aureus* final del queso costeño.

Tabla N° 8: Análisis de Varianza para recuento de *S. aureus* en los diferentes tratamientos aplicados al tiempo de cero horas de almacenamiento.

	Grados de libertad	Suma de cuadrado	Medias	F Value	Pr (>F)
LOTE	2	11774280.07	5887140.04	40.33	2.11e-08
Residual	24	3503165.33	145965.22		

Tabla N°9: Análisis de Varianza para recuento de *S. aureus* en los diferentes tratamientos aplicados al tiempo de 24 horas de almacenamiento.

	Grados de libertad	Suma de cuadrado	Medias	F Value	Pr (>F)
LOTE	2	33565843.63	16782921.81	91.83	5.68e-12
Residual	24	4386261.33	182760.89		

De acuerdo a esto se realizó la prueba de intervalos múltiples de Duncan para la comparación de las medias de los lotes en los dos tiempos de almacenamiento.

En primer lugar en la tabla N° 10 se tiene que todos los tratamientos aplicados difieren entre sí, señalándose entonces que el lote A (queso elaborado a 625 UI/Kg de nisina), es quien influye en mayor proporción en el recuento del microorganismo en estudio, esto permite afirmar que en el estudio realizado, la adición de nisina a una concentración de 625 UI/Kg logra la mayor disminución de la carga de *S. aureus* en el queso costeño, este resultado es posible explicarlo, debido a que el efecto de la bacteriocinas (nisina), se refleja en mayor proporción al inicio de su incorporación, ya que, en el tiempo los microorganismos propios de la matriz, son capaces de desarrollar mecanismos de resistencia frente a

antimicrobianos (López *et al*, 2008). Se hace preciso mencionar que Cava *et al* (2006) concluyó en su investigación que el efecto inhibitorio de la nisina sobre el *S. aureus* fue dependiente de la cantidad de nisina agregada, lo que soporta los resultados obtenidos.

Tabla N° 10: Comparación de medias por test de Duncan para el promedio del recuento de *S. aureus* de los lotes a las cero horas

<i>Tratamientos</i>	<i>Medias de Recuento ± S D</i>	
A	69.89 ± 49.14	a
B	657.78 ± 253.86	ab
C	1668.89 ± 609.13	c

Las letras diferentes indican que las medias que difieren estadísticamente según Duncan ($p < 0.05$)

En la tabla N° 11 se observan los resultados obtenidos del recuento a las 24 horas para cada uno de los tratamientos, se encontraron diferencias estadísticamente entre los recuentos de las muestras de queso sin nisina correspondiente al lote C y los recuentos de *S. aureus* de las muestras de queso con nisina a 625 y a 500 UI//Kg, lotes A y B, lo que permite afirmar, entonces que para los dos tratamientos con nisina evaluados a las 24 horas en las muestras de queso almacenadas no existe diferencia entre el efecto de inhibición de las concentraciones estudiadas de nisina sobre el recuento en términos de UFC/g para *S. aureus*, la respuesta a este comportamiento es posible explicarla debido a que los microorganismos frente bacteriocinas reflejan una disminución del recuento de células viables respecto al inicio, pero los microorganismos tiende con el tiempo a hacer resistentes a la bacteriocinas, otro factor que puede incidir en el efecto es la acción proteolítica de las enzimas presentes en el alimentos que pueden degradar la nisina (Thomas *et al*. 2000).

Cabe señalar que las dos concentraciones ejercen efecto inhibitorio sobre el *S. aureus*, se debe aclarar que de acuerdo al con el Codex Alimentarius, en su norma estándar para quesos (Sierra Lopera 2012) se establece que el parámetro admisible para la incorporación de nisina en la elaboración de quesos es de 500UI/Kg de producto, es decir, que solo se debe dosificar la concentración de nisina del tratamiento B.

Tabla N° 11: Comparación de medias por test de Duncan para el promedio del recuento de *S. aureus* de los lotes a 24 horas de almacenamiento.

Tratamientos	Medias de Recuento \pm S D
A	11.11 \pm 9.23 <i>a</i>
B	64.44 \pm 53.64 <i>a</i>
C	2402.56 \pm 738.45 <i>b</i>

Las letras diferentes indican que las medias que difieren estadísticamente según Duncan ($p < 0.05$)

A través de la presente investigación se afirma que la nisina tiene un poder inhibitorio sobre el crecimiento de *S. aureus* dicho hallazgo se soportan en investigaciones como la de Cava *et al.* (2006), en donde se demuestra la efectividad de la adición de nisina a 16,7 mg/Kg o 688UI/Kg para inhibir el crecimiento de *S. aureus* en queso blanco de pasta hilada elaborado con leche cruda, ellos encontraron que la población de éste microorganismo se redujo a lo largo del periodo de almacenamiento de los quesos; también estudios realizados por Soares *et al.* (2011), señalan que la nisina fue eficaz en la reducción de recuento de *S. aureus* en queso de Minas tradicional Serro, observándose reducción de 2.0 ciclos log en los quesos que contenían 12,5mg/L o 500UI/mL con relación al control, después de un periodo de 7 días de la maduración, lo que les permitió concluir que el antimicrobiano nisina es una herramienta

eficaz para contribuir a la seguridad para el consumo de los quesos tradicionales producidos con leche cruda, de ambos estudios se soporta que no se logró llevar los recuentos del microorganismo a cero, igual a lo observado en el presente estudio.

En el gráfico N° 3 se presenta la sobrevivencia promedio del *S. aureus* en los tres tratamientos evaluados, los valores promedios de las poblaciones *S. aureus* en cada una de las muestras analizadas durante el almacenamiento y la diferencia en ciclos logarítmicos. Se observa que en el tratamiento C (control) el recuento del microorganismo aumenta a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento; de igual manera observamos que para el control la carga del microorganismo a las 24 horas de almacenamiento es 7,8 Log UFC/g aproximadamente; para los tratamientos de 625 y 500 UI/Kg fue de 2,4 y 4 Log UFC/g, lo que significa que la nisina inhibió el crecimiento en comparación al queso de control, donde el crecimiento fue hasta de 5 ciclos logarítmicos mayor; los resultados obtenidos se soportan en la investigación realizada por Maldonado y Llanca (2007), donde el uso de la nisina en el queso de mano a una concentración de 500UI/Kg inhibió el crecimiento de la bacteria *S. aureus*, mientras que en el queso control el crecimiento fue de cinco ciclos logarítmicos (100.000UFC/g) a los siete días de almacenamiento. Así mismo en el gráfico N° 3 se logra apreciar que el recuento promedio de *S. aureus* de las muestras de queso con nisina a 625UI//Kg y a 500UI/Kg, presentan una reducción significativa de 1,9 y 2,3 unidades logarítmicas respectivamente, estos resultados se pueden explicar debido a que en el proceso de elaboración la nisina pudo, no homogenizarse correctamente en la matriz , ya que se espera de acuerdo a estudios anteriores que a mayor concentración del antimicrobiano, mayor sea el efecto de inhibición sobre el microorganismo.

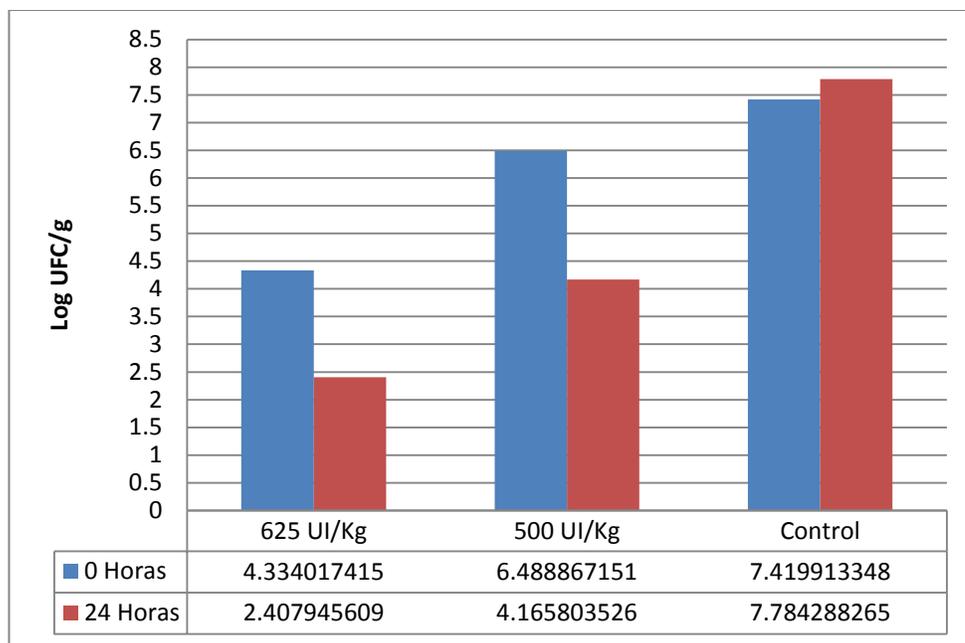


Gráfico N°3: Promedio del recuento de *S. aureus* para las concentraciones de nisina y control en los tiempos de almacenamiento

4.4 Aplicación de prueba triangular en queso costeño tradicional y el queso costeño elaborado con nisina

En el Anexo K se disponen los resultados obtenidos por el grupo de catadores en la prueba triangular, lo cuales indican que no existen diferencias significativas evaluado al 95% a un nivel de confianza ($p < 0.05$) entre el queso costeño elaborado de forma tradicional y el queso costeño cuando se agrega 500UI de nisina, lo que indica que la sustancia de estudio no produce ninguna alteración de las propiedades sensoriales apreciables en el producto; estudios como el de Sarmiento (2007) en el cual evalúan la nisina como bioconservante en leche realizan prueba triangular a 35 panelistas y no detectaron diferencias significativas entre los tratamientos con nisina y leche sin ningún tipo de aditivo.

Con estos resultados, se puede decir que no existe inconveniente en incorporar la nisina a una concentración de 500UI en la elaboración de queso costeño, ya que no altera las propiedades sensoriales del producto.

5. CONCLUSIONES

A partir del desarrollo de esta investigación es posible concluir:

- Las nueve comercializadoras de queso costeño estudiadas en el municipio de Montería- Córdoba presentaron presencia de *S. aureus* en las muestras de queso costeño.
- Las cepas de *S. aureus* aisladas de queso costeño son inhibidas por el antimicrobiano nisina a una concentración de 500 UI/mL. Con la realización de la curva de letalidad se obtiene que la CMI hallada (500UI/mL), alcanza su mayor acción bactericida a las 20 horas de incubación, logrando una disminución de 3.7 Log (UFC/mL); con la determinación de la tasa de letalidad se puede conocer la velocidad en que el microorganismo muere 0,154 UFC/hora y el tiempo de reducción de la población de 4.5 horas.
- Los quesos elaborados con concentraciones de nisina de 500UI/Kg queso (12,5mg de nisina/Kg de producto), y 625UI/Kg queso (15mg de nisina/Kg de producto), presentaron reducción de significativa de 1,9 y 2,3 unidades logarítmicas respectivamente de la población de *S. aureus* en el queso.
- Las propiedades sensoriales del queso costeño elaborado con una concentración de nisina de 500UI/Kg de producto, no presentan diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$) con respecto al queso costeño elaborado de forma tradicional.

6. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar investigaciones sobre la determinación de la concentración mínima bactericida de la nisina sobre del *S. aureus* aislado de queso costeño.
- Evaluar la calidad microbiológica del queso costeño, mediante la aplicación de tratamientos térmicos y la adición de nisina como conservante.
- Se recomienda investigar el efecto de la nisina en las características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales del queso costeño, y establecer un estudio de factibilidad al utilizar la nisina como conservante del producto mencionado.
- Evaluar el efecto de la nisina sobre el tiempo de vida útil del queso costeño, y establecer los balances para la determinación del contenido final de antimicrobiano en la matriz alimentaria.
- Socializar a los fabricantes de queso costeño sobre la importancia de elaborar queso con leche pasteurizada que garantice la comercialización de un producto inocuo.
- Dar a conocer a los productores y comercializadores de queso costeño el uso de la nisina como una opción que mejora la inocuidad de este producto de consumo diario en los hogares cordobeses.



7. BIBLIOGRAFÍA

- **Acosta, I. 2010.** Caracterización de la susceptibilidad a antibióticos y del perfil plasmídico en cepas *de Staphylococcus aureus* aisladas de quesos artesanales industriales consumidos en el municipio de Valledupar- César- Colombia. Tesis Magister Scientiarum en Microbiología. Universidad del Zulia, p37-52
- **Arias, M. 2009.** Caracterización físico- química y sensorial de nabiza y grelo (*Brassica rapa L.*) Universidad de Santiago de Compostela. España, p115-118
- **Arispe, A., Tapia, S. 2007.** Inocuidad y calidad: requisitos indispensables para la protección de la salud de los consumidores. Revista Colombiana de Ciencias Peruanas. Universidad de los Andes 13(24): 105-117.

- **Aymerich, T., Picouet, PA., Monfort, JM. 2008.** Decontamination technologies for meat products. (78): 114-129.

- **Bayona, M. 2009.** Evaluación microbiológica de alimentos adquiridos en la vía pública en un sector del norte de Bogotá. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica. (en línea). 12(2). <http://biblat.unam.mx/es/revista/revista-udca-actualidad-divulgacion-cientifica/articulo/evaluacion-microbiologica-de-alimentos-adquiridos-en-la-via-publica-en-un-sector-del-norte-de-bogota>. Acceso: 22 de Diciembre (2014)

- **Brakstad O, Aaba HH, Naeland L. 1992** Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the Nuc gene. Journal of Clinical Microbiology 1992; 30(7)1654-1660.

-

- **Broughton, D. 2008.** Nisin and its uses as a food preservative. Food Technology. Plenum Publishers, New York, p2-24

- **Canton, E., Pemán, J. 1999.** Curvas de letalidad en antifúngicos. Revista Iberoamericana de Micología 16:82-85

- **Carrascal, A., Albarracín, F., Sarmiento, P., Mercado, M. 2006.** Estimación de la proporción de *L. monocytogenes* y *Salmonella spp* en quesos frescos (queso de hoja, cuajada) y queso doble crema expendidos en el municipio de Pamplona, Norte de Santander. Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas ISSN 0120-4211 (En línea), 4(2),

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90340204>. Acceso: 10 diciembre (2014)

- **Castro, G., Valbuena E., Briñez W., Sánchez E., Vera, H., Tovar, A. 2009.** Comparación del empleo de nisina y cultivos *de lactococcus lactis subsp. lactis* para la biopreservación de queso blanco. Revista Científica. ISSN 0798-2259 (en línea), 19(2), http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0798-22592009000200015&script=sci_arttext. Acceso: 19 septiembre (2014).
- **Castillo, J., Chaves, J. 2008.** Implementación de la documentación de las buenas prácticas de manufactura y establecimiento de los manuales de procedimiento de las pruebas fisicoquímicas en plantas de enfriamiento. Tesis para optar por el título de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Sede Bogotá.
- **Cava, R., Sangronis, E., Lucci, E., Woyzechowsky, L. 2006.** Efecto de la adición de nisina en queso fresco telita sobre la supervivencia de *Staphylococcus aureus*. 19(2). En línea http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-07522006000200003&lng=es&nrm=iso Acceso: 15 Mayo (2015).
- **Cavaliere, S., Rankin, I., Harbeck, R., Sautter, R., McCarter, Y., Sharp, S., Ortez, J., Spiegel, C. 2005.** Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. 7(5): 3-57

- **Cervantes, E., García, R., Salazar, P. 2014.** Características generales del *Staphylococcus aureus*. Revista Latinoamericana de Patología Clínica. México. 61(1): 29-31
- **Chávez, A. y Romero, A. 2006.** Diagnóstico de las condiciones microbiológicas y fisicoquímicas del queso costeño producido en el municipio de Sincé- Sucre (Colombia). Trabajo de grado presentado para optar por el título de Ingeniero Agroindustrial. Sincelejo- Sucre.
- **Codex Alimentarius. 2009.** Higiene de los Alimentos: Textos básicos. Organización Mundial de la Salud. Cuarta Edición. Roma, p37-45
- **Cortecero, L., Benítez, J. 2011.** Evaluación de resistencia bacteriana a antibióticos Oxietracciclina y Eritromicina en quesos frescos costeños del departamento de Bolívar provenientes de los municipios de Arjona y Villanueva. Universidad de Cartagena. Facultad de Ingenierías. Cartagena de Indias.
- **Decreto 616. 2006.** Ministerio de Protección Social: Reglamento Técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercialice, expendi, importe o exporte en el país. Bogotá, p25-33
- **Dos Santos, A. 2007.** Estudios del comportamiento cinético de microorganismos de interés en seguridad alimentaria con modelos matemáticos. Tesis para Optar al Título de Doctor en Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Veterinaria, p98-99

- **Elmer, W., Koneman, S. 2006.** Koneman. Diagnóstico Microbiológico: Texto y atlas en color. Editorial Médica Panamericana., Madrid, España, p17-22

- **ENA. Encuesta Nacional Agropecuaria. 2013.** Producción de leche diaria obtenida según destino en 22 departamentos. Dirección de Metodología y Producción Estadística- DIMPE. Bogotá D.C

- **FAO; OMS. 2005.** Sistemas nacionales de inocuidad de alimentos en las Américas y el Caribe: análisis de la situación. Conferencia Regional FAO/OMS sobre Inocuidad de los Alimentos para las Américas y el Caribe San José. p10.

- **FEDEGAN. Revista Carta Fedegán. 2014.** No. 143. <http://www.fedegan.org.co//carta-fedegan-143-34deg-congreso-nacional-de-ganaderos-santa-marta> Acceso: 12 de Marzo (2015).

- **Fermín, N., Venero, P., Conchado, D., García, J., Álvarez, C. 2009.** Entrenamiento sensorial para la evaluación de un jamón endiablado. Revista UDO Agrícola. 9(3):640-652

- **Frankel, A. 2008.** Industrialización casera del queso. Editorial Albatros, Buenos Aires, p112

- **Gálvez, A., Abriquel, H., Lucas, R., Ben, Omar. 2007.** Bacteriocin- based strategies for food biopreservación. Int. J Food Microbiology. 120: 51-70

- **Gil, A. 2010.** Composición y Calidad Nutritiva de los alimentos. Médica Panamericana, Madrid, p35
- **Gómez, M. 2005.** Tecnología de Lácteos. Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD, p42.
- **González, M. 2002.** Tecnología para la elaboración de queso blanco amarillo y yogurt. Secretaria de Ciencia, Tecnología e Innovación/Autoridad de la Micro. Pequeña y Mediana empresa. República de Panamá. p16.
- **González, B., Treviño, M., Jiménez, Z. 2003.** Bacteriocinas de Probióticos. Revista Salud Pública y Nutrición. 4(2): 1-8
- **Gravesen, A., Kallipollitis, B., Holmstrom, K., Hoiby, P., Ramnath, M., Knochel, S. 2004.** Mediated nisin resistance mechanism in *Listeria Monocytogenes* confers cross- protection to class all bacteriocins and effects virulence gene expression. 70(3): 25-30
- **Hilpot, N., Nickerson, S. 2000.** Ganando la lucha contra la mastitis. Naperville USA. p192.
- **Holguín, M., Higuera, M., Rubio, B., Vargas, M., Muñoz, A., Díaz, G. 1998.** Manual de técnicas de análisis para control de calidad microbiológico de alimentos para consumo humano. INVIMA: División laboratorio de alimentos y bebidas alcohólicas; Sección de microbiología de alimentos. p26-28
- **Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis. 2002.**

www.panalimentos.org/sirveta/e/grafb_02.asp?frmAnDesde=1993frmAnHasta=2002rmPais. Acceso: 15 de julio (2014).

- **Jiménez, F., Garro, L., Rodríguez, E. 2006.** Evaluación de la presencia de bacterias en alimentos y en el ambiente de una sección de oncología de un hospital nacional. San José, Costa Rica. ALAN Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 54(3): 303-307.
- **Lawless, H., Heymann, H. 2010.** Sensory Evaluation on food. Library of Congress Control Number, New York, p386-389.
- **López M., Ochoa Z., Santoyo P., Anaya L., Medina M., Martínez T., Loeza L.2008.** Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. Distrito Federal, México. (en línea), 39(3) <http://www.redalyc.org/pdf/579/57911110007.pdf>. Acceso: 22 de junio (2015).
- **Malbrán, C. 2001.** Manual de procedimientos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas de humanos. Instituto Nacional de enfermedades infecciosas, Buenos Aires, Argentina, p25-32
-
- **Maldonado, R., Llanca, L. 2007.** Efecto de la incorporación de nisina sobre la supervivencia del *Staphylococcus aureus* en queso de mano. Revista Facultad de Agronomía. Maracay - Venezuela. (en línea), 33(3), http://revistaagronomiaucv.org.ve/revista/articulos/2007_33_3_1.pdf. Acceso: 19 de octubre (2014)

- **Márquez, J., García, C. 2007.** Efecto de la nisina sobre la microflora patógena del queso blanco artesanal tipo "telita" elaborado en una quesera de Upata, Estado Bolívar, Venezuela. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. ISSN 1315-2556. 27. Acceso: 25 de Marzo (2014).
- **Martínez, K., Mestra, A. y Chams, L. 2006.** Caracterización microbiológica del queso y valoración del estado higiénico locativo de expendios en la ciudad de Montería. Revista Facultad Ciencias de la Salud 1(1):19-25
- **Mc Allister, T, 2009.** La inocuidad de alimentos y el comercio internacional. Revista Colombiana de ciencias pecuarias. 22(3): 330-338
- **Montville, TJ., Matthews, KR. (2008).** Food microbiology: An introduction. ASM Press. 2 Edición. Washington D.C. p83-91
- **National Committee for Clinical Laboratory Standards. NCCLS 2003.** Approved standard: M7-A6. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 6th Edition. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, p115.
- **NTC 750.** Normas Técnica Colombiana sobre productos lácteos: Queso, 1-15, Bogotá, Colombia (2009).
- **Oliver, S., Jayarao, B., Almeida, R. 2005.** Foodborne pathogens in milk and the Dairy farm environment. Food safety and public

health implications. *Foodborne Pathogen and Disease*. 2(2):115-129

- **OMS. 2002. Organización Mundial de la Salud.** Estrategia Global de la OMS para la inocuidad de los alimentos: alimentos más sanos para una salud mejor. <http://whqlibdoc.who.int/publications/2002/9243545744.pdf>. [13 Junio 2014].
- **Pahissa, A. 2009.** Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. Editorial ICG Marge, SL. Barcelona España, p15-18.
- **Pardo, M., Almanza, F. 2005.** Guía de Procesos para la elaboración de productos lácteos. Bogotá D.C. ISBN 958-698-108-8
- **Ramírez, L., Marin D. 2009.** Metodologías para evaluar “in vitro” la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Scientia et Technica. Universidad Tecnológica de Pereira. ISSN 0122-1701. 19(42). Acceso: 25 de Diciembre (2014).
- **R Core Team. 2014.** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
-
- **Resolución 02310 de 1986.** Ministerio de Salud, Republica de Colombia. (en línea). [http://www.codabas.com/noticias/07/RESOLUCION_2310_DE_1986\[1\].pdf](http://www.codabas.com/noticias/07/RESOLUCION_2310_DE_1986[1].pdf) Acceso: 20 de Agosto (2014).

- **Rojas, C., Vargas, P. 2008.** Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la Industria de Alimentaria. Tecnología en marcha. p11-19

- **Sarmiento, A. 2007.** Evaluación de Nisina como bioconservante en leche fluida. Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria. Zamorano, Honduras. p36.

- **Sierra Lopera, L. 2012.** Evaluación de la preservación de extractos líquidos de café mediante el uso de bacteriocina (Nisina) y aplicación de microondas. Tesis para optar al título de Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.

- **Soares P., Fernandes de Carvalho., Dos Santos P., Campos S., Fonseca da Silva., Denise S., Jacinto de Paula., De Lima S. 2011.** The effects of nisin on Staphylococcus aureus count and the physicochemical properties of Traditional Minas Serro cheese. International Dairy Journal. 21 (2011) 90-96

- **Stewart, C. 2003.** Staphylococcus aureus and Staphylococcal enterotoxins. Australian Institute of Food Science and Technology (NSW Branch). Sydney, p359–380.

- **Taroco R., V. Sejjia y R Vignoli. 2003.** Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. (36), p668- 670

- **Thomas LV, Clarkson MR, Delves-Broughton J. 2000.** Nisina. Natural food antimicrobial system (Naidu A. S. eds.) CRC Press, Inc. Boca de Ratón, Florida, USA.

- **Universidad de Córdoba. 2010.** Manual de Prácticas de Microbiología General. Facultad de Ingenierías, p25

- **Vanegas, M., González, L., Martínez, A., Buitrago, F. 2008.** Aislamiento y caracterización de cepas de Staphylococcus enterotoxigénicos aislado de quesos en Bogotá. Revista MVZ Córdoba. ISSN 0122-0268. 13(2):1-12

- **Vignolo, G., Palacios, J., Farías, M., Sesma, F., Schillinger, U., Holzapfel, W., Oliver, G. 2000.** Combined Effect of Bacteriocins on the Survival of Various Listeria Species in Broth and Meat System. Current Microbiol. 41(3): 410-416.

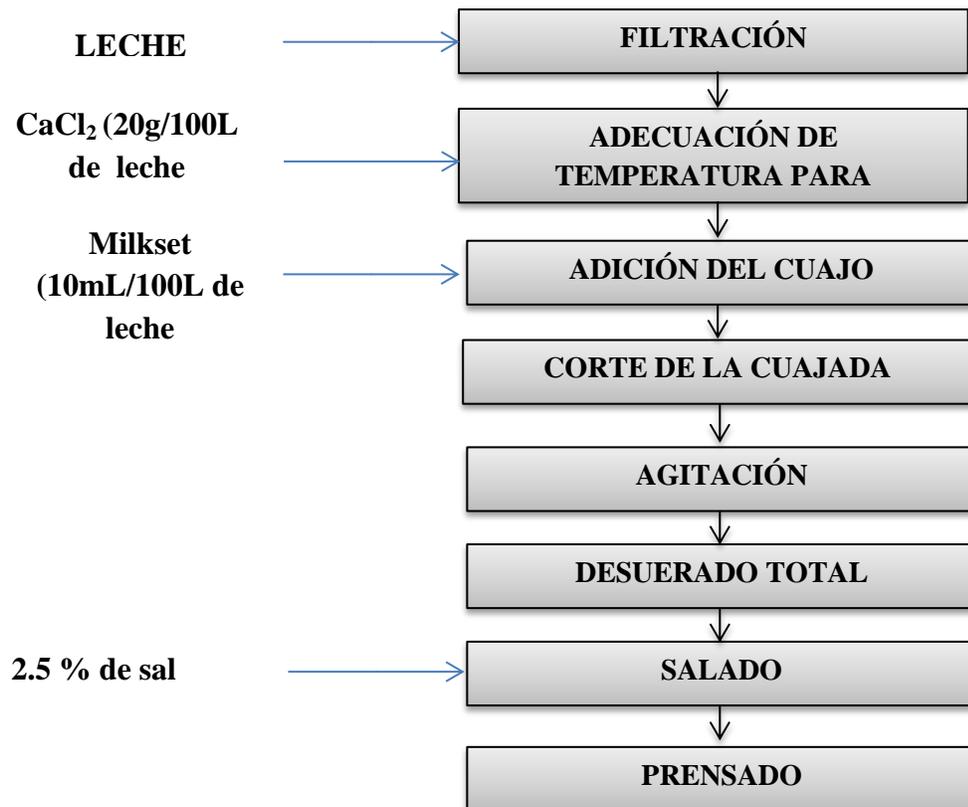
8. ANEXOS

Anexo A: *Listado distribuidoras oficiales de queso costeño en el municipio de Montería. Cámara de Comercio de Montería.*

RAZÓN SOCIAL	DIRECCIÓN	PROPIETARIO
“Compra y venta de queso Mozarella Katte”	Calle 28 # 12AW-06 B/ El Dorado.	Ortiz Mestra Flavio Alexander
“El Hato Cárnicos Y Lácteos”	Calle 41 # 5-10	Restrepo Ruiz Gloria Stella
“Pico Pico P.”	Calle 29a # 27-37 Barrio Canta Claro	Pico Plaza Luis Manuel
“Productos Frescos De Finca”	Calle 28 Nro. 9-47	Altamiranda Flórez María Auxiliadora
“Quesera D.G.”	Calle 35 Cr 1 y 2 Local 052 Interior Mercado Publico	Guzmán David Antonio

“Quesera El Éxito”	Carrera 1a # 43-113 B/ Sucre	Andrade Reyes Olga Lucrecia
“Quesera Montería”	Diagonal 16 # 3-66	Arteaga Peralta Manuel Enrique
“Quesera Nazarayu”	Carrera 4Nro. 30- 15	Argel Herrera Daniel Enrique
“QuesoDel: Quesos Y Delicias Del Sinú”	Calle 37 # 1-67	García González Jonathan

Anexo B: Diagrama de flujo proceso de elaboración de queso costeño



4 °C x 24 horas



Fuente: Pardo y Almanza. 2005. Adaptado guía de Procesos para la elaboración de productos lácteos.



Anexo C: Formato de evaluación: Prueba Triangular

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
PROGRAMA INGENIERIA DE ALIMENTOS
Evaluación Sensorial
Trabajo de Investigación en Queso Costeño

NOMBRE _____ FECHA _____

Frente a usted hay tres muestras. Dos muestras son iguales entre sí; pruebe las muestras de izquierda a derecha, e indique con una X cuál es la muestra diferente.

Muestra	Muestra diferente
---------	-------------------

789	
386	
253	

MUCHAS GRACIAS POR TU COLABORACIÓN

Anexo D: Número mínimo de juzgamientos correctos para establecer significancia en distintos niveles probabilidad para la prueba triangular (una cola, $p = 1/3$)

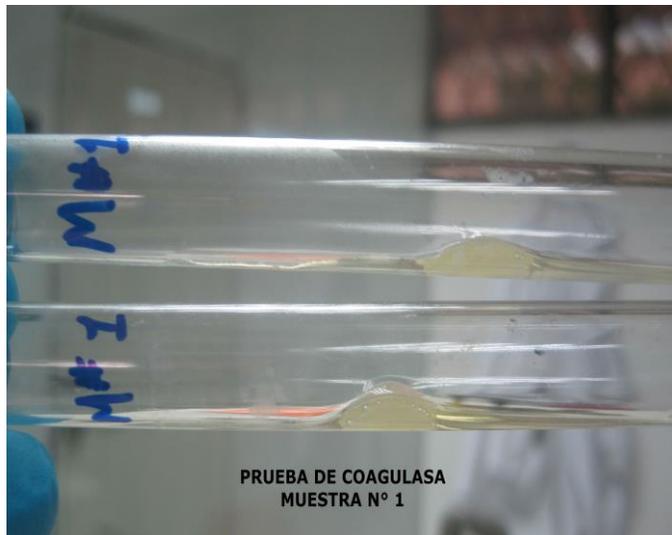
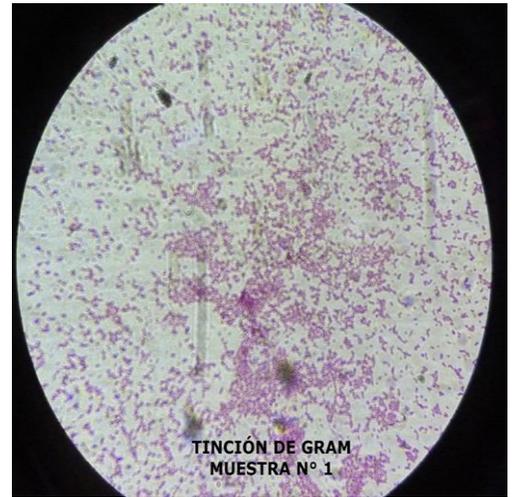
Table 4.3 Minimum numbers of correct judgments^a to establish significance at probability levels of 5 and 1% for paired difference and duo-trio tests (one tailed, $p = 1/2$) and the triangle test (one tailed, $p = 1/3$)

Paired difference and duo-trio tests			Triangle test		
Number of trials (n)	Probability levels		Number of trials (n)	Probability levels	
	0.05	0.01		0.05	0.01
5	5	–	3	3	–
6	6	–	4	4	–
7	7	7	5	4	5
8	7	8	6	5	6
9	8	9	7	5	6
10	9	10	8	6	7
11	9	10	9	6	7
12	10	11	10	7	8
13	10	12	11	7	8
14	11	12	12	8	9
15	12	13	13	8	9
16	12	14	14	9	10
17	13	14	15	9	10
18	13	15	16	9	11
19	14	15	17	10	11
20	15	16	18	10	12
21	15	17	19	11	12
22	16	17	20	11	13
23	16	18	21	12	13
24	17	19	22	12	14
25	18	19	23	12	14
26	18	20	24	13	15
27	19	20	25	13	15
28	19	21	26	14	15
29	20	22	27	14	16
30	20	22	28	15	16
31	21	23	29	15	17
32	22	24	30	15	17
33	22	24	31	16	18
34	23	25	32	16	18
35	23	25	33	17	18
36	24	26	34	17	19
37	24	26	35	17	19
38	25	27	36	18	20
39	26	28	37	18	20
40	26	28	38	19	21

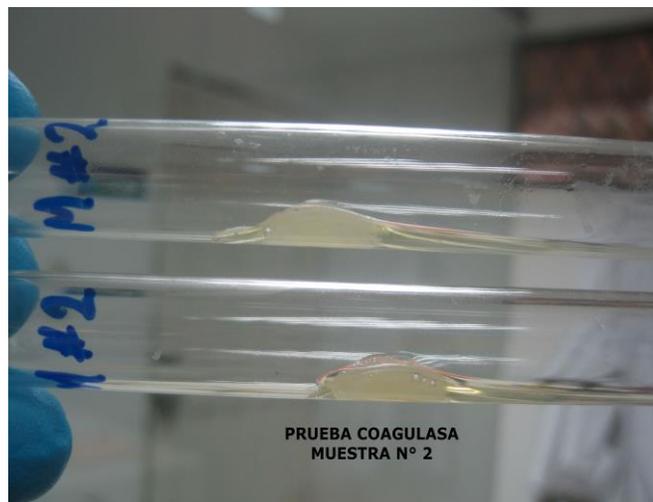
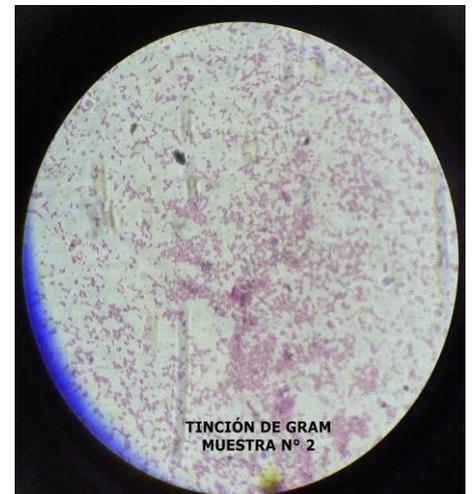
Fuente: Lawless, H., Heymann, H. 2010. Sensory Evaluation on food.

Anexo E: *Aislamiento e identificación de S. aureus para 3 de las comercializadora estudiadas.*

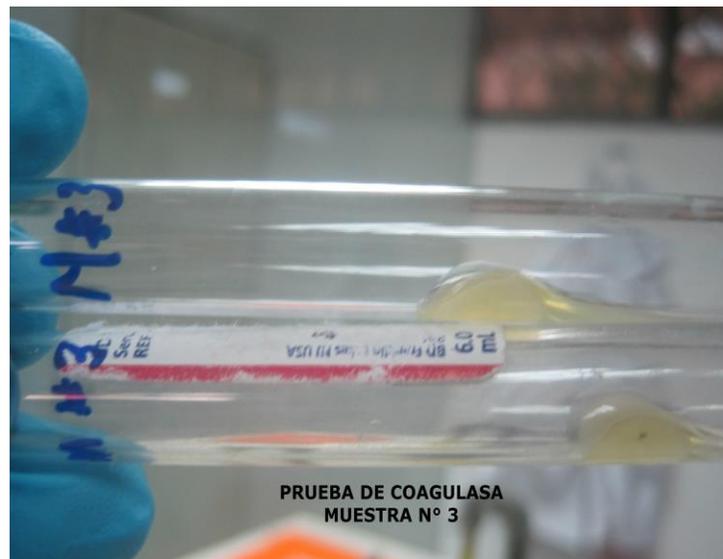
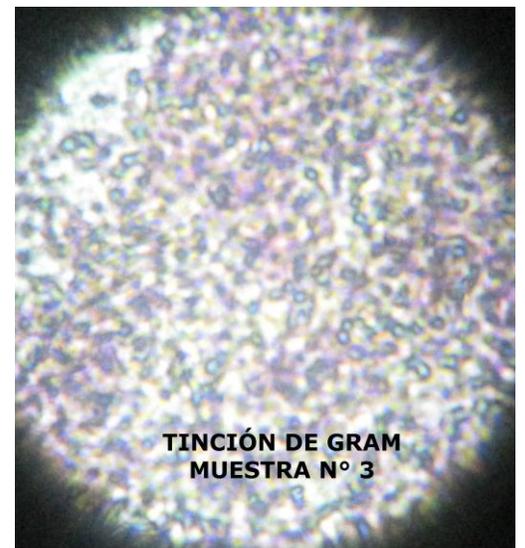
- Comercializadora A:



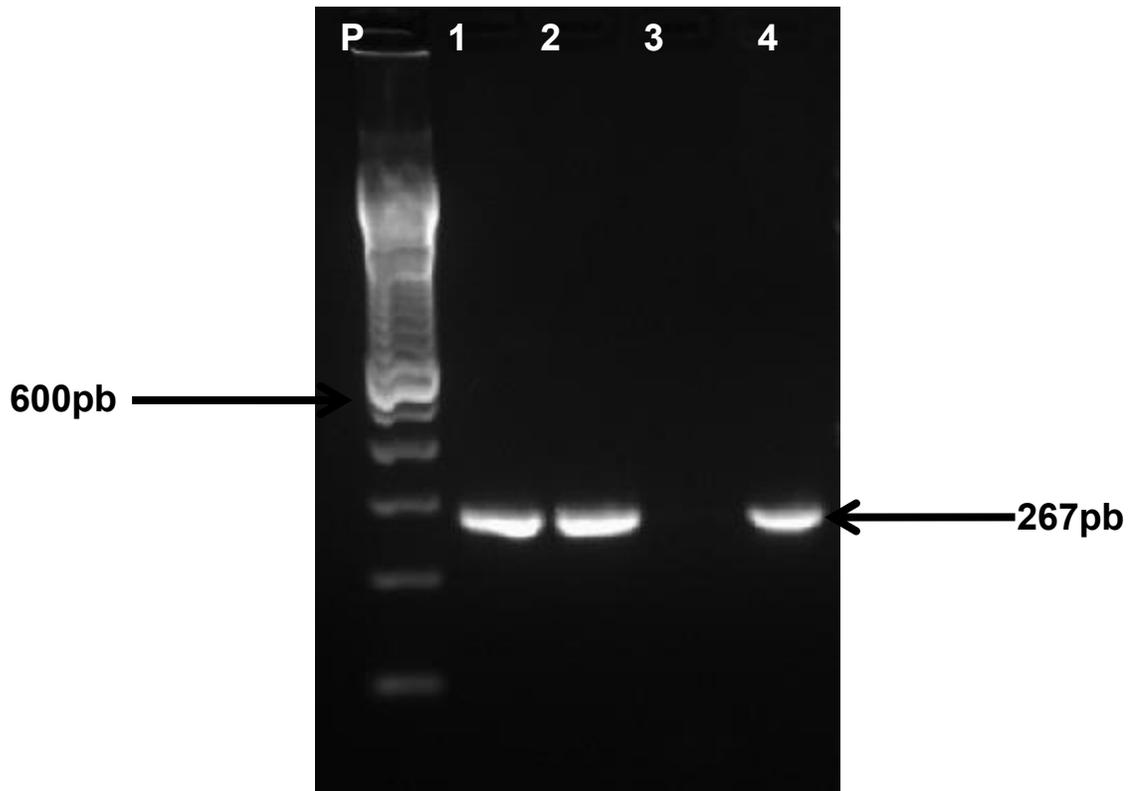
Comercializadora B:



Comercializadora C:

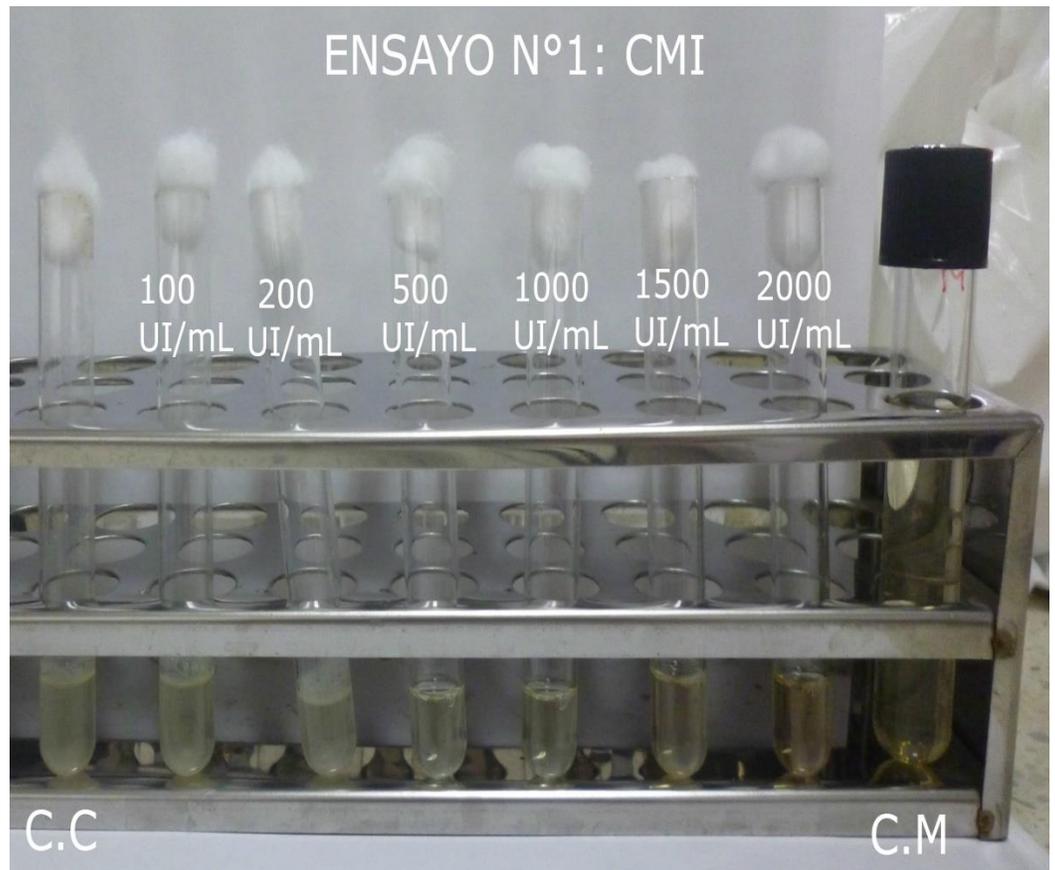


Anexo F: Resultados PCR para la detección del gen *Nuc* de *S. aureus*.



P: marcador de peso molecular 100pb Invitrogen, Carril 1 y 2 Muestras de *S. aureus* aisladas de queso costeño, Carril 3: control de reactivos. Carril 4: Control positivo *Staphylococcus aureus* 267pb

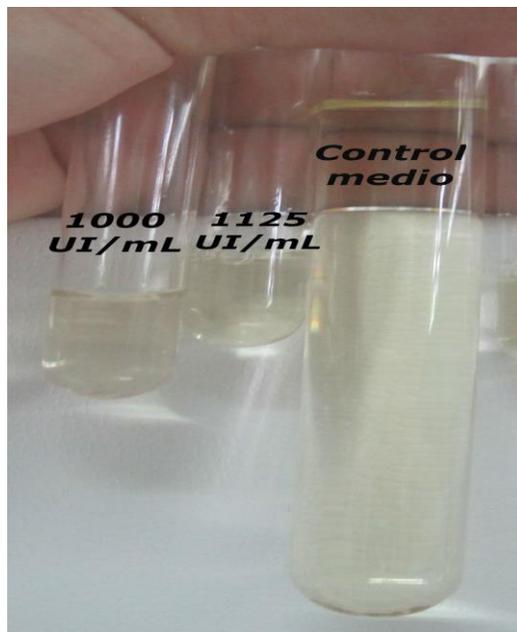
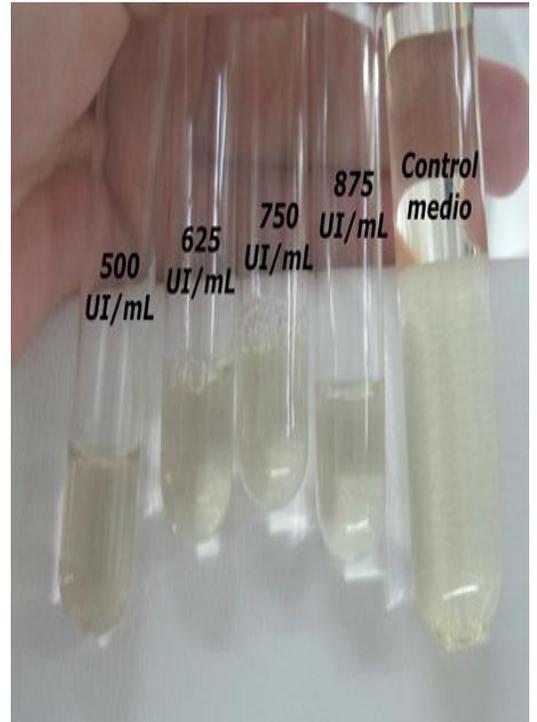
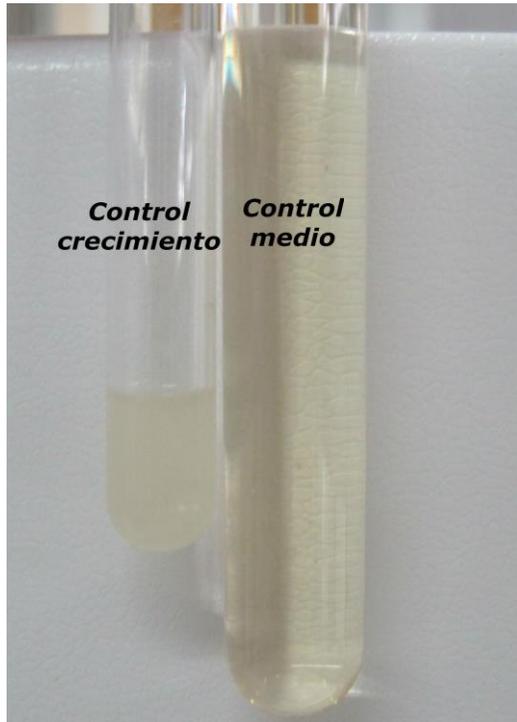
Anexo G: Resultados CMI para ensayo N° 1 concentraciones de nisina de 100, 200, 500,1000, 1500, y 2000 UI/mL.



Anexo H: Preparación de las distintas concentraciones de nisina para la determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) 2^{do} ensayo.

<i>Concentración</i> <i>UI/mL</i>	<i>Sol. Madre</i> <i>10.000 UI/mL</i>	<i>Caldo Mueller</i> <i>Hilton</i>	<i>Total (mL)</i>
500	0.050	0.950	1
625	0,0625	0.9375	1
750	0.075	0.925	1
875	0.0875	0.9125	1
1000	0.1	0.9	1
1125	0.1125	0.8875	1

Anexo I: Resultados CMI para ensayo N° 2 concentraciones de nisina de 500, 625,750, 875, 1000, 1250 UI/mL.



Anexo J: Diagramas de dispersión del recuento de *S. aureus* en los tiempos de almacenamiento 0 y 24 horas.

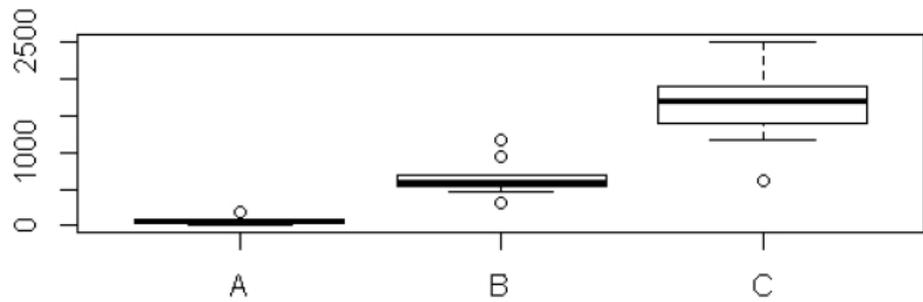


Gráfico N° 4: Diagrama de dispersión de medias para los lotes A, B y C en el recuento de *S. aureus* al tiempo de cero horas.

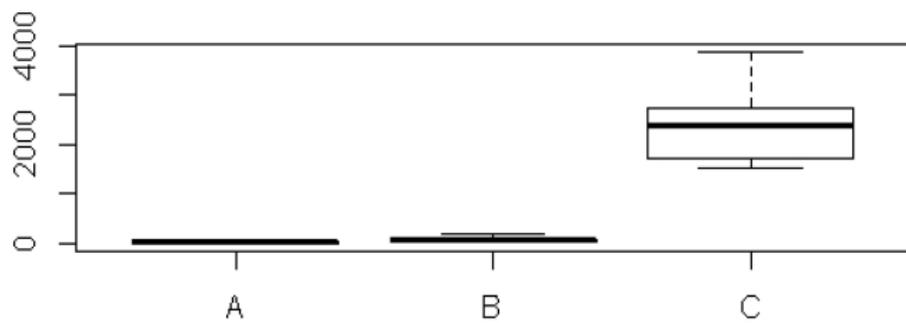


Gráfico N° 5: Diagrama de dispersión de medias para los lotes A, B y C en el recuento de *S. aureus* del tiempo 24 horas.

Anexo K: Resultados catadores no entrenados en prueba triangular

Muestra diferente
386 (A)

Muestra diferente
253 (B)

SECCIÓN 1					SECCIÓN 2				
N°	Orden de presentación			Respuesta	N°	Orden de presentación			Respuesta
1	A	B	B	B	21	A	A	B	B
2	A	B	B	B	22	A	A	B	A
3	A	B	B	A	23	A	A	B	A
4	A	B	B	B	24	A	A	B	A
5	A	B	B	A	25	A	A	B	B
6	A	B	B	A	26	A	A	B	A
7	B	B	A	B	27	B	A	A	B
8	B	B	A	A	28	B	A	A	B
9	B	B	A	B	29	B	A	A	B
10	B	B	A	B	30	B	A	A	A
11	B	B	A	B	31	B	A	A	A
12	B	B	A	B	32	B	A	A	A
13	B	A	B	B	33	A	B	A	A
14	B	A	B	B	34	A	B	A	B
15	B	A	B	B	35	A	B	A	B
16	B	A	B	B	36	A	B	A	A
17	B	A	B	B	37	A	B	A	B
18	B	A	B	B	38	A	B	A	A
19	B	A	B	B	39	A	B	A	A
20	B	A	B	B	40	A	B	A	A

N° total de ensayos

40

N° de juzgamientos correctos

12